

研究論文

豆味噌のイソフラボンアグリコン生成に寄与する 麹菌 β -グルコシダーゼ遺伝子の同定

小野奈津子*1、安田(吉野)庄子*2、北本則行*3

Identification of β -Glucosidases from *Miso Koji* Mold, *Aspergillus oryzae*, Producing Isoflavone Aglycones in Soybean-*Miso*

Natsuko ONO*1, Shoko YOSHINO-YASUDA*2 and Noriyuki KITAMOTO*3

Food Research Center*1*2*3

味噌用麹の遺伝子発現量データを取得し、麹菌ゲノム情報から推定した 26 個の β -グルコシダーゼ関連遺伝子のうち、イソフラボンアグリコン生成に寄与する遺伝子候補を 10 個推定し、遺伝子破壊株を作製した。*AoCel3A* 遺伝子(AO090009000356)の破壊株で調製した豆麹では、 β -グルコシダーゼ活性が 80% 以上低下し、イソフラボンアグリコンが 30%以上減少した。この結果から *AoCel3A* 遺伝子は豆味噌のイソフラボンアグリコンの生成に寄与する遺伝子のひとつであることが示唆された。

1. はじめに

大豆や大豆加工食品に含まれるイソフラボン類は、エストロゲン様作用¹⁾、骨粗しょう症予防作用²⁾、抗酸化作用³⁾および抗ガン作用⁴⁾などの生理活性を示す成分として注目されている。味噌・醤油・テンペ等大豆発酵食品においては、原料大豆のイソフラボン配糖体(グリコシド)の一部または全部が β -グルコシダーゼによって糖が外され、ダイゼインやゲニステインなどのアグリコンに変換されている。変換されたアグリコンは元のグリコシドよりも顕著に高い生理活性を示す⁵⁾。愛知県を中心に生産されている豆味噌(八丁みそ・三州みそ・名古屋みそ等)では原料大豆由来のイソフラボングリコシドのほぼ 100%がアグリコンに変換されているとの報告がある^{6,7)}。当センターでも表 1 のように、県内 A 社の豆味噌と米味噌に含まれるイソフラボンを分析し、豆味噌からは配糖体であるダイジンとゲニステインは検出されず、それぞれのアグリコンであるダイゼインとゲニステインが多く検出されることを確認している。一方、米味噌からは配糖体型とアグリコン型の両方が検出されている。また表 2 のように、豆麹(豆味噌用の大豆麹)および米麹(米味噌用の米麹)に含まれる β -グルコシダーゼ活性を測定したところ、豆麹中の活性は米麹中の活性の 150 倍以上も高かった。これらのことから、豆味噌におけるイソフラボンのアグリコン変換率の高さは、麹菌 *Aspergillus oryzae* が大豆を基質として培養された際に

表 1 県内 A 社で製造された豆味噌と米味噌のイソフラボン分析値

	Isoflavone content (mg/100g wet)			
	Glucosides		Aglycones	
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
soybean-miso	ND	ND	29.2	29.3
rice-miso	7.6	9.8	8.5	9.7

ND, not detected.

表 2 豆麹と米麹の β -グルコシダーゼ活性

	β -Glucosidase activity (mU /g koji culture)
soybean-koji	616 $\pm$ 18
rice-koji	4 $\pm$ 1

Activity of two independent experiments is presented as average $\pm$ standard deviation.

産生する β -グルコシダーゼ群の働きに起因すると考えられるが、その詳細は明らかでない。そこで本研究では、分子生物学的手法を用いて、豆味噌のイソフラボンアグリコン生成に寄与する麹菌 β -グルコシダーゼ遺伝子の同定を試みた。

2. 実験方法

2.1 使用菌株および使用培地

遺伝子供与菌として味噌用麹菌 *A. oryzae* KBN630 株((株)ビオック)を使用した。形質転換用宿主として *A. oryzae* KBN630-P17L90 株(*ligD*⁻, *pyrG*⁻)⁸⁾を使用した。*E.coli* DH5 α を DNA 断片のクローニングに使用した。

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 *2 食品工業技術センター 保蔵包装技術室 *3 食品工業技術センター 保蔵包装技術室(現 至学館大学健康科学部)

A. oryzae の培養は Czapek 培地を基本とし、染色体 DNA 調製時には GP 培地を用いた。

2.2 味噌用豆麴および米麴の遺伝子発現量解析

A. oryzae KBN630 株を用いてフラスコスケールで味噌用豆麴および米麴を調製し、液体窒素冷却下で粉碎して RNA 調製に供した。豆麴 RNA の調製には TRIzol Reagent(Thermo Fisher Scientific)を、米麴 RNA の調製には RNAiso Plus および High-Salt Solution for Precipitation(Plant)(Takara Bio)を使用し、PureLink RNA Mini Kit(Thermo Fisher Scientific)で各 RNA を精製した。独立行政法人酒類総合研究所において cDNA 調製と断片化処理後、麴菌 DNA マイクロアレイ解析(Affimetrix)に供した。

2.3 *A. oryzae* 染色体 DNA の調製および PCR

A. oryzae の染色体 DNA は、菌体を凍結乾燥した後粉碎し、フェノール・クロロホルム法で調製した。PCR 用酵素は Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent) および SapphireAmp Fast PCR Master Mix(Takara Bio)を使用した。使用したオリゴヌクレオチドプライマーを表 3 に示した。

2.4 遺伝子破壊株の作製

遺伝子破壊用ベクターは次のように構築した。*A. oryzae* RIB40 株のゲノム情報⁹⁾から、表 3 の 5'-隣接領域 1.0kb 増幅用プライマー P1/P2 および 3'-隣接領域 1.0kb 増幅用プライマー P3/P4 を合成した。形質転換マーカー *pyrG* 遺伝子断片増幅用のプライマーは、*pyrGN2/pyrGC2* を使用した⁸⁾。*A. oryzae* KBN630 株

表 3 本研究で使用したオリゴヌクレオチドプライマー

Gene name	Primers	Sequence (5' to 3')	Direction
<i>AoCel1A</i>	AoCel1A-1	CGGTACCCGGGGATCGAGCTACATGTTGGTGCTAAG	Forward
	AoCel1A-2	TTCCAGCAGGCCTTGTGTCGAGGAAGCTCTCTCTATTG	Reverse
	AoCel1A-3	ATTGATCAGGCCTTTGCGCAAAAGATGTCTCGCAAG	Forward
	AoCel1A-4	ATGCTTGCAGGTCGACAAACCGGCATAGCTTCACTTAG	Reverse
<i>AoCel3A</i>	AoCel3A-1	CGGTACCCGGGGATCGAGACACCAAGCAAGGAATACATC	Forward
	AoCel3A-2	TTCCAGCAGGCCTTGGCGCAAAAGTACACCGGTG	Reverse
	AoCel3A-3	ATTGATCAGGCCTTTGCGACTCAGGAGAAGGCTATC	Forward
	AoCel3A-4	ATGCTTGCAGGTCGACCAAGTTTGCAGGTACGAC	Reverse
<i>AoCel3D</i>	AoCel3D-1	CGGTACCCGGGGATCGGTGCTGCTGAGTGTAGTGATG	Forward
	AoCel3D-2	TTCCAGCAGGCCTTGTGCTGAGTACCGAACCAGTCACTC	Reverse
	AoCel3D-3	ATTGATCAGGCCTTTATGGGAACCGAGGGCTAC	Forward
	AoCel3D-4	ATGCTTGCAGGTCGATCCGCTGCGAAGACTCTTAG	Reverse
<i>AoCel3E</i>	AoCel3E-1	CGGTACCCGGGGATCGGGAGTATCACCAGATAGGAATG	Forward
	AoCel3E-2	TTCCAGCAGGCCTTGTGCTGATCTTGTGTAGGACGTATC	Reverse
	AoCel3E-3	ATTGATCAGGCCTTTGTACACTTTGGTGGCGGTG	Forward
	AoCel3E-4	ATGCTTGCAGGTCGACCCCCACAGCAATTAAAGTAAAG	Reverse
<i>AoCel3F</i>	AoCel3F-1	CGGTACCCGGGGATCAGGAAGCTCTGCTGAATCCAG	Forward
	AoCel3F-2	TTCCAGCAGGCCTTGTAGATCCCAAGTGTCTTGAC	Reverse
	AoCel3F-3	ATTGATCAGGCCTTTGCTGGAGCAACGACCAATC	Forward
	AoCel3F-4	ATGCTTGCAGGTCGACCAAGGCTAATCTCTCAATCAC	Reverse
<i>AoCel3G</i>	AoCel3G-1	CGGTACCCGGGGATCTGGGCTGACTAATGGACTGATG	Forward
	AoCel3G-2	TTCCAGCAGGCCTTGCATGCGCATCGTATTCATATCCTTC	Reverse
	AoCel3G-3	ATTGATCAGGCCTTTGTAGTGAAGGTGGGCATGGTC	Forward
	AoCel3G-4	ATGCTTGCAGGTCGACCTTTATATACGTTGGTCTCGGAG	Reverse
<i>AoCel3I</i>	AoCel3I-1	CGGTACCCGGGGATCGTTGCTGCTCAGCAGCTGGTGTG	Forward
	AoCel3I-2	TTCCAGCAGGCCTTGTAGACTTCATGCAATACCGCCTC	Reverse
	AoCel3I-3	ATTGATCAGGCCTTTGTAGTGAAGGTGGGCATGGTC	Forward
	AoCel3I-4	ATGCTTGCAGGTCGATCGTATACCGGCTACTCGAATC	Reverse
<i>AoCel3L</i>	AoCel3L-1	CGGTACCCGGGGATCTGCCATGGTGGATGATAC	Forward
	AoCel3L-2	TTCCAGCAGGCCTTGTAGGATTCATGATGAGCTTG	Reverse
	AoCel3L-3	ATTGATCAGGCCTTTATCTGCTTACACAATCCCTCAC	Forward
	AoCel3L-4	ATGCTTGCAGGTCGATTTGAAGATGGCGGATTC	Reverse
<i>AoCel3N</i>	AoCel3N-1	CGGTACCCGGGGATCTTCCATGCTGATTATTCATTGTC	Forward
	AoCel3N-2	TTCCAGCAGGCCTTGTACTCAGGCAAGCATGTCATC	Reverse
	AoCel3N-3	ATTGATCAGGCCTTTGGTGGAGAATTGGAACGAAG	Forward
	AoCel3N-4	ATGCTTGCAGGTCGACCATTTGACATGTGCTCGTATATG	Reverse
<i>AoCel3O</i>	AoCel3O-1	CGGTACCCGGGGATCGATTGGCTCATCCAGGGTC	Forward
	AoCel3O-2	TTCCAGCAGGCCTTGAACACCTCATGCAAGGCAC	Reverse
	AoCel3O-3	ATTGATCAGGCCTTTGATTGATCTCCACAGGCGTG	Forward
	AoCel3O-4	ATGCTTGCAGGTCGACATGGTGACCTCGCTAGTGTG	Reverse

の染色体 DNA を鋳型とする PCR により得られた 3 つの増幅断片を、In-Fusion HD Cloning Kit(Clontech)を用いて pUC18 の *Bam*HI /*Sal*I 制限サイトに組込んだ。このプラスミドを鋳型として、プライマー P1/P4 を用いた PCR により遺伝子破壊用 DNA 断片を増幅し、*A. oryzae* KBN630-P17L90 株をプロトプラスト-PEG 法により形質転換した。遺伝子破壊の確認は、形質転換体の染色体 DNA をテンプレートとしてプライマー P1/P4 を用いた PCR を行った。

2.5 遺伝子破壊株評価用の豆麴の調製

2.4 で作製した遺伝子破壊株及び対照として親株の *A. oryzae* KBN630 株を Czapek 寒天培地一面に植菌し孢子を形成させた。北海道産大豆を約 1.7 倍の重量になるまで水に浸漬し、オートクレーブを用いて蒸煮(100℃ 30 分間、その後に 121℃5 分間)した。蒸煮大豆を直径 10mm、長さ 30mm の玉型に成形し、フラスコに入れ、121℃5 分間滅菌した。玉型の蒸煮大豆 30g、乾熱滅菌した香煎 0.3g、麴菌孢子(寒天培地 1cm 角相当)を混合し 67 時間製麴した。

2.6 豆麴の酵素活性測定

豆麴を凍結乾燥し、粉碎した粉末に 0.01%Tween80-0.5%NaCl 溶液を加え、20℃で 2 時間振とう抽出し、遠心分離して得られた上清を酵素液として分析に供した。 β -グルコシダーゼ活性は Esaki ら¹⁰⁾の方法を若干変更し、*p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを基質として 40℃で 30 分間反応させて行った。 α -アミラーゼ活性は、 α -アミラーゼ測定キット(キッコーマンバイオケミファ(株))を用い測定した。

2.7 豆麴中のイソフラボン組成の分析

江崎ら¹¹⁾の方法を若干変更して、豆麴を凍結乾燥し、粉碎した粉末に 70%エタノールを加え、20℃で 16 時間振とう抽出し、遠心分離して得られた上清を HPLC によるイソフラボン組成の分析に供した。HPLC による分析は厚生労働省の食安発第 0823001 号別紙の食品中の大豆イソフラボンアグリコン(アグリコン当量)の試験方法¹²⁾に従って行った。

3. 実験結果及び考察

3.1 味噌用豆麴および米麴の遺伝子発現量解析

2.2 に示した方法で、味噌用豆麴および米麴における麴菌の遺伝子発現量を網羅的に解析した。得られた遺伝子発現量データを活用することにより、目的の遺伝子が各麴中でどの程度働いているかを推定できる。表 4 に示すように、麴菌ゲノム情報から 26 個の β -グルコシダーゼ関連遺伝子を推定し、豆麴中の発現量(シグナル強度)の大きい順に並べた。「豆味噌のイソフラボンアグリコ

表 4 麹菌が有する 26 個の推定 β -グルコシダーゼ関連遺伝子の発現量

Gene name	Gene ID (AspGD ⁹⁾)	Signal intensity	
		Soybean- <i>kōji</i>	Rice- <i>kōji</i>
<i>AoCel1A</i>	AO090003000497	8760	628
<i>AoCel3A</i>	AO090009000356	7215	1065
<i>AoCel3B</i>	AO090103000120	6374	14
<i>AoCel1B</i>	AO090113000148	5559	14
<i>AoCel3C</i>	AO090012000135	4467	14
<i>AoCel3D</i>	AO090701000244	3661	398
<i>AoCel3E</i>	AO090166000090	3640	157
<i>AoCel3F</i>	AO090701000274	3490	246
<i>AoCel3G</i>	AO090003000741	1841	1158
<i>AoCel3H</i>	AO090011000140	1424	26
<i>AoCel1C</i>	AO090120000075	951	48
<i>AoCel3I</i>	AO090005000337	832	251
<i>AoCel3J</i>	AO090701000841	725	1
<i>AoCel3K</i>	AO090038000223	559	22
<i>AoCel3L</i>	AO090001000544	523	185
<i>AoCel3M</i>	AO090026000123	261	2
<i>AoCel3N</i>	AO090103000019	255	433
<i>AoCel3O</i>	AO090009000554	242	381
<i>AoCel3P</i>	AO090003001511	69	10
<i>AoCel3Q</i>	AO090010000034	25	26
<i>AoCel3S</i>	AO080521000341*	15	20
<i>AoCel3T</i>	AO090001000266	9	99
<i>AoCel3U</i>	AO090103000127	9	6
<i>AoCel3V</i>	AO090166000048	6	6
<i>AoCel3W</i>	AO090012000003	5	2
<i>AoCel3X</i>	AO090038000425	5	26

AoCel1 group ; Glycoside Hydrolase Family 1

AoCel3 group ; Glycoside Hydrolase Family 3

*CAoGD¹³⁾による

ン生成に寄与する遺伝子は、豆麹で発現量が高く、米麹でも一定の発現量が見られるもの」と仮定し、網掛けで示した 10 個の遺伝子(*AoCel1A*, *AoCel3A*, *AoCel3D*, *AoCel3E*, *AoCel3F*, *AoCel3G*, *AoCel3I*, *AoCel3L*, *AoCel3N*, *AoCel3O*)を次の試験候補として選定した。

3.2 遺伝子破壊株の作製

3.1 で選定した 10 個の β -グルコシダーゼ関連遺伝子について、2.4 の方法で破壊株を作製した。PCR による確認を行った結果(図 1)、 Δ AoCel3A(Δ AoCel3A は *AoCel3A* 遺伝子破壊株)から Δ AoCel3O の 10 株ではいずれも目的遺伝子のバンドのみがシフトしており、目的の遺伝子破壊株であることが示された。P1 プライマーの更に上流で作製した P5 プライマーと P4 プライマーの PCR によっても確認した(データ省略)。

3.3 遺伝子破壊株を用いたフラスコ豆麹の酵素活性

3.2 で得られた 10 株の遺伝子破壊株および親株を用いてフラスコスケールで豆麹を調製し、 β -グルコシダーゼ活性および α -アミラーゼ活性を測定した(表 5)。 β -グルコシダーゼ活性は、 Δ AoCel3A で親株の 16%と大きく低下し、その他の 9 株の遺伝子破壊株ではほとんど低下しなかった。この結果から、*AoCel3A* 遺伝子は豆麹中の主要な「*p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシドを

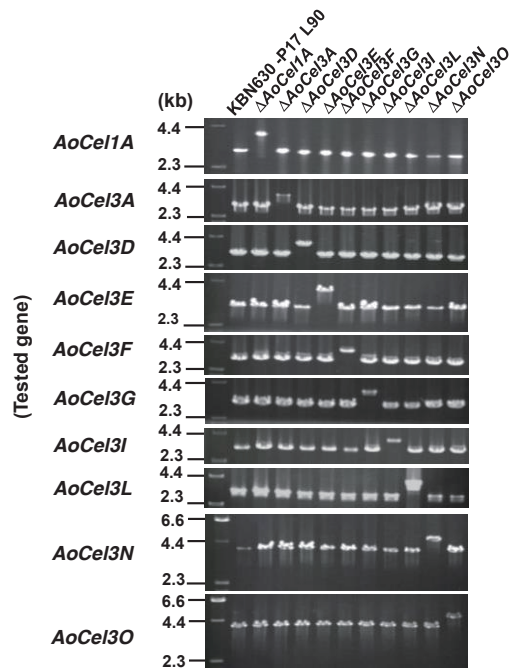


図 1 PCR による遺伝子破壊の確認

表 5 遺伝子破壊株を用いたフラスコ豆麹の酵素活性

Strain	Enzyme activity (units/g <i>kōji</i>) (% of control)	
	β -Glucosidase	α -Amylase
Δ AoCel1A	2.6 $\pm$ 0.1 (113)	1,180 $\pm$ 111 (109)
Δ AoCel3A	0.4 $\pm$ 0.0 (16)	1,250 $\pm$ 48 (115)
Δ AoCel3D	3.7 $\pm$ 0.0 (164)	1,020 $\pm$ 8 (94)
Δ AoCel3E	2.5 $\pm$ 0.0 (111)	1,050 $\pm$ 32 (96)
Δ AoCel3F	2.6 $\pm$ 0.4 (114)	1,050 $\pm$ 105 (97)
Δ AoCel3G	2.4 $\pm$ 0.1 (105)	1,170 $\pm$ 66 (107)
Δ AoCel3I	2.6 $\pm$ 0.3 (112)	1,040 $\pm$ 108 (96)
Δ AoCel3L	3.0 $\pm$ 0.8 (133)	1,040 $\pm$ 177 (96)
Δ AoCel3N	2.1 $\pm$ 0.1 (91)	1,060 $\pm$ 90 (97)
Δ AoCel3O	2.3 $\pm$ 0.0 (101)	987 $\pm$ 92 (91)
KBN630	2.3 $\pm$ 0.1 (100)	1,090 $\pm$ 35 (100)

基質とする β -グルコシダーゼ活性」を担う遺伝子であることが示唆された。 α -アミラーゼ活性は、10 株の遺伝子破壊株と親株でほとんど差がなかったことから、選定した遺伝子の破壊は豆麹の α -アミラーゼ活性にほとんど影響を与えないことが示唆された。

3.4 遺伝子破壊株を用いた豆麹のイソフラボン組成

次に各豆麹のイソフラボン組成を分析した(表 6)。 Δ AoCel3A において、配糖体であるダイジンが親株に対して 196%、同じく配糖体であるゲニスチンが 181%と増加した。更に、アグリコンであるダイゼインが 72%、同じくアグリコンであるゲニステインが 60%に減少した。 Δ AoCel3N では配糖体型イソフラボンが約 140%に増加したがアグリコン型イソフラボンは減少しなかった。その他の 8 株の遺伝子破壊株においては、いずれも大きな変化は認められなかった。この結果から、豆麹中では

表 6 遺伝子破壊株を用いた豆麴のイソフラボン組成

Strain	Isoflavone content (mg/100g koji) (% of control)			
	Glucosides		Aglycones	
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
Δ AoCel1A	32 $\pm$ 5 (87)	43 $\pm$ 6 (106)	23 $\pm$ 1 (108)	12 $\pm$ 1 (115)
Δ AoCel3A	71 $\pm$ 0 (196)	70 $\pm$ 0 (181)	15 $\pm$ 1 (72)	6 $\pm$ 1 (60)
Δ AoCel3D	23 $\pm$ 1 (62)	32 $\pm$ 2 (83)	23 $\pm$ 0 (108)	12 $\pm$ 0 (116)
Δ AoCel3E	29 $\pm$ 2 (79)	39 $\pm$ 3 (102)	19 $\pm$ 0 (90)	10 $\pm$ 0 (96)
Δ AoCel3F	34 $\pm$ 8 (93)	46 $\pm$ 8 (118)	24 $\pm$ 1 (111)	11 $\pm$ 0 (110)
Δ AoCel3G	37 $\pm$ 6 (103)	46 $\pm$ 5 (120)	23 $\pm$ 1 (108)	11 $\pm$ 0 (108)
Δ AoCel3I	30 $\pm$ 1 (83)	41 $\pm$ 4 (106)	22 $\pm$ 0 (104)	11 $\pm$ 0 (109)
Δ AoCel3L	32 $\pm$ 8 (87)	36 $\pm$ 8 (93)	22 $\pm$ 2 (105)	10 $\pm$ 1 (102)
Δ AoCel3N	53 $\pm$ 4 (145)	53 $\pm$ 4 (138)	21 $\pm$ 2 (101)	11 $\pm$ 0 (107)
Δ AoCel3O	37 $\pm$ 9 (101)	41 $\pm$ 10 (106)	23 $\pm$ 0 (110)	12 $\pm$ 1 (114)
KBN630	37 $\pm$ 6 (100)	39 $\pm$ 4 (100)	21 $\pm$ 2 (100)	10 $\pm$ 0 (100)

Activity of two independent experiments is presented as average $\pm$ standard deviation.

AoCel3A 遺伝子産物が配糖体であるダイジンおよびゲニステインに変換する働きを担っていることが示唆された。ただし、アグリコンの減少は約 30~40%に留まっていたことから、*AoCel3A* 遺伝子以外にも他の遺伝子産物が両イソフラボンのアグリコン化に寄与する可能性が示された。すなわち Δ *AoCel3A* において他の β -グルコシダーゼ関連遺伝子の発現量が上がり補完的に働いている可能性、あるいは 8 遺伝子以外の別の遺伝子が別途働いている可能性の両方が考えられる。

4. 結び

本研究の結果は、以下のとおりである。

- (1) 味噌用豆麴および米麴の遺伝子発現量データを取得し、麴菌ゲノム情報から推定した 26 個の β -グルコシダーゼ関連遺伝子のうち、イソフラボンアグリコン生成に寄与する遺伝子候補を 10 個推定した。
- (2) (1)で選定した遺伝子の破壊株を作製し、PCR による遺伝子破壊の確認を行った。
- (3) *AoCel3A* 遺伝子(AO090009000356)の破壊株で調製した豆麴では、 β -グルコシダーゼ活性が 80%以上低下し、イソフラボンアグリコン(ダイゼインおよびゲニステイン)が 30%以上減少した。この結果から *AoCel3A* 遺伝子は豆味噌のイソフラボンアグリコンの生成に寄与する遺伝子のひとつであることが示唆された。

謝辞

本研究の実施に当たって、麴菌 DNA マイクロアレイ解析にご協力頂いた独立行政法人酒類総合研究所の岩下和裕博士および研究所の皆様にお礼申し上げます。味噌用麴の作製方法をご教示下さった(株)ビオックの和久豊博士と社員の皆様に感謝します。

付記

本研究は、公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団の平成 28 年度研究助成を受けて実施した。

文献

- 1) Potter, SM., Baum, JA., Teng, H., Stillman, RJ., Shay, NF., Erdman Jr, JW: *Am J Clin Nutr.*, **68**(6), 1375S(1998)
- 2) Uesugi, S., Watanabe, S., Ishiwata, N., Uehara, M., Ouchi, K: *Biofactors.*, **22**(1-4), 221(2004)
- 3) 池田稔子, 太田直一, 渡辺忠雄: 日本食品科学工学会誌, **42**(5), 322(1995)
- 4) 清澤功: 日本醸造協会誌, **94**(8), 620(1999)
- 5) Izumi, T., Piskula, MK., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., Kikuchi, M: *J Nutr.*, **130**(7), 1695(2000)
- 6) 畑中咲子, 毛利哲, 高橋清, 山田勝男: 日本醸造協会誌, **103**(12), 922(2008)
- 7) 前河裕一, 熊取厚志, 長村洋一: 生物試料分析, **35**(4), 316(2012)
- 8) 安田(吉野)庄子, 増田裕一郎, 加藤雅士, 小野奈津子, 長谷川撰, 北本則行: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **2**, 88(2013)
- 9) The *Aspergillus* Genome Database (AspGD): <http://www.aspergillusgenome.org/>(2021/06/10)
- 10) Esaki, H., Watanebe, R., Onozaki, H., Kawakishi, S., Osawa, T: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(5), 851(1999)
- 11) 江崎秀男, 川岸舜朗, 井上昂, 大澤俊彦: 日本食品科学工学会誌, **48**(1), 51(2001)
- 12) 厚生労働省: 食安発第 0823001 号(2006)
- 13) NRIB: Comprehensive *Aspergillus oryzae* Genome Database(CAoGD):<https://nrif21.nrrib.go.jp/CAoGD/prj.cgi?prj=02201>(2021/06/14)