



## 微生物による新機能オリゴ糖の生産と利用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小川, 喜八郎 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10458/5722">http://hdl.handle.net/10458/5722</a>

# 微生物による新機能オリゴ糖の生産と利用

小川喜八郎 太田一良

宮崎大学農学部

## 1. 研究目的

キチン、キトサンは21世紀へ橋渡しのできる最後のバイオマスであり、効率的かつ経済的に有用な糖質へ変換する技術の確立が緊要である。その利用は医薬品産業、食品産業、農業等へ応用され、腫瘍随伴免疫増強効果、肝機能改善効果、コレステロール低下、アトピー改善、抗菌性および植物分化促進等の多くの機能があり、本コンセプトのモデル化にり医薬品素材、特定保健用食品等の分野で需要拡大が期待される最も高価なオリゴ糖である。従来、キトサンオリゴ糖は塩酸加水分解由来のもので、重合度3~4以下のオリゴ糖が約40%を占め、機能性が高い重合度5以上のオリゴ糖の調製が困難である。特に、単糖が著量生成する。エンド型のキトサナーゼを用いると、単糖を生成することなく比較的高重合度のオリゴ糖を著量生成させることができる。そこで、当研究室では、新規の*Bacillus*属由来のキトサンオリゴ糖を生産する強力なキトサナーゼ生産菌を分離した。今回、本菌のキトサナーゼを阪急バイオインダストリー(株)で企業化を行うことになった。それゆえ、本酵素の分離・精製を行い、酵素化学的諸性質を調べると共に、オリゴ糖生成条件等について検討した。

イヌリンは、フルクトース(果糖)が重合した多糖であり、キクイモなどに貯蔵多糖として存在する。黒麹菌*Aspergillus niger* No.12株は、イヌリンを分解して重合度3~5の機能性イヌロオリゴ糖を生成する酵素エンド型イヌリナーゼ(2,1-β-D-fructan fructanohydrolase, EC 3.2.1.7)を細胞外に生産する。昨年度、黒麹菌*A. niger* No.12株のゲノムDNAから2つの重複したエンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuA*および *inuB*をそれぞれ*EcoRI*断片としてクローニングし、構造解析を行った。これらの1,548 bpのOpen reading frame (ORF)を含む断片には、いずれも約45 bpの上流領域が存在するのみであった。本年度は、それぞれ遺伝子上流領域のクローニングと構造解析を行った。また、*inuA*および *inuB*遺伝子について、発現の有無について検討した。当研究室にはエンド型イヌリナーゼ生産菌としてさらに糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88株を保有する。併せてTN-88株のエンド型イヌリナーゼ遺伝子をクローニングし、麹菌由来のそれと比較した。

ヘミセルロースの主成分を占めるキシランから生成されるキシロオリゴ糖は、腸内菌叢の改善、糖尿病に対する機能性食品素材として多方面でその利用が期待されている。糸状菌*Aureobasidium pullulans*の培養ろ液から、キ

キシランをキシロオリゴ糖に加水分解する細胞外酵素キシラナーゼを精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにした。

## 2. 研究方法

(1) キトサナーゼの起原は当研究室で分離した新規の *Bacillus* 属のものである。キトサナーゼ活性は Rondole & Morgan 法<sup>1)</sup> で測定した。キトサナーゼは阪急バイオインダストリー（株）で試作した酵素製剤を使用した。キトサナーゼの分離・精製には DEAE-Sepharose CL-6B によるクロマトグラフィーを用いて分離・精製を行い、電気泳動的にその均一性を調べた。精製酵素の一般的な酵素化学的性質、特に種々のキトサンに対するオリゴ糖の生成能を HPLC（東曹）分析等で調べた。さらに、最適オリゴ糖基質の選抜を行った。

(2) *A. niger* No.12 株の *inuA* および *inuB* の 3' 非コード領域の配列には相同性が認められない。この相違を利用して *inuA* および *inuB* に特異的なプローブを PCR で作成した。それぞれの 3' 非コード領域のヌクレオチド配列を基に 20 mer のオリゴヌクレオチドを合成し、PCR のプライマーとした。センスおよびアンチセンス・プライマーとして、*inuA* に対しては 5'-AAG GGG ATT AAG ACG AT-3' と 5'-CGT TCC ACT TGA AAC ATG CA-3'、*inuB* に対しては 5'-ATG ACG AGA GGC CCA GAG TC-3' と 5'-TGG ATA AAA CGA TAC CGG CA-3' をそれぞれ用いた。PCR は、耐熱性 DNA ポリメラーゼ AmpliTaq (Perkin Elmer) を用い、Perkin Elmer model 2400 で行った。増幅された DNA 断片はアガロース・ゲル電気泳動後、ゲルから切り出し Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) を用いて単離した。この断片を pCR II (TA Cloning Kit, Invitrogen) にクローニングし、塩基配列を決定した。この PCR 産物をジゴキシゲニン（ベーリンガー・マンハイム）でランダム・プライマー法により標識し、*inuA* および *inuB* に特異的なプローブとして以下のハイブリダイゼーションに用いた。塩基配列は、ダイデオキシシーケンス法で決定し、データを遺伝子解析ソフト GENETYX-MAC で解析した。

(3) *Aureobasidium pullulans* をキシランを炭素源とする酵素生産用液体培地で、5 日間、30°C で液体振とう培養した後、そのろ液を回収して、細胞外酵素の精製に供した。ポリリチレングリコールを用い培養ろ液を 1/3 まで濃縮し、透析、遠心分離したものを濃縮粗酵素液として、カラムクロマトグラフィーにより精製した。DEAE-Cellulofine A-500（生化学工業）陰イオン交換クロマトグラフィーの結果、2 つのピークが認められ、溶出順に P-I および P-II とした。それぞれの画分を Cellulofine GCL-100 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、Sephacryl S-100HR ゲルろ過クロマトグラフィー、Hydroxyapatite によるクロマトグラフィーに供し、連続的に溶出した。キシラン分解活性は 45°C で 30 分間反応させ、キシランから遊離した還元糖をジニトロサリチル酸

法で定量した。次に本菌株の生産するP-I、P-IIの各酵素について純度をSDS-PAGEにより検定後、その酵素化学的諸性質について検討を行った。

### 3. 研究成果

#### (1) キトサナーゼの分離・精製

キトサナーゼ製剤 2 g からイオン交換クロマトグラフィーにより酵素タンパク質を電気泳動的に単一にすることを試みた。DEAE-Sepharose CL-6B 分画により、図 1 に示すように、キトサナーゼ画分は単一ピークを示した。本区分を集めて濃縮後、濃度勾配を変えて同カラムを用いて再クロマトグラフィーを行ったところ 2 つのキトサナーゼ活性ピークが認められた。今回はイオン強度の低いところで溶出する活性の高いピークが電気泳動的に単一成分であることが認められた。本精製酵素の分子量は約 28 kDa、等電点は約 9.0 であった。

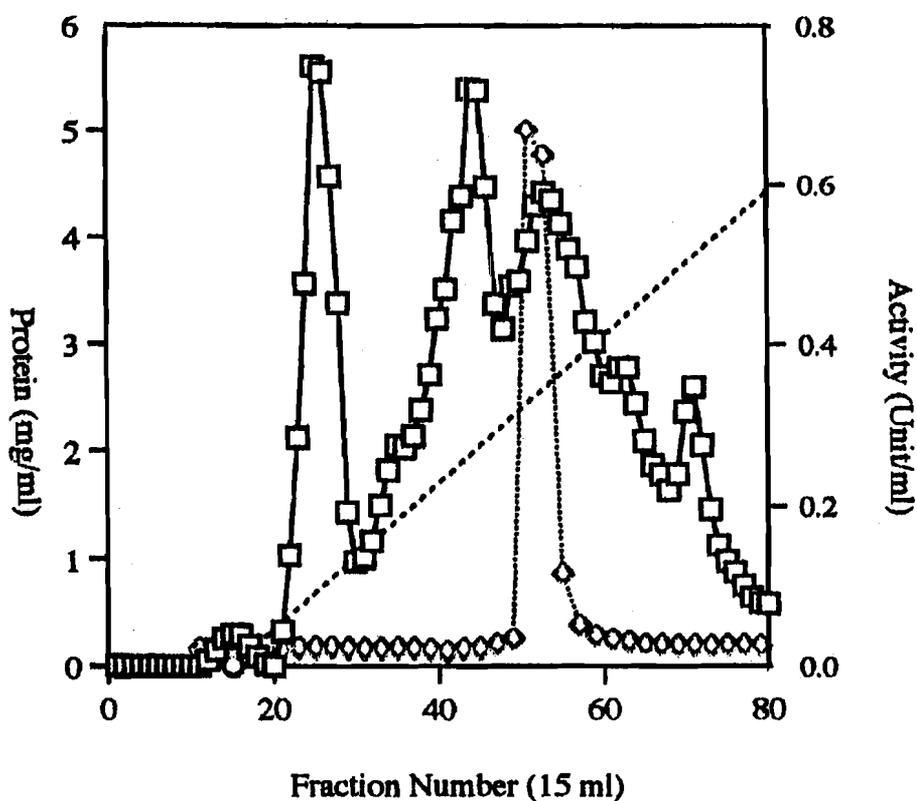


図 1 DEAE-Sepharose CL-6Bによるキトサナーゼの分画

—□— Protein (mg/ml)      .....◇..... Activity (Unit/ml)  
 .....○..... Gradient

## (2) キトサナーゼの酵素化学的性質

本精製酵素の活性の最適pHは7.0であり、pH安定性は5.0~7.0の範囲にあった。最適温度は55℃であり、温度安定性は40℃まで安定であった。基質特異性をキトサンヤエガキBの酵素活性を100とした相対活性率で示した(表1)。本酵素はコロイダルキチンやグリコールキチンには作用しないことが認められる。<sup>2-4)</sup>本酵素はキトサン・ヤエガキB、キトサン・ヤエガキS、キトサンELに対して高い活性は認められた。キトサン10、キトサン9B、キトサン8Bおよびキトサン7Bはアセチル化度の高い順になっているが、この結果から基質のアセチル化度が高い程、キトサナーゼ活性の低下が認められた。また、本酵素は基質の粘度低下と生成糖の相関関係や多少の単糖を生成することから、現在知られている微生物キトサナーゼと同じようにGlcN-GlcN結合に特異的なエンド型の作用機構を持つことが示唆された。

表1 精製キトサナーゼの基質特異性

基質	相対活性 (%)
キトサン10	82.3
キトサン9B	78.5
キトサン8B	65.7
キトサン7B	53.2
キトサン・ヤエガキB	100
キトサン・ヤエガキS	97.9
キトサン・EL	98.5
キトサン (水溶性)	45.4
グリコールキトサン	3.5
部分脱アセチルキトサン	11.8
グリコールキチン	0
コロイダルキチン	0

## (3) 精製キトサナーゼによる機能性オリゴ糖の生成

本結果から本菌のキトサナーゼは現在、市販されているキトサナーゼ製品と同等あるいはそれを凌駕するものであることが確認された(図2)。従って、本酵素は酵素メーカーの阪急バイオインダストリー(株)及び協和化(株)の両社で企業化することになった。

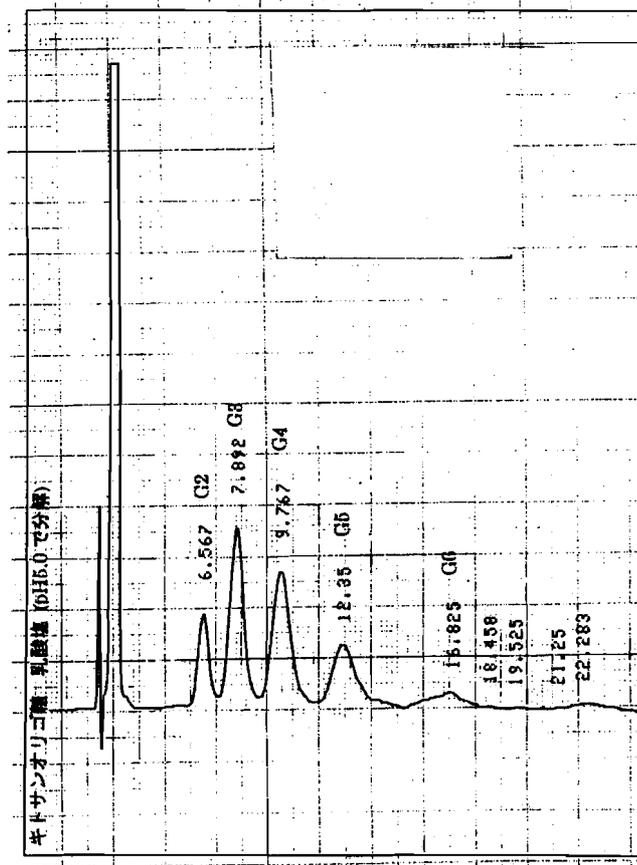


図2 精製キトサーゼによるキトサンからのオリゴ糖の生成

#### (4) エンド型イヌリナーゼ遺伝子上流領域のクローニングと解析

*A. niger* エンド型イヌリナーゼ遺伝子 *inuA* および *inuB* を含む断片の制限酵素地図を基に、*Pst*I断片のゲノムDNAのライブラリー (pUC18) を作成した。昨年度作成した本遺伝子に特異的なプローブを用いてコロニー・ハイブリダイゼーションを行い、*inuA*上流領域を含む断片1.8 kbpと、*inuB*上流領域を含む断片1.6 kbpをそれぞれインサートに持つクローンを得た。これらをシーケンズした結果、*inuA*上流領域にはTATAボックスならびにCCAATモチーフに相当する配列が確認されたが、*inuB*上流領域にはCCAATモチーフは認められなかった。また、両遺伝子上流には、*A. oryzae*の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子およびグルコアミラーゼ遺伝子で報告されているデンプンによる誘導に關与する配列TCACGGGCが認められた。

#### (5) エンド型イヌリナーゼ遺伝子由来の転写産物の解析

*A. niger* No.12株をイヌリン、フルクトース、またはグルコースを炭素源とする液体培地で培養し、それぞれの炭素源で*inuA*および*inuB*のどちらの遺

伝子が発現しているのかについて検討した。それぞれの培養菌体からまず全RNAを調製し、さらにPoly(A)+RNAを精製した。ノーザン・ハイブリダイゼーションでは、明瞭なハイブリダイゼーション・シグナルが認められなかった。したがって、Poly(A)+RNAの逆転写により得られたcDNAの3'末端を3' RACEシステム(GIBCO BRL Life Technologies)により増幅した。このcDNA 3'末端のサザン・ハイブリダイゼーションを *inuA* および *inuB* に特異的なプローブとして行ったところ、いずれの炭素源の場合も *inuB* とのみハイブリダイズした(図3)。

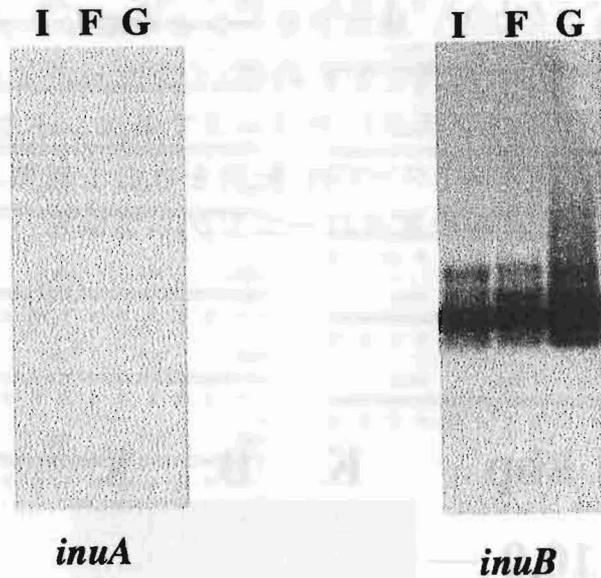


図3. *A. niger* No. 12株由来cDNA 3'末端の *inuA* および *inuB* に特異的なプローブによるサザン・ハイブリダイゼーション  
I, Inulin; F, Fructose; G, Glucose.

#### (6) *Penicillium* sp. TN-88株由来のエンド型イヌリナーゼ遺伝子のクローニングと構造解析

*Penicillium* sp. TN-88株由来のエンド型イヌリナーゼのN末端アミノ酸配列DDYRPAFHFCPAENXMNEPNG<sup>61</sup>の下線部に対応した24merの合成ヌクレオチド(5'-TTT CAT TTC TGC CCG GCG GAG AAT-3'および *A. niger* と *P. purpurogenum* に共通した内部アミノ酸配列GWE PVPDMFに対応した24merの合成ヌクレオチド(5'-AAA CAT ATC CGG CAC TTC CCA TC C-3'))をPCRプライマーとして用いた。PCRによる増幅産物のアガロース・ゲル電気泳動の結果、単一のバンドが認められ、非特異的な増幅は生じなかった。その塩基配列の解析からPCR増幅産物はエンド型イヌリナーゼ遺伝子の一部をコードするDNA配列(621 bp)であることを確認した。したがって、このPCR産物をDIGでラベルし、本酵素遺伝子に特異的なプローブとした。

ゲノムDNAを種々の制限酵素で切断し、アガロース・ゲル電気泳動で分離した後、DNA断片をナイロン膜（アマシャム、Hybond-N+）にブロットティングした。このプローブによるサザン・ハイブリダイゼーションを行った結果、3.0 kbp *Bam*HI、7.0 kbp *Kpn*I および 8.0 kbp *Xba*I断片とそれぞれハイブリダイズした（図4）。このことはエンド型イヌリナーゼ遺伝子がゲノムDNA上に1コピー存在することを示唆した。したがって、*Bam*HI断片由来のDNA断片をゲルから抽出し、プラスミドpUC18にライゲーション後、大腸菌JM109を形質転換し、ゲノムDNAライブラリーを作成した。コロニー・ハイブリダイゼーションにより、陽性クローンを単離し、プラスミドpINU303を調製した。シークエンスの結果、3.0 kbpのインサートには260個のアミノ酸（内25個がシグナルペプチド）をコードするエンド型イヌリナーゼ遺伝子のORFの一部と、TATAボックスとCAAT配列を含む上流領域が得られた（図5）。現在、残りのORFを含む断片をクローニングしている。

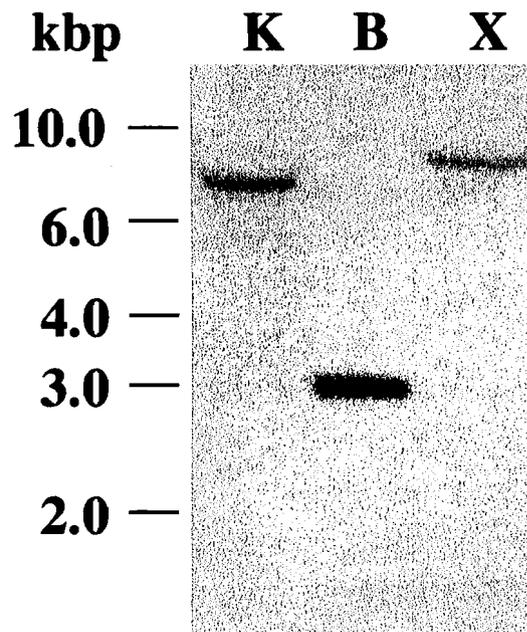


図4 *Penicillium* sp. TN-88 株 ゲノムDNAのサザン・ハイブリダイゼーション  
 レーンK, *Kpn*I ; レーンB; *Bam*HI; レーンX, *Xba*I

10	20	30	40	50	60	790	800	810	820	830	840										
GCATGCCCTGTGTCTCCCGCATCATCGTAACCTACGAGATGCCCTCCGCATATGCATATATCC	TGGGGCAATGAAGTGTGGGGCCATGCCAACCACTCTGACCTGCTTCATGGGATCATCTG	W	G	N	E	C	W	G	H	A	T	S	S	D	L	L	H	W	D	H	L
70	80	90	100	110	120	850	860	870	880	890	900										
ACACCTTACTCCATACCCCGAATTTTCCACTCCCGGATTTGTGAATCCCCAGACCG	CCCGTCCCATTCAGTCCGAGATGGCATTGAATCGTTCACTGCCACTCTTATTACGAT	P	V	A	I	P	V	E	N	G	I	E	S	F	T	G	T	S	Y	Y	D
130	140	150	160	170	180	910	920	930	940	950	960										
AGGTTTATCGAAATTACATTCCTATTGATTTGGCTTAGTCGAAAGAGTTTCCGTTGCT	TGAAATATACATCTGGCTTAGGCACCTGACTAATCCGCCCTACCTTGCTTTTCACC	B	N	N	T	S	G	L	G	T	S	T	N	P	P	Y	L	A	F	F	T
190	200	210	220	230	240	970	980	990	1000	1010	1020										
TATATCTAAGACTCCACAGGTCCCGATGCCCTCCGGACGGTCTCACGGCAATTTGCTT	GGTACACGGAGTCAAAACAAACACAGGACAGCGGCTTCTCTACAGCACAGACTTGA	G	Y	T	E	S	N	K	T	Q	D	Q	R	L	A	Y	S	T	D	L	G
250	260	270	280	290	300	1030	1040	1050	1060	1070	1080										
GGAAATTTTCAACTGCCGAAGATCTTATCCAAACCAAGATGGAATTAATCCGCCACCT	CAGACATGGGTTAAGTTTGGCCGCAACCCAAATCATAGGGCCAGCCAGGAAGCACCTCG	Q	T	W	V	K	F	A	G	N	P	I	I	G	A	A	Q	E	A	P	Q
310	320	330	340	350	360	1090	1100	1110	1120	1130	1140										
TCTCTCTTCCGGTTCATGATCTGATTTGAGATCCGAGAAATAAACATCTTTTCAA	GATATAAGTGGAGGCTCGAGAGTCTGACCCCTAAAGTATTTTCATGCTCCATCAGGG	D	I	S	G	G	L	E	S	R	D	P	K	V	F	F	H	A	P	S	G
370	380	390	400	410	420	1150	1160	1170	1180	1190	1200										
TATCACACACACTAAGGCTTTAGACAGTCAAGATCCGAGATCGTCCCTAGAATGAGG	AAATGGGTATGGTCTGGCCATGGCGCTCAGGACAAATGACATCTGGAGCTTTTA	K	W	V	M	V	L	A	H	G	G	Q	D	K	L	T	F	W	T	S	L
430	440	450	460	470	480	1210	1220	1230	1240	1250	1260										
TATCAATATGGGAGAAACCATTTAATATGAATGCTAAACTTATATATATTGCTTCAC	GATGCTAAAACCTGGAGCTGGGTGAGTGACTGTATCTCCAGATTCAGGGGATCCCG	D	A	K	N	W	T	W	V	S	D	L	S	S	S	Q	I	E	G	F	P
490	500	510	520	530	540	1270	1280	1290	1300	1310	1320										
GTCCCTCCACTGTACAGAAATCAAGATCCATTTCTCATGCCGCTGTATATACACCTTCATC	TCTAGTATAACCGGATGGGAAGTCCCGGATATGTTTCAACTTCCAAATCCAGGGATCAA	S	S	I	T	G	W	E	V	P	D	M	F	Q	L	P	I	Q	G	I	K
550	560	570	580	590	600	1330	1340	1350	1360	1370											
TTTCACAAAGGCCAGGTTCAGAAACCTTATATCCAAATCATGATCTCCCAAGGACTT	AAGACAACTGGGCTTTAATTTTACACCCAGCTCAGGGATCC	K	T	T	W	V	L	I	F	T	P	A	Q	G	S						
610	620	630	640	650	660																
ACTGGGCACTCAAAGCCCTTCCATTTGGTCTTGGCCCTCGTTCCGCGGGGGTAGCCGAT																					
670	680	690	700	710	720																
GACTATCGGCCCGCTTTCATTTCTGTCCGCGGAGAACTGGATGAACGAGCCGAATGGG																					
730	740	750	760	770	780																
CTGATTCAAATCAATTCACCTTGGCACCTATTTTATGAGGCTGACCCAGCTCCAAATGTT																					
LIQINBTWHLFYQADPAANV																					

図5 DNA塩基配列から推定される *Penicillium* sp. TN-88 株由来エンド型イヌリナーゼのアミノ酸配列の一部

(7) *Aureobasidium pullulans* 由来キシラナーゼの精製と酵素化学的性質

精製酵素P-Iは最適pH7.0、最適温度70℃でpH安定性はpH5.0~9.0、熱安定性は60℃以下でいずれも広く安定であった。また、P-II酵素は最適pH6.5、最適温度70℃でpH安定性はpH6.0~7.0と狭く、熱安定性は60℃以下で安定であった。また、各精製酵素をキシラン(oatspelts由来)に50℃で作用させ、薄層クロマトグラフィーによりそれぞれの酵素の経時的分解生成物の検討した結果、P-I、P-II酵素ともに6時間でキシロオリゴ糖を生成したことからエンド型に作用するキシラナーゼと推察された。それぞれの精製酵素について種々の試薬が酵素活性に及ぼす影響を調べた結果、両酵素とも金属による阻害が認められた。

#### 4. 考察

本研究では、*Bacillus*属由来のキトサナーゼを分画・精製し、その酵素化学的性質を解明し、近年、医療や食品等の分野で応用範囲が拡大されてきたキトサンオリゴ糖生成能について追求した。微生物由来の強力なキトサナーゼを得るために、国内外の土壌等から各種の微生物を分離し、キトサナーゼ活性の高い*Bacillus*属細菌を発見した。本酵素は現在、市販されているキトサナーゼを凌駕するものであった。著量のキトサナーゼを生成する*Bacillus*属由来の酵素製剤（阪急バイオインダストリー試作品）中の本酵素の分離・分画を試みた。DEAE-Sepharose CL-6Bを用いるカラムクロマトグラフィーにより、電気泳動的に均一な約分子量28 kDa, 等電点約9.0のキトサナーゼを得た。キトサナーゼは最適pH7.0, 最適温度は55°Cであった。pH安定性は5.0~7.0で、温度安定性は40°Cまでであった。本酵素はコロイダルキチンやグリコールキチンには作用しないことが認められた。本酵素はアセチル化度の低い基質の方が高い活性を示し、オリゴ糖生成能も高いことが認められた。精製キトサナーゼの作用様式は生成オリゴ糖と粘土低下の相関からエンド型の分解様式を示すことが示された。本酵素によるキトサンオリゴ糖生成能の高い基質を選抜し、オリゴ糖生成を試みた結果、本酵素は重合度5~7のオリゴ糖を生成し、工業的に優れた酵素であることが証明された。

本研究で*A. niger* No. 12株に見出したエンド型イヌリナーゼコードする重複遺伝子と同じように、麹菌*Aspergillus oryzae*<sup>6)</sup>と*Aspergillus awamori*<sup>7)</sup>にそれぞれ3および2コピーの $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の存在が報告されている。最近、Uhmら<sup>8)</sup>が*Aspergillus ficuum* (ATCC 16882)からエンド型イヌリナーゼをコードする遺伝子*inu2*をクロニングし、その塩基配列を決定した。*A. ficuum*の*inu2*を含む2.3-kbp *Kpn*I断片は、本菌株の*inuA*の2.3-kbp *Kpn*I断片と同一であった。2コピーの遺伝子の内、*inuB*のみの転写が認められた結果は、精製酵素の部分アミノ酸配列が*inuB*遺伝子産物に対応する昨年度の結果と一致した。本実験条件では発現しなかった*inuB*遺伝子については、特定の環境でのみ発現する遺伝子なのか、あるいは機能を失った偽遺伝子なのか、今後検討する予定である。

*Aureobasidium pullulans*由来の細胞外キシラナーゼは、特に高温（70°C）における至適作用温度を有し、工業的有用性が示唆された。また、既報のキシラナーゼの約2倍の分子量を持つことから、新規な酵素と推察された。今後、より効率的なキシラン分解のための条件について検討する予定である。

#### 5. 引用文献

- 1) C. J. Rondle and W. T. J. Morgan, The determination of glucosamine

- and galactosamine, *Biochemical Journal*, 61, 586-589(1955).
- 2) 夜久富美子、セルラーゼの示すキトサナーゼ活性について、*Chemistry Express*, 5, 257-260(1990).
  - 3) 外山信男、小川喜八郎、*Trichoderma viride*の真菌類溶解酵素の精製と性質、*発酵工学*, 1, 626-633(1968).
  - 4) K. Ogawa, H. Toyama, and N. Toyama, Degradation of fungal cell walls and protoplast formation by a mycolytic enzyme, *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University*, 26, 387-398(1979).
  - 5) T. Nakamura, A. Shitara, S. Matsuda, T. Matsuo, M. Suiko, and K. Ohta, Production, purification and properties of an endoinulinase of *Penicillium* sp. TN-88 that liberates inulotriose, *Journal of Fermentation and Bioengineering.*, 84(8), 313-318 (1997).
  - 6) S. Wirsel, A. Lachmund, G. Wildhardt, and E. Ruttkowski, Three  $\alpha$ -amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical intron-exon organization, *Molecular Microbiology*, 3(1), 3-14(1989).
  - 7) D.R. Korman, F.T. Bayliss, C.C. Barnett, C.L. Carmona, K.H. Kodama, T.J. Royer, S.A. Thompson, M. Ward, L.J. Wilson, and R.M. Berka, Cloning, characterization, and expression of two  $\alpha$ -amylase genes of *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Current Genetics*, 17, 203-212 (1990).
  - 8) T. B. Uhm, K. -S. Chae, D. W. Lee, H. -S. Kim, J. -P. Cassart, and J. Vandenhoute, Cloning and nucleotide sequence of the endoinulinase-encoding gene, *inu2*, from *Aspergillus ficuum*, *Biotechnology Letters*, 20(8), 809-812(1998).

## 6. 成果の発表

### ①研究発表

- 1) 小川喜八郎、オムマサバ、A.C., 杉村さつき、吉田直人、*Acremonium* 属起原のキチナーゼの精製と性質、日本農芸化学会西日本支部大会講演要旨集、p. 36(1996).
- 2) オムマサバ クリスピナ、杉村さつき、ナスリン ベゴマ、木場雅子、吉田直人、武部英日、小川喜八郎、*Bacillus* sp.由来キトサナーゼの精製と性質、日本農芸化学会西日本支部・関西支部合同大会講演要旨集、p. 28(1997).
- 3) K. Ohta, H. Akimoto, S. Matsuda, D. Toshimitsu, and T. Nakamura, Molecular cloning and sequence analysis of two

endoinulinase genes from *Aspergillus niger*, Bioscience,  
Biotechnology and Biochemistry, 62(9),1731-1738 (1998).