

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

NZYM-S0 株を利用して生産された α -アミラーゼ

2015年3月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

	頁
<審議の経緯>.....	3
<食品安全委員会委員名簿>.....	3
<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>.....	3
要 約.....	4
Ⅰ. 評価対象添加物の概要.....	5
Ⅱ. 食品健康影響評価.....	5
第1 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに 遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違.....	5
1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料.....	5
2 宿主及び導入 DNA.....	6
3 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料.....	6
4 宿主の構成成分等に関する資料.....	6
5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料.....	6
6 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加 物及び組換え体と宿主等の相違点.....	7
第2 宿主に関する事項.....	7
1 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項.....	7
2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項.....	7
3 寄生性及び定着性に関する事項.....	7
4 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項.....	7
5 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項.....	7
第3 ベクターに関する事項.....	8
1 名称及び由来に関する事項.....	8
2 性質に関する事項.....	8
第4 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項.....	8
1 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	8
2 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカを含む。）及びその遺伝子産物 の性質に関する事項.....	8
3 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカ遺伝子の発現に関わる領域に関する 事項.....	10
4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	11
5 構築された発現ベクターに関する事項.....	11
6 DNA の宿主への導入方法に関する事項.....	12
7 抗生物質耐性マーカ遺伝子の安全性に関する事項.....	12
第5 組換え体に関する事項.....	12
1 宿主との差異に関する事項.....	12
2 遺伝子導入に関する事項.....	12
第6 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項.....	12

1	添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること	12
2	添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること	12
第7	遺伝子組換え添加物に関する事項	12
1	諸外国における認可、食用等に関する事項	12
2	組換え体の残存に関する事項	13
3	製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	13
4	精製方法及びその効果に関する事項	13
5	含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項	13
第8	第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項	13
Ⅲ.	食品健康影響評価結果	13
<参照>		14

<審議の経緯>

2014年12月9日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安1209第1号）、関係書類の接受

2014年12月16日 第542回食品安全委員会（要請事項説明）

2015年1月22日 第134回遺伝子組換え食品等専門調査会

2015年3月3日 第551回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

熊谷 進（委員長）

佐藤 洋（委員長代理）

山添 康（委員長代理）

三森国敏（委員長代理）

石井克枝

上安平冽子

村田容常

<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>

澤田純一（座長）

小関良宏（座長代理）

宇理須厚雄 手島玲子

岡田由美子 中島春紫

橘田和美 飯 哲夫

児玉浩明 和久井信

近藤一成

要 約

「NZYM-SO 株を利用して生産された α -アミラーゼ」について、申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、 α -アミラーゼの品質を高めるために、*Bacillus subtilis* A164 Δ 5 株を宿主として、*Geobacillus stearothermophilus* C599 株由来の改変 α -アミラーゼ遺伝子を導入して作製した NZYM-SO 株を利用して生産された α -アミラーゼである。本添加物は、グルコース重合体の α -1,4-結合を加水分解し、主にマルトースを生成させる酵素であり、パンの老化防止及びハイマルトースシロップ等のデンプン糖の製造に使用される。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性等について確認した結果、従来の添加物と比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「NZYM-SO 株を利用して生産された α -アミラーゼ」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象添加物の概要

品 目：NZYM-SO 株を利用して生産された α -アミラーゼ

用 途：グルコース重合体の α -1,4 結合の加水分解を触媒し、主にマルトースを生成させる酵素である。パンの老化防止及びハイマルトースシロップ等のデンプン糖の製造に使用される。

申請者：ノボザイムズ ジャパン株式会社

開発者：Novozymes A/S (デンマーク)

本添加物は、 α -アミラーゼの品質を高めるために、*Bacillus subtilis* A164 Δ 5 株を宿主として、*Geobacillus stearothermophilus* C599 株由来の改変 α -アミラーゼ遺伝子 (*amyM447* 遺伝子) を導入して作製した NZYM-SO 株を利用して生産された α -アミラーゼである。

II. 食品健康影響評価

第 1 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違

1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 名称、基原及び有効成分

従来の添加物の名称、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名 称：TS-25

基 原：*Geobacillus stearothermophilus* C599 株

有効成分： α -アミラーゼ

(2) 製造方法

TS-25 は、*G. stearothermophilus* C599 株を生産菌として用い、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、2 回の除菌ろ過により、分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

TS-25 は、グルコース重合体の α -1,4-結合をエンド型で加水分解し、主にマルトースを生成させる酵素である。パンの老化防止のためパン生地に添加されたり、デンプンからマルトースやハイマルトースシロップ等のデンプン糖を製造するために用いられる。

(4) 摂取量

TS-25 は、製パンやデンプン糖の製造工程でパン生地やデンプンに添加されるが、最終段階で高温により失活する。一日最大摂取量は 0.006 mg TOS (Total Organic Solids)/ kg 体重/日である (参照 1)。

2 宿主及び導入 DNA

(1) 宿主の種名（学名）、株名等及び由来

宿主は、*B. subtilis* A164Δ5 株である。*B. subtilis* A 164Δ5 株は、American Type Culture Collection (ATCC) から入手した *B. subtilis* ATCC6051a 株から アミラーゼ (*amyE*) 遺伝子、アルカリプロテアーゼ (*aprE*) 遺伝子、中性プロテアーゼ (*nprE*) 遺伝子、シグマ F (*spoIIAC*) 遺伝子及びサーファクチン C (*srfAC*) 遺伝子を欠失させた株である（参照 2）。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

amyM447 遺伝子の供与体は、*G. stearothermophilus* C599 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

amyM447 遺伝子は、*G. stearothermophilus* C599 株由来の *amyM* 遺伝子に塩基変異を導入し、アミノ酸残基が 3 個置換した α -アミラーゼを発現する。遺伝子導入用ベクターに組み込まれた後、二重交差相同組換えにより宿主の染色体に挿入された。

3 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料

B. subtilis は、長期にわたり食品や食品製造用酵素の製造に安全に使用されてきた経験がある。

4 宿主の構成成分等に関する資料

B. subtilis が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル 1 に相当する（参照 3）。

5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 製品名及び有効成分

本添加物の製品名及び有効成分は以下のとおりである。

製品名：NM447

有効成分： α -アミラーゼ

(2) 製造方法

NM447 は、NZYM-SO 株を生産菌として製造される。製造方法は、従来の添加物と基本的に同様であり、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。

生産菌は 2 回の除菌ろ過により、分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

NM447 は、従来の添加物と同様に製パンやデンプン糖の製造において使用され、用途及び使用形態は、従来の添加物と変わらない。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

NM447 は、従来の添加物と同じ反応を触媒する酵素であるが、耐熱性が向上している。

6 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

NM447 と従来の添加物との相違点は、アミノ酸残基が 3 個置換され、従来の添加物と比較して耐熱性が向上している点である。

(2) 組換え体と宿主

NZYM-SO 株と宿主との相違点は、NZYM-SO 株には *amyM447* 遺伝子が導入され、 α -アミラーゼ産生性を獲得している点である。

以上 1～6 より、本添加物及び本添加物の生産菌の比較対象となり得る従来の添加物及び宿主があると判断し、第 2 以下の各事項について評価を行った。

第 2 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主は *B. subtilis* A 164 Δ 5 株である。

B. subtilis は、広く自然界に存在し、食品製造用酵素の生産菌として数多くの利用経験があり、ヒトは納豆等の食品を通じて多くの食経験がある。*B. subtilis* A164 Δ 5 株を宿主として作製された菌株は、酵素生産に長年の使用実績がある。

また、経済開発協力機構（OECD）において、優良工業製造規範（GILSP）が適用できる宿主微生物として認定されている。

2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

B. subtilis が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル 1 に相当する（参照 3）。

3 寄生性及び定着性に関する事項

B. subtilis が腸管内に定着することは知られておらず、ヒトは納豆等の食品を通じた食経験を有することから、安全上問題はないと考えられる。

4 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

B. subtilis は、病原性の外来因子の存在を示唆する事実は認められていない。

5 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

B. subtilis の近縁種である *Bacillus cereus* 及び *Bacillus anthracis* は、毒性物質を産生することが知られているが、*B. subtilis* とは明確に区別されている。

第3 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

遺伝子導入用ベクターpNBT24 amyM447の作製には、プラスミドpDG268が用いられた。

2 性質に関する事項

(1) DNAの塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミドpDG268の塩基数及び塩基配列は明らかになっている(参照4)。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミドpDG268の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミドpDG268の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性に関する事項

プラスミドpDG268にはアンピシリン耐性遺伝子及びクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれている。なお、アンピシリン耐性遺伝子は宿主の染色体に導入されない。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子は宿主に導入された後部分欠失され、薬剤耐性の機能が失われる。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミドpDG268には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(6) 宿主依存性に関する事項

プラスミドpDG268の複製開始配列は、*E. coli*で機能する。

第4 挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1 挿入DNAの供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

amyM447遺伝子の供与体は*G. stearothermophilus* C599株である。

(2) 安全性に関する事項

*G. stearothermophilus*は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない。また、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル1に相当する(参照3)。

2 挿入DNA又は遺伝子(抗生物質耐性マーカを含む。)及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

amyM447 遺伝子は、*G. stearothermophilus* C599 株の α -アミラーゼ (*amyM*) 遺伝子の塩基配列に基づき成熟型タンパク質をコードする領域をクローニングした後、耐熱性を高めるために塩基変異を導入し、人工合成した遺伝子である。従来の α -アミラーゼと比較して、3 個のアミノ酸が置換されている。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入 DNA の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

amyM447 遺伝子が発現する α -アミラーゼは、グルコース重合体の α -1,4-結合を加水分解し、主にマルトースを生成させる酵素である。従来の添加物と比較して、耐熱性が向上している。

NM447 は、従来の α -アミラーゼと同様の反応を触媒する酵素であるが、アミノ酸配列が改変され耐熱性が向上していることから、アレルギー誘発性について「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準」（平成 20 年 6 月 28 日食品安全委員会決定）の第 2 章第 5 の 5 に準じて、検討された。

1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

G. stearothermophilus のアレルギー誘発性に関する報告はない。

2) 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見

NM447 を有効成分とする酵素製剤及び *G. stearothermophilus* 由来の α -アミラーゼについて、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。

3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見

①人工胃液に対する感受性

NM447 の人工胃液中での消化性について確認するために SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 5）。

②人工腸液に対する感受性

NM447 の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 360 分後においても消化されないことが確認された（参照 5）。

③加熱処理に対する感受性

NM447 の加熱による免疫反応性の変化を ELISA 法を用いて分析した結果、pH7.0、90°Cの加熱処理により、基質非存在下では 15 分間、基質存在下では 30 分間で免疫反応性が消失することが確認された（参

照 6)。

4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見

NM447 と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^aを用いて相同検索を行った結果、*Aspergillus oryzae*由来のTAKAアミラーゼと連続する80アミノ酸配列について35%以上の相同性が示された(参照7)。そのため、TAKAアミラーゼとNM447及びTS-25(従来の添加物)のアミノ酸配列を比較した結果、NM447に導入された3個のアミノ酸置換は、TAKAアミラーゼとTS-25との間にみられた相同性には影響していないと考えられた(参照8)。

また、抗原決定基の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^aを用いて相同検索を行った結果、連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった(参照7)。

以上のことから総合的に判断し、NM447にはアレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

3 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

amyM447 遺伝子のプロモーターは、*Bacillus amyloliquefaciens* WR28 株由来の *amyQ* 遺伝子のプロモーター配列に変異を導入した *amyQsc* プロモーターである(参照9)。

(2) ターミネーターに関する事項

amyM447 遺伝子のターミネーターは、*G. stearothermophilus* C599 株由来の *amyM* 遺伝子のターミネーター配列である。

(3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること

目的遺伝子の翻訳に必要な *G. stearothermophilus* C599 株由来の *amyM* 遺伝子の SD 配列及び mRNA を安定化させるため *B. thuringiensis ssp. tenebrionis* DSM5526 株由来の *cry3A* mRNA 安定化配列を付加した。*cry3A* mRNA 安定化配列は、殺虫活性を示すタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域に存在する配列であり、タンパク質をコードする領域は含まれない。

^a ネブラスカ大学アレルゲンデータベースに登録された 1471 種及び WHO/IUIS Allergen Nomenclature のアレルゲンデータベースに登録された 718 種を含むデータベース

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pDG268 に、pUB110 に由来するカナマイシン耐性遺伝子を組み込み、*amyE5'* 及び *amyE3'* 配列の間に、プロモーター配列、*cry3A* mRNA 安定化配列、SD 配列、*amyM447* 遺伝子及びターミネーター配列を挿入することによって、遺伝子導入用ベクター pNBT24 *amyM447* が作製された。

5 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

遺伝子導入用ベクター pNBT24 *amyM447* の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

遺伝子導入用ベクター pNBT24 *amyM447* の *amyE* 遺伝子 5'末端側領域 (*amyE5'*) 及び *amyE* 遺伝子 3'末端側領域 (*amyE3'*) に挟まれた領域のみが宿主の *amyE* 遺伝子座に挿入される。最終的に宿主に導入される *amyM447* 遺伝子発現カセット、*amyE5'* 及び *amyE3'* を含む断片 (合計 5,434 bp) について、六つの読み枠においてオープンリーディングフレーム (ORF) 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 96 個見いだされた。

これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^aを用いて相同性検索を行った。その結果、*amyM447* 遺伝子の ORF と 80 アミノ酸で 35%以上の相同性は、第 4-2-(3)-4)で既に述べた TAKA アミラーゼ以外は見いだされなかった (参照 7)。

さらに、これらの ORF と既知の毒素タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDB データベース (参照 10) を用いて E-value<0.2 を指標として検索を行った。その結果、NM447 を含む ORF と相同性を示す 5 個のタンパク質が検出されたが、いずれもそれ自体毒性を有するものではないと考えられた (参照 11)。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

意図する挿入領域は、遺伝子導入用ベクター pNBT24 *amyM447* の *amyE5'* 及び *amyE3'* 配列に挟まれた *amyM447* 遺伝子発現カセットとクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む領域である。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

遺伝子導入用ベクター pNBT24 *amyM447* は、目的外の遺伝子の混入がないように構築されている。

6 DNAの宿主への導入方法に関する事項

相同組換えにより *amyM447* 遺伝子を *B. subtilis* A164Δ5 株に導入し、クロラムフェニコール耐性及び α-アミラーゼ活性により選抜した。さらに、クロラムフェニコール耐性遺伝子を欠失させ、*B. subtilis* NZYM-SO 株を得た。

7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

遺伝子導入用ベクター pNBT24 *amyM447* には、アンピシリン耐性遺伝子及びカナマイシン耐性遺伝子が存在するが、宿主の染色体には導入されない。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子は宿主に導入された後部分欠失させるため、生産菌はクロラムフェニコール耐性を示さない。

第5 組換え体に関する事項

1 宿主との差異に関する事項

B. subtilis NZYM-SO 株は、NM447 を生産する点で宿主と異なる。

2 遺伝子導入に関する事項

(1) 制限酵素による切断地図に関する事項

B. subtilis NZYM-SO 株に導入された DNA 断片の塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている（参照 12）。

(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

B. subtilis NZYM-SO 株に挿入された *amyM447* 遺伝子発現カセット、*amyE5'* 及び *amyE3'* を含む断片のオープンリーディングフレーム検索の結果は、第 4-5-(2) のとおりである。

第6 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

1 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること

NM447 の製造原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、また、本製品の製品規格は、JECFA 及び Food Chemical Codex の食品酵素規格に適合していることから、有害性はないと考えられる。

2 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること

NM447 の製造原料は、食品又は食品添加物製造用として一般的に用いられているものを使用し、製造器材は従来から食品用酵素剤の製造に用いられているものを使用する。

第7 遺伝子組換え添加物に関する事項

1 諸外国における認可、食用等に関する事項

NM447 は、2009 年から欧州において販売されている。そのほか、オーストラリア及び米国においても食品添加物として認められており、製パン・製菓用及びデンプン糖製造用酵素として使用されている。

2 組換え体の残存に関する事項

ドットプロット分析により、最終製品である NM447 を有効成分とする酵素製剤には組換え DNA が残存していないことが確認された（参照 13）。

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

NM447 は、JECFA の食品用酵素の規格値及び Food Chemical Codex の規定値を満たしている。また、製造原料は食品原料又は食品への使用が認められた品質のものが用いられ、安全性に問題のある非有効成分が含まれるとは考えにくい。

4 精製方法及びその効果に関する事項

NM447 の精製は、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の工程で行われ、安全性に問題のある物質が混入することは考えにくい。

5 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項

NM447 の製造原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、有害性はないと考えられる。

第 8 第 2 から第 7 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第 2 から第 7 までの事項により安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「NZYM-SO 株を利用して生産された α -アミラーゼ」については、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 平成 24 年国民健康・栄養調査報告（厚生労働省）
2. *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) A164Δ5 株の作製方法（社内文書）
3. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 2010
4. 基本ベクター-pDG268 の配列（社内文書）
5. Artificial digestion test of OptiCake® (NM447) in Simulated Gastric Fluid (SGF) or Simulated Intestinal Fluid (SIF)（社内文書）
6. ELISA Report: Determination of residual NM447, the active component of OptiCake® 50 BG , after incubation at 90°C for up to 45 minutes by means of ELISA（社内文書）
7. Sequence homology of amylase from Opticake® to allergens（社内文書）
8. NM447、TS-25及びTAKAアミラーゼ（TAKA）のアミノ酸配列の比較（社内文書）
9. Widner B, Thomas M, Sternberg D, Lammon D, Behr R and Sloma A
Development of Marker-free Strains of *Bacillus subtilis* Capable of Secreting High Levels of Industrial Enzymes. *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 204-212 (2000)
10. Zhou C E, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer M D and Slezak T MvirDB-a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Research*, 35, Database issue, D391-D394 (2007)
11. Sequence homology of ORFs in amyM447 in *amyE* locus to proteins from MvirDB - Comparison between amyM447_39 and the 11 hit proteins（社内文書）
12. *Bacillus subtilis* NZYM-SO 株 *amyE* 遺伝子座の DNA 塩基配列（社内文書）
13. Analysis of residual DNA in OptiCake®（社内文書）