

Megazyme

β -グルカン分析法

(β 1,3:-1,6 酵母キノコ型)

MUSHROOM and YEAST BETA-GLUCAN ASSAY PROCEDURE

K-YBGL 08/18

K-YBGL
(用手法 100 回分)

日本バイオコン株式会社

はじめに - INTRODUCTION -

β -(1,3)-グルカンは自然界、特に藻類、カビや酵母で多く見られますが、高等植物にも広く分布しており、様々な生物学的機能を果たしています。それらは細胞壁の主要な構成成分を形成するだけでなく、貯蔵用多糖としても機能し、また創傷のような特定の刺激に特定部位で反応し形成され保護的な役割を果たすことも知られています¹。伝統的な中国医学で多くの品種のキノコの薬効成分は何世紀にも渡って評価され利用されてきました。最近の研究では重要な活性化合物はトリテルペノイド、エルゴステロールなどですが最も重要なのが β -1,3:1,6-グルカンであると実証されています^{1~7}。 β -グルカンは免疫系を賦活化するとともに、発癌抑制作用を持つとも云われています^{1~7}。

栄養補助食品に関する健康強調表示、ならびにこれら製品の独自性および純度について規制当局内で懸念があり⁸、このことは主要な有効成分が β -1,3:1,6-グルカン、トリテルペノイドおよびエルゴステロールと同定されている薬用キノコに特に関係しています。いくつかのキノコ種の β -1,3:1,6-グルカンはかなり詳細に研究されており、主な構造的特徴はからなる直鎖状 β -1,3-グルカン骨格からなり、主鎖骨格中の3⁹または4残基ごとにD-グルコシル残基が β -1,6結合で1残基結合した構造をしています。しかし、もっと複雑な構造を持つとの報告もなされています^{10~14}。

キノコとカビの β -グルカンの構造は、主鎖が β -1,3-および β -1,4-結合からなる直鎖状多糖である穀物 β -グルカン(いわゆる混合結合型 β -グルカン。結合比率は由来植物、例えば、オート麦、大麦および小麦などによって異なる)とはかなり異なります。

他の β -グルカンとしては、セルロース(β -1,4-D-グルカン)やカードラン(β -1,3-D-グルカン)があります。穀物 β -1,3:1,4-D-グルカン測定に特異性の高い酵素法も報告されています^{15, 16}。

市販の酵母製品中の β -1,3:1,6-D-グルカン測定のための酵素法も報告されていますが^{17, 18}、この方法は特定用途では非常に有用ですが、それらは穀物 β -グルカンの測定法のように特異性の高いものではありません^{15, 16}。またキノコ子実体や菌糸中の β -グルカンの定量的な測定が可能な酵素的手順は報告されていません。現在まで、キノコ β -グルカン測定^{19, 20}のため開発された方法は、穀類の食物繊維法であるProskey法の焼き直しでしかありません^{21, 22}。

このブックレットでは、キノコおよび菌糸体製品、酵母およびカビ調製品中の β -(1-3)(1-6)-グルカンの特異的測定方法について説明しています²³。この方法は、穀物澱粉などの α -グルカンが多量に混在しているキノコ製品の分析にも御使用戴けます。

原理 - PRINCIPLE -

β -1,3:1,6-D-グルカン、 β -1,3-D-グルカンおよび α -グルカンを氷冷12M硫酸で可溶化後、2M硫酸によりほぼ完全に加水分解します^{24, 25}。次いで残存するグルカン断片を、高純度のエキソ- β -1,3-グルカナーゼと β -グルコシダーゼを用いてグルコースまで定量的に加水分解します。これが総グルカン量に相当します。 α -グルカンは別途、アミログルコシダーゼと α -アミラーゼを用いてグルコースまで加水分解しGOPOD試薬によるグルコース測定で特異的に定量します。 β -グルカンは双方の吸光度差により算出します。キノコ由来精製標品はカプセル錠で入手可能な多くの市販キノコ/菌糸体製品よりもはるかに高い β -グルカン含有量を示します(表1、2; 6ページ)。

総グルカン加水分解の別法として、塩酸加水分解法があります。試料を12M塩酸中、30°Cで1時間懸濁・攪拌します。次に溶液を蒸留水で2Mに希釈し沸騰水浴中、約100°Cで2時間煮沸します。多種類のキノコ試料について分析した結果、どちらの酸分解でもほぼ一致した総グルカン量が得られました(表2、6ページ)²³。しかし数種のキノコ、すなわち*Ganoderma lucidum*、*Poria cocos*、*Cordyceps militaris*(霊芝、松塊、サナギタケ)の場合、硫酸加水分解の値は塩酸を使用した場合よりも大幅に高い数値を示しました。

正確さ - ACCURACY -

標準誤差5%未満が容易に達成できます(7ページ、表3)。

キット - KITS -

100 検体分析用キットを提供しております。キットには以下のものが含まれます。

- ボトル1:** エキソ-β-1,3-グルカナーゼ(100 U/mL) + β-グルコシダーゼ(20 U/mL)。硫酸アンモニウム懸濁液、2.0 mL、4°Cで4年以上安定です。
- ボトル2:** アミログルコシダーゼ(1,630 U/mL) + インベルターゼ(500 U/mL)。50%v/v グリセロール溶液、20mL。4°Cで約2年、-10°C以下で4年以上安定です。
- ボトル3:** GOPOD試薬緩衝液。緩衝液(50mL, pH 7.4)、*p*-ヒドロキシ安息香酸およびアジ化ナトリウム(0.095% w/v)含有。4°Cで4年以上安定です。
- ボトル4:** GOPOD試薬酵素。グルコースオキシダーゼ、パーオキシダーゼと 4-アミノアンチピリン。凍結乾燥粉末。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル5:** D-グルコース標準液(5mL, 1.0mg/mL)。0.2% (w/v)安息香酸溶液。室温で5年以上安定です。
- ボトル6:** 酵母β-グルカン粉末標準品。約 2g。β-グルカン含量はバイアルラベルに記載。室温で5年以上安定です。

試薬溶液／懸濁液の調製

- PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

1. ボトル1に 200mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)9mLを加えます(バイアル液量は 11mL になります)。適量ずつポリプロピレンチューブに分注し冷凍保存します。希釈後の試薬は-10°C以下で2年以上安定です。使用中は冷蔵又は氷冷にて保管願います。
2. 付属のボトル2をそのまま使用して下さい。4°Cで約2年、-10°C以下で4年以上安定です。
3. ボトル3(GOPOD試薬緩衝液)の内容物を蒸留水 1L に溶解します(これが**溶液1**です)すぐに使用します。

NOTE :

1. 緩衝液濃度が高いため、保存中に塩の結晶が生じることがあります。この緩衝液を蒸留水で 1L に希釈する際には、結晶を完全に溶解して下さい。
2. この緩衝液には、0.095% (w/v) のアジ化ナトリウムが含まれています。これは有毒化学物質ですので、留意してお取り扱い下さい。

4. ボトル4の内容物を 20mL の溶液1に溶解し、これを残りの溶液1のボトルに全量に移します。このボトルをアルミニウム箔で覆い、試薬を遮光保管します。これが**グルコース測定試薬(GOPOD試薬)**です。2~5°Cで約3ヶ月、-10°C以下で12ヶ月以上安定です。凍結保存する場合は、1回の分析で使い切れる適量ずつ小分けにして保存して下さい。決して凍結／融解を繰り返さない下さい。試薬を新しく調製した際に、試薬が淡く黄色~ピンク色を呈していることがあります。着色は4°Cで2~3ヶ月保存している間にさらに強くなります。この試薬の吸光度は、蒸留水に対し 0.05 未満でなければなりません。それを上回る場合は新しい試薬をご用意下さい。
5. 付属のボトル5をそのまま使用して下さい。室温で5年以上安定です。

6. 付属のボトル6をそのまま使用して下さい。室温で5年以上安定です。

試薬(提供外の試薬)

1. 酢酸ナトリウム緩衝液 (200mM、pH5.0)
蒸留水 900mL に氷酢酸(1.05g/mL) 11.6mL を加え、4M 水酸化ナトリウムを用いて pH5.0 に調整後、蒸留水で 1L に定容します。4°Cで約1年間安定です。
2. 酢酸ナトリウム緩衝液 (1.2M、pH3.8)
蒸留水 800mL に氷酢酸(1.05g/mL) 68.6mL を加え、4M 水酸化ナトリウムを用いて pH3.8 に調整後、蒸留水で 1L に定容します。室温で2年以上安定です。
3. 水酸化カリウム溶液 (10M)
換気の良いドラフト内で蒸留水 700mL をスターラーで攪拌し、KOH 561g を注意しながら徐々に添加して溶解します。そのまま放置して室温まで冷却させた後、1L に定容し密閉容器に保存します。室温で2年以上安定です。
4. 水酸化カリウム溶液 (2M)
蒸留水 900mL を攪拌し、KOH 112.2g を注意しながら徐々に添加して溶解します。1L に定容後、密閉容器に保存します。室温で2年以上安定です。
5. 硫酸 (12M, 72%w/w)
換気の良いドラフト内で水浴に入れた蒸留水 300mL に濃硫酸(98%、比重 1.835) 640mL を注意しながら徐々に添加します。そのまま放置して室温近くまで冷却させた後、1L に定容し密閉容器に保存します。室温で4年以上安定です。

機器(推奨):

1. ガラス試験管(丸底、14mL 容、16×100mm)
2. ネジロ付試験管、20×125mm
(Fisher Scientific #FB59563、同蓋 #FB51355、または同等品)
ネジロ付試験管、16×125mm
(Fisher Scientific #FB59559、同蓋 #FB51354、または同等品)
3. 沸騰水浴
4. マイクロピペッター(100μL)、例 Gilson Pipetman®
5. ポジティブディスプレイメント方式ピペッター、例 Eppendorf Multipette®
- 5.0mL Combitip® (加水分解試料、酵素液各 0.1mL 分注用)
- 50 mL Combitip®
(12M 硫酸 2.0mL、10M KOH 6mL、GOPOD試薬 3.0mL 分注用)
6. スターラーおよびスターラーバー (5×15mm)
7. 分析用天秤
8. 卓上型遠心機(3,000rpm、約 1,500×gにて 20×125mm 試験管に対応のもの)
9. 510nm に設定した分光光度計
10. 恒温水槽(40°C設定)
11. ボルテックスミキサー

標準品ならびに諸注意 – CONTROLS AND PRECAUTIONS –

1. 安全ゴーグル、手袋、実験用防護服は常に着用して下さい。
試験管を沸騰水浴中で煮沸する時、内容物の温度が上昇するまでの最初の5分間は**必ず蓋を緩めて**行ない、その後蓋を締めます。これにより試験管内に過剰な圧力が掛からないようにし、試験管の爆発を防ぎます。
2. 濃硫酸は非常に強い酸です。この液を扱うときは細心の注意を払う必要があります。取扱いは必ず換気の良いドラフト内で行って下さい。

酵母およびキノコ調製品中の β -1,3:1,6-グルカンの定量

A. 総グルカンの定量 (α -グルカン+ β -グルカン)

オリゴ糖、スクロース中のグルコースおよび遊離 D-グルコースも包含

a. 総グルカン (α -グルカン+ β -グルカン) の可溶化と部分分解

オリゴ糖、スクロースおよび遊離 D-グルコースも包含

1. Retsch 遠心ミルなどを用い、キノコまたは酵母試料を粉砕し、1.0mm の篩を通します。
2. 粉砕試料を約 90mg、20×125mm のネジ口試験管に精秤します。試験管を軽く叩き、全ての試料を試験管の底に落とします。
3. 各試験管に氷冷した 12M 硫酸 2.0mL を加え、蓋をしてボルテックスミキサーで激しく攪拌します。試験管を氷水浴中に置き、2時間放置します。 β -グルカンを完全に加水分解するため、放置中に数回取り出しては10~15秒間、激しく攪拌します。
4. 各試験管に蒸留水 4mL をゆっくりと加え(突沸に注意)、蓋をしてボルテックスミキサーで10秒間激しく攪拌します。さらに蒸留水 6mL を加え、蓋をしてさらに10秒間攪拌します。
5. 蓋を緩めて沸騰水浴(約 100°C)に入れます。5分後、蓋を締めて2時間煮沸を続けます。
6. 試験管を室温まで冷却し、慎重に蓋を緩めます。
7. 200mM 酢酸緩衝液(pH 5)入りの洗浄瓶を用い、各試験管の内容物を 100mL 容メスフラスコに全量移します。
8. 10M KOHを 6mL メスフラスコに加え、200mM 酢酸緩衝液(pH 5)で定容します。内容物を反転して良く混合し、溶液の一部をポリプロピレン製遠心管に入れます。
9. 溶液の一部を 1,500×g で10分間遠心します。

b. 総グルカン、およびスクロース中の D-グルコースおよび遊離 D-グルコースの定量

1. ガラス製試験管(16×100mm)の底部に、抽出上清 0.1mL ずつ2連で分注します。
2. 200mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)に溶解したエキソ β -1,3-グルカナナーゼ(20 U/mL)と β -グルコシダーゼ(4 U/mL)の混合物 0.1mL を各試験管の底部に加えます。試験管をボルテックスミキサーで混合し、40°Cで60分間反応させます。
3. 各試験管にGOPOD試薬 3.0mL を加え、さらに40°Cで20分間反応させます。
4. 試薬ブランクに対する反応液の 510 nm の吸光度を測定します。

NOTE :

1セットの分析には少なくとも1本の酵母またはキノコの標準品を測定します。また同時に試薬ブランクとグルコース 100 μ g 標準液(4連)も準備します。これらはGOPOD試薬による反応時に同時に測定します。

試薬ブランクは、200mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.2mL にGOPOD試薬 3.0mL を添加します。
D-グルコース標準(4連)は、D-グルコース標準液(1mg/mL) 0.1mL に、酢酸緩衝液 0.1mL およびGOPOD試薬 3.0mL を添加します。

B. α -グルカン(植物グリコーゲン、澱粉)の定量

スクロース中の D-グルコースおよび遊離 D-グルコースも包含

a. α -グルカンの可溶化と定量。オリゴ糖、スクロースおよび遊離 D-グルコースも包含

1. 粉碎試料を約 100mg、20 \times 125mm のネジ口試験管に精秤します。試験管を軽く叩き、全ての試料が試験管の底に落とします。
2. 各試験管にマグネチックスターラーバー(5 \times 15mm)、続いて 2M KOH 2mL を加え、マグネチックスターラー上に設置した氷水浴中で約20分間攪拌し、沈澱を懸濁します(この操作により植物グリコーゲン/澱粉を溶解します)。
3. 各試験管に 1.2M 酢酸緩衝液 (pH 3.8) 8mL を攪拌しながら加えます。直ちにアミログルコシダーゼ(1,630 U/mL)とインベルターゼ(500 U/mL)混合液 0.2mL を加え、良く攪拌してから40 $^{\circ}$ Cの恒温水槽に入れます。
4. 時折り攪拌しながら、40 $^{\circ}$ Cで30分間反応させます。
5. **α -グルカン含有量10%以上の試料の場合**：試験管の内容物を洗瓶を用いて 100mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容し、良く混合します。溶液の一部を 1,500 \times g で10分間遠心するか、Whatman No.1 濾紙(9 cm)で濾過します。
6. **α -グルカン含有量10%以下の試料の場合**：試験管を希釈せず直接 1,500 \times g で10分間遠心します。このサンプルの試験管内最終容量は約 10.3mL です(この容量は分析サンプルの種類により多少異なります)。場合により計算時に適切な容量補正をする必要があります。
7. 工程5または6の反応上清を 0.1mL ずつ2連でガラス製試験管(16 \times 100mm)に移し、酢酸緩衝液(200mM、pH 5.0) 0.1mL およびGOPOD試薬 3.0mL を加え、40 $^{\circ}$ Cで20分間反応させます。
8. 試薬ブランクに対する反応液の 510 nm の吸光度を測定します。

NOTE : キノコと酵母の試料には一般的に 10%未満の α -グルカンが含まれています。しかし、市販キノコには穀類からなる菌床上で生育するものがあり、製品中の澱粉含有量は 75%w/w になることがあります。

この方法はセルロース(β 1,4-D-グルカン)を含有する酵母 β -グルカンの分析には使用できません。

表1. 様々なキノコおよび菌糸体ベースのカプセル状製品中の総グルカン、
αグルカンおよびβグルカン含有量

	試料詳細 (配合キノコの種類)	総グルカン (g/100g)	αグルカン (g/100g)	βグルカン (g/100g)
1	<i>Ganoderma lucidum</i> 霊芝	74.3	29.2	45.1
2	16担子菌種ブレンド品	69.5	66.4	3.2
3	7担子菌種ブレンド品	73.7	72.5	1.3
4	<i>Ganoderma lucidum</i> 霊芝	44.6	22.6	22.0
5	<i>Ganoderma lucidum</i> 霊芝	87.7	83.2	4.3
6	<i>Ganoderma lucidum/Lentinula edodes</i> 霊芝/椎茸	59.9	41.9	18.0
7	<i>Cordyceps</i> sp. (子囊菌類)冬虫夏草	64.8	53.9	10.9
8	<i>Cordyceps</i> sp. (子囊菌類)冬虫夏草	65.5	64.0	1.5
9	<i>Ganoderma lucidum</i> 霊芝	52.5	45.2	7.3
10	<i>Cordyceps sinensis</i> (子囊菌類)冬虫夏草	13.9	3.0	10.9
11	<i>Cordyceps sinensis</i> (子囊菌類)冬虫夏草	29.3	24.1	5.2
12	<i>Inonotus obliquus</i> カバノアナタケ	69.8	70.0	~0.0
13	標準品(<i>A.niger</i> 菌糸体) 49%グルカン	51.9	1.0	50.9

表2. 各種精製キノコ試料を用いたαおよびβグルカン定量における
塩酸法と硫酸法の比較

キノコ試料	αグルカン +遊離糖 (乾物 g/100g)	βグルカン /硫酸法 (乾物 g/100g)	βグルカン /塩酸法 (乾物 g/100g)
<i>Polyporus umbellatus</i> チョレイマイタケ	0.6	50.5	52.8
<i>Trametes versicolor</i> カワラタケ	0.2	47.1	53.3
<i>Inonotus obliquus</i> カバノアナタケ	0.2	7.9	8.5
<i>Ganoderma lucidum</i> (試料1) 霊芝	0.2	54.0	23.6
<i>Agaricus blazei</i> アガリクス	3.4	13.1	8.9
<i>Grifola frondosa</i> マイタケ	1.3	35.1	32.1
<i>Ganoderma lucidum</i> (試料2) 霊芝	0.6	54.8	26.2
<i>Poria cocos</i> (粉末) 松塊	0.8	73.9	66.9
<i>Lentinula edodes</i> (粉末) 椎茸	3.2	36.2	37.4
<i>Cordyceps militaris</i> サナギタケ(冬虫夏草)	2.2	34.3	28.6
<i>Hericium erinaceus</i> ヤマブシタケ	3.2	33.9	35.3
<i>Agaricus bisporus</i> (button) マッシュルーム	1.3	6.0	7.5
<i>Pleurotus ostreatus</i> ヒラタケ	0.4	32.3	33.3
<i>Tremella fuciformis</i> シロキクラゲ	1.2	14.9	15.6
<i>Grifola frondosa</i> マイタケ	1.8	31.5	32.5
<i>Lentinula edodes</i> 椎茸	0.9	23.5	27.4
<i>Pleurotus eryngii</i> エリンギ	0.4	37.1	39.4
<i>Flammulina velutipes</i> エノキタケ	0.7	20.0	21.0
<i>Agaricus bisporus</i> (protobello) シャンピニオン	4.1	5.7	7.2
<i>Aspergillus niger</i> 菌糸体(標準品/含量 49%)	0.7	50.6	50.6

表3. 各種キノコ製品中の硫酸加水分解による総グルカン測定の再現性試験

試料	総グルカン%(w/w) ^a 、平均 ^b ±2SD, (CV ^c , %)				日差平均±2SD, (CV ^c , %)
	1日目	2日目	3日目	4日目	
<i>Trametes versicolor</i> カワラタケ	45.5±2.8 (3.0%)	45.8±3.2 (3.4%)	48.3±4.2 (4.4%)	49.1±4.4 (4.5%)	47.2±4.3 (4.6%)
<i>Ganoderma lucidum</i> 霊芝	52.4±2.6 (2.5%)	51.8±2.4 (2.3%)	52.7±0.2 (0.2%)	53.1±0.5 (0.4%)	52.5±1.7 (1.6%)
<i>Agaricus blazei</i> アガリクス	16.2±1.4 (4.4%)	16.2±0.9 (2.8%)	16.9±0.6 (1.6%)	16.7±0.2 (0.6%)	16.5±0.9 (2.9%)
<i>Grifola frondosa</i> マイタケ	35.6±1.3 (1.8%)	35.1±1.6 (2.2%)	37.8±0.9 (1.1%)	37.1±0.5 (0.7%)	36.4±2.5 (3.4%)
<i>Cordyceps militaris</i> サナギタケ(冬虫夏草)	36.8±1.7 (2.2%)	36.8±1.8 (2.5%)	37.4±0.3 (0.4%)	37.3±0.2 (0.2%)	37.1±1.1 (1.5%)
精製酵母グルカン (メガザイム #20301)	75±5.7 (3.8%)	75.5±3.3 (2.2%)	77±0.1 (0.1%)	77.4±0.1 (0.04%)	76.2±3.3 (2.2%)
<i>Aspergillus niger</i> 菌糸体 (#130905a; 49%グルカン)	53.7±0.4 (0.4%)	53.3±1 (0.9%)	54±0.6 (0.5%)	54.8±0.9 (0.8%)	54±1.2 (1.1%)

a 分析結果は乾物当たりの総グルカン量で表示。なおこれらサンプル中のαグルカン量は僅かです(表2参照)

b 各試料は日ごとに2連で測定

c CV= 変動係数

算出法

$$\begin{aligned}
 \text{総グルカン}(\% \text{ w/w}) &= \Delta A \times F \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{W} \times \frac{162}{180} \\
 &\quad (\text{+オリゴ糖など}) \\
 &= \Delta A \times F/W \times 90 \\
 \\
 \alpha\text{-グルカン}(\% \text{ w/w}) &= \Delta A \times F \times 1000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{W} \times \frac{162}{180} \\
 &\quad (\text{+オリゴ糖など}) \qquad \qquad \qquad (\text{または } 103) \\
 &= \Delta A \times F/W \times 90 \quad (\text{最終液量 } 100\text{mL}) \\
 &= \Delta A \times F/W \times 9.27 \quad (\text{最終液量 } 10.3\text{mL}) \\
 \\
 \beta\text{-グルカン} &= \text{総グルカン} - \alpha\text{-グルカン} \\
 &\quad (\text{+オリゴ糖など}) \qquad \qquad (\text{+オリゴ糖など})
 \end{aligned}$$

ここで:

ΔA = 反応液の吸光度 - ブランク吸光度

F = $\frac{100(\text{グルコース } \mu\text{g})}{\text{吸光度}(\text{グルコース } 100\mu\text{g})}$ (吸光度を μg に換算するファクター)

$100/0.1$ = 総グルカン(酵母)算出のための容量調整ファクター
(100mL 中の 0.1mL を分析)

103 = α -グルカン算出のための容量調整ファクター(10.3mL 中の 0.1mL を分析)

1000 = α -グルカン算出のための容量調整ファクター(100mL 中の 0.1mL を分析)

$1/1000$ = $\mu\text{g} \rightarrow \text{mg}$ 換算係数

$100/W$ = 試料 100mg 当たりの換算 (% w/w)

W = 分析に使用したサンプル重量
162/180 = 遊離 D-グルコースの分析値を β -グルカン中の存在形式であるアンヒドログルコースに換算するためのファクター

NOTE: 上記は、メガザイムウェブサイト(www.megazyme.com)の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme *Mega-Calc*TMを使用することで簡単に計算できます。

文献 - REFERENCES -

1. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. & Fukuoka, F. (1970). *Cancer Res.*, **30**, 2776-2781.
2. Ohnu, N., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T. & Yodome, T. (1984). *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1142-1151.
3. Ino, K., Ohno, N., Suzuki, I., Miyazaki, T. & Yodome, T. (1985). *Carbohydr. Res.*, **141**, 111-119.
4. Chihara, G. (1990). Lentinan and its related polysaccharides as host defence potentiators. "Immunotherapeutic Properties of infectious diseases", Edited by K. Noel Masihi and W. Lange. Heidelberg: Springer-Verlag.
5. Gunde-Cimerman, N. (1999). *Int. J. Medicinal, Mushrooms* **1**, 69-80.
6. Liu, J., Yang, F., Ye, L.-B., Yang, X.-J., Tamani, K. A., Zheng, Y. & Wang, Y.-H. (2004). *J. Ethnopharmacology*, **95**, 265-272.
7. Borchers, A. T., Keen, C. L. & Gershwin, M. E. (2004). *Exp. Biol. and Med.*, **229**, 393-406.
8. Chilton, J. Redefining medicinal mushrooms, Industry White Paper, <http://www.nammex.com/rmm-dps-pdf>
9. Stone, B. A. (2009). Chemistry and physico-chemistry. "Chemistry, Biochemistry and Biology of (1-3)- β -glucans and related polysaccharides". Edited by A. Bacic, G. B. Fincher and B. A. Stone, Academic Press, Burlington, MA, USA. p 5-46.
10. Kato, K., Inagaki, T., Shibagaki, H., Yamauchi, R., Okuda, K., Sano, T. & Ueno, Y. (1983). *Carbohydr. Res.*, **123**, 259-265.
11. Kato, K., Mutoh, K., Egashira, T., Hiura, M. & Ueno, Y. (1978). *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1073-1074.
12. Misaki, A. & Kishida, E. (1995). *Food Rev. Int.*, **11**, 219-223.
13. Miyazaki, T., Oikawa, N., Yamada, H. & Yodome, T. (1978). *Carbohydr. Res.*, **65**, 235-243.
14. Ohnu, N., Lino, K., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T. & Yodome, T. (1985). *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1181-1186.
15. McCleary, B. V. & Glennie-Holmes, M. (1985). *J. Inst. Brew.*, **91**, 285-295.
16. McCleary, B. V. & Codd, R. (1991). *J. Sci. Food Agric.*, **55**, 303-312.
17. Danielson, M. E., Dauth, R., Elmasry, N. A., Langeslay, R. R., Magee, A. S. & Will, P. M. (2010). *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 10305-10308.
18. Enzymatic yeast beta-glucan assay procedure (K-EBHLG). (2014). Megazyme https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-EBHLG_DATA.pdf

19. Park, Y. K., Ikegaki, M., Alencar, S. M. & Aguiar, C. L. (2003). *Cienc. Technol. Aliment., Campinas* **23**, 312-316.
 20. Rhee, S. J., Cho, S. Y., Kim, K. M., Cha, D.-S. & Park, H.-J. (2008). *LWT-Food Sci. Technol.*, 545-549.
 21. Prosky, L., Asp, N.-G., Furda, I., DeVries, J. W., Schweizer, T. F. & Harland, B. F., (1985). *J. AOAC International*, **68**, 677-679.
 22. Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th Ed. 2012, Methods 925.10, 985.29, 991.42, 991.43, 993.19, 994.13, 996.01, 2001.03, 2002.01, 2002.02, 2009.01 and 2011.25. AOAC International, Rockville, Maryland, USA.
 23. McCleary, B. V. & Draga, A. (2016). *J. AOAC International*, **99**, 364-373.
 24. Selvendran, R. P., March, J. F. & Ring, S. G. (1979). *Anal. Biochemistry*, **96**, 282-292.
 25. Saeman, J. F., Moore, W. E., Mitchell, R. L. & Millett, M. A. (1954). *Tappi*, **37**, 336-343.
-

日本バイオコン株式会社

名古屋本社

〒454-0852 名古屋市中川区昭和橋通三丁目 23 番地1 バイオコンビル
TEL 052-661-8105 (代表) FAX 052-659-0888

TEL 052-659-4898 (試薬担当直通)

E-mail : info@biocon.co.jp

Homepage : http://www.biocon.co.jp

この小冊子に記載されている情報は、当社が知る限りにおいて事実かつ正確に記載されていますが、使用条件が当社の管理範囲外であるため、本文中にどのような推奨や示唆があったとしても、如何なる使用も特許を侵害しないということを保証しているものではありません