宮崎大学学術情報リポジトリ
University of Miyazaki Academic Repository

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: Japanese 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	http://hdl.handle.net/10458/5723

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

近年、生体の免疫・生体防御系調節、神経系調節、循環系調節、内分泌および外分泌調節等に関係する糖質の第３次機能が高齢化社会に向けての人類の健康、福祉等医療産業、食品産業および農業分野で最も期待されている。

中でもキチン・キトサ・オリゴ糖はビフィズス菌増殖促進、細胞免疫増強、抗感染病効果、抗腫瘍活性、植物生長促進、コレステロール低下、アトピー改善、食品保存性および植物病原菌増殖抑制等の多くの機能を示すことが知られており、これらのオリゴ糖を多量に、低コストで生産するための技術開発が進めれれている。従来、キトサンオリゴ糖は塩酸加水分解由来のもので、重合度も３－４糖以下の糖が４０％を占め、機能性の高い５糖以上の調製が難しく、また、単糖が著量生じることおよび精製が困難なことがあげられている。しかし、エンド型のキトサナーゼ酵素分解では単糖を生成することなく機能性の高い５－８糖のキトサンオリゴ糖を生成する。

本研究ではキトサン分解酵素（キトサナーゼ）活性の高い微生物のスクリーニングを行い、本酵素活性の高い工業的生産菌、バチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*)の分離に成功した（表１）。本酵素の起業化（微生物特許取得、酵素の製剤化とおよび試薬開発）を目標に本酵素の酵素化学的性質、キトサンオリゴ糖の作用機構および生成条件等について研究した。

イヌリンは、フルクトース（果糖）が重合した多糖であり、キクイモなどの植物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。昨年度は、黒麹菌*A. niger* No.12株のゲノムDNA上の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*の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転写レベルで検討した。一方、当研究室にはエンド型イヌリナーゼ生産菌として糸状菌 *Penicillium* sp. TN-88株を保有する。TN-88株はイヌリン内部のβ-2,1-フルクトフラノシド結合を切断し、主にイヌロトリオースを生成するエンド型イヌリナーゼを誘導的に産生する。本年度は、TN-88株由来エンド型イヌリナーゼの構造解析を目的として、ゲノムDNAとcDNAをクローニングし、プロモーター領域及びコード領域の構造を明らかにした。更に推

表-1　供試細菌の性状試験結果

試験項目	試験結果
形態	桿菌
グラム染色性	＋
胞子	＋
形	楕円形
位置	亜端立
胞子嚢	非膨出
運動性	＋
カタラーゼ	＋
酸素に対する態度	好気性
嫌気下での生育	－
Ｖ－Ｐ反応	＋
Ｖ－Ｐブロスのpｈ	5.6
グルコースからの酸の生成	＋
グルコースからのガスの生成	－
ゼラチンの分解	＋
デンプンの分解	＋
クエン酸塩の利用	＋
プロピオン酸塩の利用	－
卵黄反応	－
硝酸塩の還元	＋
pH6.8での生育(ﾆｭｰﾄﾘｴﾝﾄﾌﾞﾛｽ)	＋
pH5.7での生育	＋
5 %NaCl存在下での生育	＋
7 %NaCl存在下での生育	＋
10℃での生育	－
30℃での生育	＋
50℃での生育	＋
55℃での生育	－
菌体内DNAのGC含量(mol%)[*1]	45

[*1]　HPLC法によった。

定アミノ酸配列の解析から分子系統樹を作成しその分子進化についても考察した。

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、キシランをキシロオリゴ糖に加水分解する２種の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) キトサナーゼ生産微生物を分離するためにキトサンを唯一の炭素源とする最小培地を用いた。キトサナーゼ活性測定にはRondole & Morgan法[1,2]を用いた。0.1 M酢酸塩緩衝液(pH 5.0) で適当に希釈した酵素液0.5 mlと基質0.5 mlを反応させた後、アセチルアセトン試薬１mlを加えて反応を停止させた。２０分間加熱煮沸、冷却後エタノル３mlとエールリッヒ試薬１mlを加え緩やかに混合する。さらに、65－70℃、10分間煮沸、冷却後530 nmにおける吸光度を測定した。酵素力価は１分間に１μmolのグルコサミンを生成する酵素量として表示した。微生物の同定は日本分析センターに依頼した。

(2)本酵素製剤を阪急バイオインダストリー（株）に依頼して試作品を調製した。本酵素はDEAE-Sepharose CL-6BおよびSephacryl S-100 HRによるクロマトグラフ法で分画・精製した。精製酵素の一般的性質、特に、種々のキトサンに対するオリゴ糖の生成能をHPLC分析を行い、最適オリゴ糖生成基質の選抜や本酵素の転移作用等を調べた。さらに、現在本酵素の遺伝子構造を解析している。

(3)*Penicillium* sp. TN-88株エンド型イヌリナーゼのＮ末端アミノ酸配列[3]と既報のエンド型イヌリナーゼに保存されたアミノ酸配列を基に一組のプライマーを作成し、PCRによりゲノムDNAから本酵素遺伝子の一部を含む621 bpの断片を増幅した。これをジゴキシゲニン(DIG)標識し、エンド型イヌリナーゼ遺伝子に特異的なプローブとした。このプローブとゲノムDNAのサザン・ハイブリダイゼーションを行ったところ、3.0-kbp *Bam*H I 断片とハイブリダイズした。この断片をプラスミド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。このライブラリーからコロニー・ハイブリダイゼーションを行い、得られたクローンをサブクローニングし、構造遺伝子(ORF)の一部と上流領域を含む*Sph* I -*Bam*H I 断片(1.4 kbp)を得た。この塩基配列を基にプライマーを作成し、本菌株のmRNAから Reverse Transcription (RT)-PCR法により完全長cDNAをクローニングした。得られたcDNAの塩基配列を基にプライマーを作成し、ゲノムDNAを鋳型にしてPCRで本酵素遺伝子を増幅し、その塩基配列から1,545 bpのORFが推定された。TN-88

株よりmRNAを調製し、5′および3′RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)法により、完全長のエンド型イヌリナーゼcDNAを合成した。DDBJのデータ・ベースから相同性の高いアミノ酸配列を検索し、Clustal Wでアラインメントを行い、これをもとにNeighbor-Joining法により分子系統樹を作成した。

(4)*A. pullulans* IFO6404株およびFERM-P4257株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℃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。ポリエ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イーにより精製した。DEAE-Cellulofine A-500（生化学工業）陰イオン交換クロマトグラフイーの結果、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イー、Sephacryl S-100 HRゲルろ過クロマトグラフイー、Hydroxyapatiteによるクロマトグラフイーに供し、連続的に溶出した。キシラン分解活性は45℃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した。

3．研究成果

(1)キトサナーゼの機能性オリゴ糖生成

本菌由来のキトサナーゼは生理活性の高い4糖から6糖以上（およそ8糖まで）のオリゴ糖を80％以上を含む、優れたキトサンオリゴ糖生成酵素であることが確認された。また、本酵素は転移反応を示し、例えば、4量体のキトサンオリゴ糖を6～8糖のオリゴ糖を40％も生成する特徴を示す酵素である（表2、図1、2、3）。

(2)新規キトサナーゼの工業的生産

本酵素のキトサンからのオリゴ糖生成能が市販製剤のそれに比べて、酵素活性や生理的に要求される機能性の高い5－6糖を生成することから本酵素の工業的生産を阪急バイオインダストリー（株）および協和化成（株）で行い、1999年9月に特許申請を行うと共に工業生産を開始した。

(3)本酵素によるキトサンからのキトサンオリゴ糖の生成条件および転移反応等について詳細に研究した。これらの結果から本酵素生産菌は本コンセプトのモデル化により応用可能な新規有用菌であることが証明された。

(4)上述のように*A. niger* No.12株はそのゲノム上に重複したエンド型イヌリナーゼ遺伝子*inuA*と*inuB*を保有する。*inuA*と*inuB*に特異的なDNAプローブを両遺伝子間でホモロジーが認められないそれぞれの3′非コード領域を基に作成した。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本菌株

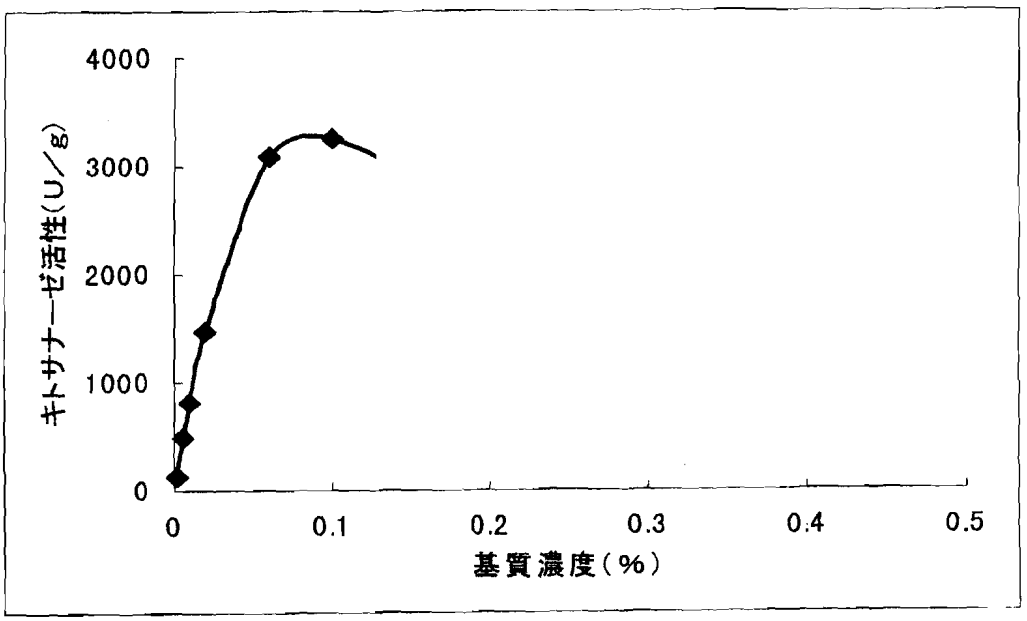
表 2　キトサナーゼのキトサンおよびキトサンオリゴ糖分解

基質	生成物 (%)						
	GlcN	$(GlcN)_2$	$(GlcN)_3$	$(GlcN)_4$	$(GlcN)_5$	$(GlcN)_6$	$>(GlcN)_6$
$(GlcN)_2$	~	97.3	~	2.6	~	~	~
$(GlcN)_3$	~	~	92.4	~	~	~	3.0
$(GlcN)_4$	6.7	3.2	5.4	41.5	~	9.8	31.6
$(GlcN)_5$	2.5	3.7	2.0	4.2	76.8	~	10.9
$(GlcN)_6$	~	6.9	4.2	3.8	6.2	63.4	14.2
キトサン10	~	3.5	9.6	16.0	17.2	15.4	34.6

反応は基質濃度１０％で、生成物の分析はHPLCで行った。

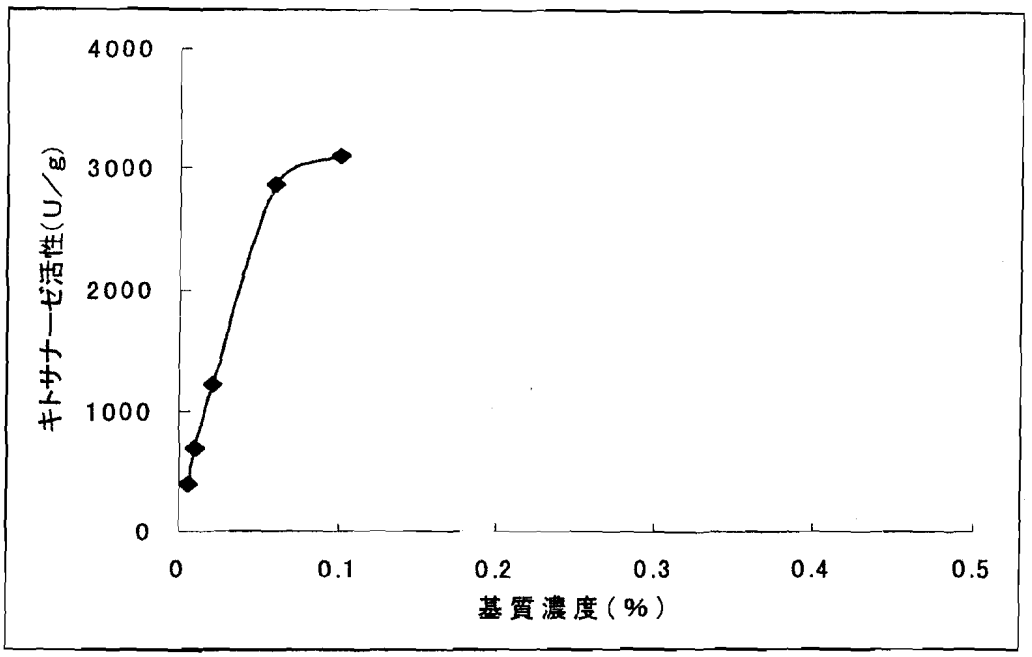
図1　*Bacillus subtilis* KH1由来キトサナーゼの生成するキトサンオリゴ糖

a．Y社製キトサンの場合(低分子キトサン，脱アセチル化度 80%以上)



反応条件：pH5.6，40℃，10分間

b．S社製キトサンの場合（脱アセチル化度 85%以上）

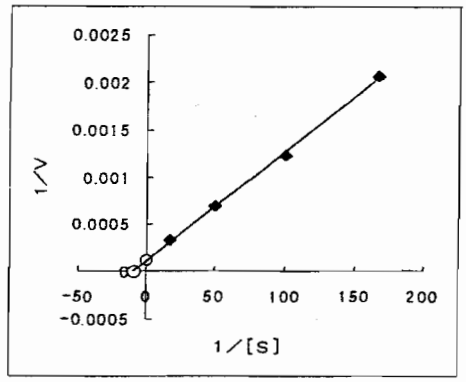


反応条件：pH5.6，40℃，10分間

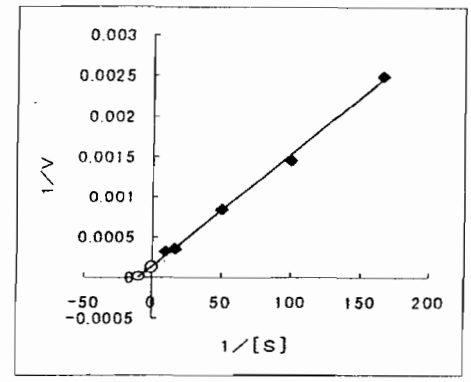
図2　キトサナーゼの基質飽和曲線

a．Y社製キトサンの場合(低分子キトサン，脱アセチル化度 80%以上)

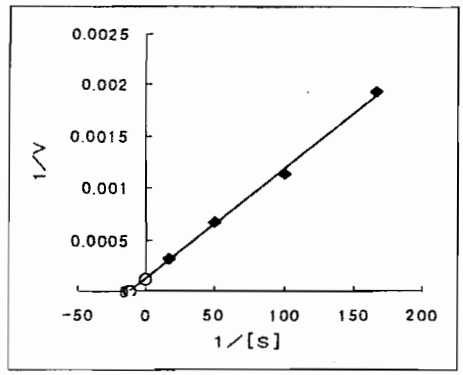
b．S社製キトサンの場合（脱アセチル化度 85%以上）



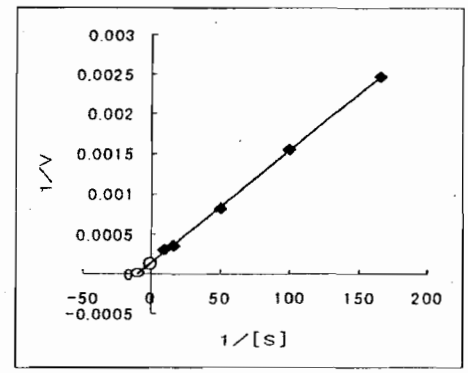
Water　km = 0.104
Vmax = 9004



Water　km = 0.104
Vmax = 7495



A. C. b.　km = 0.091
Vmax = 8540



A. C. b.　km = 0.103
Vmax = 7375

図3　キトサナーゼのLineweaver-Burkのプロット

の液体培養後の菌体からそれぞれポリ(A)+ RNAを調製した。各RNAから逆転写反応とそれに続くPCRで、本酵素をコードするcDNAを増幅した。いずれの炭素源で増殖した菌体から調製したcDNAも*inuB*に特異的なプローブとのみハイブリダイズし、*inuA*由来のcDNAは検出されなかった。本菌株のゲノムDNAから両遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、塩基配列を決定した。*inuB*遺伝子の上流に4ヶ所の転写開始点、翻訳開始コドンの103 bp上流にTATAボックス（TATATA）が認められた。*inuB*転写産物のポリ(A)付加部位は、翻訳終止コドンの94～297 bp下流に多数存在した。

(5)DIG標識したエンド型イヌリナーゼに特異的なプローブを用いて、サザン・ハイブリダイゼーションを行った結果、3.0-kbp *Bam*H I 断片、8.0-kbp *Xba* I 断片、または7.0-kbp *Kpn* I 断片とのみハイブリダイズした。このことから*Penicillium* sp. TN-88株が生産するエンド型イヌリナーゼをコードしている遺伝子は、本菌株の染色体DNA上に1コピー存在することが示唆された。TN-88株エンド型イヌリナーゼをコードするゲノムDNAとcDNAの比較からORFはイントロンを含まず、N末端アミノ酸25残基からなるシグナル・ペプチドと490残基の成熟酵素をコードした。成熟酵素は3個のシステイン残基と10ケ所の*N*-グリコシド型糖鎖結合部位を含み、推定分子量は52,944 Daであった。また、上流領域に3ケ所の転写開始点とTATA配列が認められプロモーター領域が推定された。本酵素の推定アミノ酸配列は、*P. purpurogenum*起源の同酵素[3]と85%、*A. niger* No.12株起源の同酵素と72%の相同性を示した。

(6) *A. pullulans* FERM-P4257株がより多量のキシラナーゼを生産するような培養条件を設定した。その培養条件で本菌株を大量培養し、生産されたキシラナーゼをDEAE-Cellulofine A-500を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、Sephacryl S-100 HRを用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGEにより純度検定および分子量測定を行った。一種類の酵素P-IIを電気泳動的に単一になるまで精製した。精製酵素の分子量は24,000 Daと推定され、最適pHは3.5、最適温度は50℃であった。尚、比活性は最適条件では2144.1(U/mg)であった。pH 2.0～pH 6.0の酸性領域で高いpH安定性を示し、60℃まで熱安定性を示した。薄層クロマトグラフィーの結果からキシラン加水分解反応生成物として、キシロース、キシロビオース、キシロトリオースが確認された。P-IIのN末端アミノ酸配列は、Ala-Gly-Pro-Gly-Gly-Ile-Asn-Tyr-Val-Gln-Asn-Tyr-Asn-Gly-Asn-Leu-Gly-Gln-Phe-Thrであった。アミノ酸配列のホモジギー検索から糸状菌のエンド型キシラナーゼと相同性を示した（図4）。

4．考察

上記のように本研究は実用化を目標に研究開発を行った。本研究では、1)

[redacted]は *A. pullulans* FERM-P4257 株由来の精製酵素のN末端アミノ酸配列（20 残基）と相同性があった領域

```
A. pullulans      MKFFATIAALVVAAVAAPVAEAEAEASSPMLIERAGPGGINYVQNYNGNLGQFTYNENAG
Asp. awamori      MKVTAAFAGLLVTAFAAPVPEPVLVSRS————————AGINYVQNYNGNLGDFTYDESAG
Asp. kawachii     MKVTAASAGLLGHAFAAPVPQPVLVSRS————————AGINYVQNYNGNLADFTYDESAG
Asp. tubingensis  MKVTAAFAGLLVTAFAAPAPEPDLVSRS————————AGINYVQNYNGNLGDFTYDESAG
Asp. niger        MKVTAAFAGLLVTAFAPPVPEPVLVSRS————————AGINYVQNYNGNLGDFTYDESAG
                  **. *: *.*:  *.*.*..:.   : *         .************.:***:*.**

                  TYSMYWNNGVNGDFVVGLGWSTGAARSITYSSNYQASGG-SYLSVYGWINSPQAEYYIVE
                  TFSMYWEDGVSSDFVVGLGWTTGSSNAITYSAEYSASGSSSYLAVYGWVNYPQAEYYIVE
                  TFSMYWEDGVSSDFVVGLGWTTGSSNAISYSAEYSASGSSSYLAVYGWVNYPQAEYYIVE
                  TFSMYWEDGVSSDFVVGLGWTTGSSNAITYSAEYSASGSASYLAVYGWVNYPQAEYYIVE
                  TFSMYWEDGVSSDFVVGLGWTTGSSNAITYSAEYSASGSSSYLAVYGWVNYLRLNTTSSR
                  *:****::**..********:**::.:*:**::*.***. ***:****:*  : :    .

                  SYGSYNPCGAGQSGVTQLGTVYSDGATYTVCTDTRTNQPSITGTSTFKQYWSVRQTKRTS
                  DYGDYNPCSS——ATSLGTVYSDGSTYQVCTDTRTNEPSITGTSTFTQYFSVRESTRTS
                  DYGDYNPCSS——ATSLGTVYSDGSTYQVCTDTRTNEPSITGTSTFTQYFSVRESTRTS
                  DYGDYNPCSS——ATSLGTVYSDGSTYQVCTDTRTNEPSITGTSTFTQYFSVRESTRTS
                  ITVITTLAAR————————P———QALVPSTLMEAPTKSAPTLELTNRPSREQARSR
                     . ..                    : ..*  : *: :..:      . *:  *:

                  GTVTTGNHFAYWAKYGFGNS-YNFQVMAVEAFSGTGSASVTVS-
                  GTVTVANHFNFWAQHGFGNSDFNYQVMAVEAWSGAGSASVTISS
                  GTVTVANHFNFWAQHGFGNSDFNYQVMAVEAWSGAGSASVTISS
                  GTVTVANHFNFWAHHGFGNSDFNYQVVAVEAWSGAGSASVTISS
                  STSPFERARAHLER————————————————————————
                  .*.  .   .  :
```

図４　*Aureobasum pulluans* キシラナーゼP-IIのＮ末端アミノ酸配列のホモロジー検索

キトサンオリゴ糖生成酵素のスクリーニングを行い、工業的生産菌*Bacillus subtilis* KH1の分離に成功した。2）本菌由来のキトサナーゼの分画・精製を行い、タンカク質的および酵素化学的諸性を調べると共に、作用機作ならびに遺伝子解析を行った。3）本酵素によるキトサンからのキトサンオリゴ糖の生成条件および転移反応等について詳細に研究した。これらの結果から本酵素生産菌は本コンセプトのモデル化により応用可能な新規有用菌であることが証明された。一方、工業化に際し、企業側では、1）培養法の改良（培地組成、培地濃度、培養温度、培養pH、通気撹拌条件、種菌の摂取量の検討。2）精製工程の開発［菌体の分離工程、キトサナーゼの濃縮工程（限外ろ過、低温減圧濃縮、タンパク）、色、臭いの除去（イオン交換樹脂、活性炭処理）、生菌除去精密ろ過工程（メンブランろ過、セラミックろ過）、粉末化工程（噴霧乾燥、凍結乾燥、送風乾燥）および製品化工程（粉末製品、液体製品、液体製品では安定化剤や防腐剤の検討）］、3）キトサンオリゴ糖の製造方法の開発（アセチル化度の異なるキトサンを基質に基質濃度、作用温度、作用pH、pH調整用の酸の種類、基質添加法糖）および4）キトサンオリゴ糖生成酵素およびキトサンオリゴ糖の分析と評価を行い、最終的に工業化可能な酵素であることが確認され、1999年9月に工業生産を開始し、さらに、特許を申請受理された。

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あるいは機能を失った偽遺伝子であると考察した。　インベルターゼ、レバナーゼ、イヌリナーゼは、基質特異性の相違に拘わらず、その一次構造に高い相同性を示すβ-fructofuranosidase familyを構成する。*Aspergillus*属と*Penicillium*属に由来する本酵素遺伝子は共通してイントロンを含まず、推定アミノ酸配列はβ-fructofuranosidase motif (MNDPNG)のAspがGlu-43に置換した構造を特徴とした。また、ホモロジー検索からGlu-43とともにGlu-233の活性への関与が示唆された。上記familyに属する各酵素のアミノ酸配列を基に系統樹を作成したところ、糸状菌のみに存在が知られているエンド型イヌリナーゼの起源は細菌のレバナーゼ遺伝子に近いものと考察され、フルクトフラノシダーゼとは別のクラスターを形成した。

当研究室保存菌株の*A. pullulans* FERM-P4257株は高いキシラン分解活性を持つキシラナーゼを細胞外に生産する。本研究ではキシランのより効率的な利用を目的として、FERM-P4257株の生産する細胞外キシラナーゼP-IIを精製し、その酵素化学的諸性質を明らかにした。この細胞外キシラナーゼは、特に酸性領域で高いpH安定性を示し、工業的有用性が示唆された。また、現在

精製中のP-Iは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。

５．引用文献

1) C.J. Rondle and W.T.J. Morgan, The determination of glucosamine and galactosamine, Biochemical Journal, **61**, 86-589(1955).

2) 夜久富美子、セルラーゼの示すキトサナーゼの活性について、Chemistry Express、**5**, 257-260(1990).

3) 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(4), 313-318 (1997).

4) S. Onodera, T. Murakami, H. Ito, H. Mori, H. Matsui, M. Honma, S. Chiba, and N. Shiomi, Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNA and gene encoding *endo*-inulinase from *Penicillium purpurogenum*, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 60(11), 1780-1785 (1996).

６．成果の発表

①研究発表

1) 小川喜八郎、オムマサバ　A. クリスピナス、吉田直人、井上順一、仮屋勲一、細菌由来新規キトサナーゼの精製と性質、日本農芸化学会誌（講演要旨集）、**73**、30（1999）.

2) 小川喜八郎、宮嶋俊吉、仮屋勲一、細菌由来の新規キトサナーゼの精製と性質,第１３回シンポジウム特集、日本キチン・キトサン学会、2、254-255(1999).

3) Omumasaba、C. A、吉田直人、堰口義明、仮屋勲一、小川喜八郎、*Bacillus subtilis*の生産する新規キトサナーゼによるキトオリゴ糖の生成、日本生物工学会九州支部大会　（第６回）、p.25 (1999).

4) 秋元秀俊、串間隆志、太田一良、中村豊彦、*Aspergillus niger* エンド型イヌリナーゼ遺伝子は重複により偽遺伝子*inuA*と機能をもつ*inuB*へと進化した、日本農芸化学会西日本支部大会講演要旨、p.31 (1999).

5) 清田直幸、秋元秀俊、串間隆志、太田一良、中村豊彦、*Penicillium* sp. TN-88株エンド型イヌリナーゼをコードするゲノムDNAとcDNAのクローニング、日本農芸化学会西日本支部大会講演要旨、p.32 (1999).

6) 太田一良、秋元秀俊、清田直幸、串間隆志、太田一良、中村豊彦、糸状菌エンド型イヌリナーゼの一次構造と分子進化、日本農芸化学会誌（講

演要旨集）、74、234 (2000).

7) C.A. Omumasaba, N. Yoshida, Y. Sekiguchi, K. Kariya, and K. Ogawa, Purification and some Properties of a novel chitosanase from *Bacillus subtilis* KH1, Journal of General and Applied Microbiology, 46(1), 19-27(2000).

8) H. Akimoto, T. Kushima, and T. Nakamura, and K. Ohta, Transcriptional analysis of two endoinulinase genes *inuA* and *inuB* in *Aspergillus niger*, Journal of Bioscience and Bioengineering, 88(6), 599-604 (1999).

9) H. Akimoto, N. Kiyota, T. Kushima, and T. Nakamura, and K. Ohta, Molecular cloning, characterization and phylogentic analysis of an endoinulinase gene from *Penicillium* sp. strain TN-88（投稿準備中）

②出願特許

1) 発表者　小川喜八郎、オムマサバ　エー.クリスピナス、吉田直人、井上順一、仮屋勲一

2) 出願人　阪急バイオインダストリー（株）、協和化成（株）

3) 発明の名称　キトサナーゼ

4) 特許番号　特願平１１－２５０７１１

5) 種類名　特許願

6) 出願日　平成１１年９月３日

③その他

遺伝子登録(accession numbers)

A. niger inuA gene (AB012771)

A. niger inuB gene (AB012772)

関連研究

Zaita, N., Fukushige, T., Tokuda, M., Ohta, K., and Nakamura, T., Preparation and enzymatic properties of *Aspergillus niger* endoinulinase immobilized onto various polysaccharide supports, Food Science and Technology Research, 6(1) 1-6 (2000).