

## エリンギ (*Pleurotus eryngii*) のトレハラーゼ :

### 酵素の分布、精製および性質について

荒木紀美・竹内梓・小林唯・柳田彩乃・河野祥子  
関澄恵・池和田恵・小林幹彦

食生活科学科 食品化学研究室

Distribution, Purification, and Characterization of Trehalase  
from the Fruit Body of King Oyster Mushroom, *Pleurotus eryngii*

Motomi ARAKI, Azusa TAKEUCHI, Yui KOBAYASHI, Ayano YANAGIDA,  
Sachiko KOUNO, Sumie SEKI, Megumi IKEWADA, and Mikihiko KOBAYASHI

Department of Food and Health Sciences

Trehalase activity in a homogenized preparation from the fruit body of king oyster mushroom (*eryngii*), *Pleurotus eryngii* was studied in detail. Distribution of trehalose and trehalase activity was higher in the cap(pileus) fraction than in the other positions such as stalk(stipe). The trehalase peak 1 was purified by the Sephacryl S-200 and Toyopearl HW-55 column chromatography. Electrophoretic analysis of trehalase gave values of molecular weight of 36~37kDa, and oligomeric forms and glycoprotein forms of trehalase were suggested by the band patterns of resulting gels.

Optimum conditions of pH and temperature were determined to be pH5.0 and 30°C, respectively. Trehalase peak 1 showed higher reactivity to  $\alpha$ -,  $\alpha$ -trehalose, whereas peak 2 enzyme showed higher activity to  $\beta$ -,  $\beta$ -trehalose, methyl- $\beta$ -glucoside, and cellobiose, indicating that this enzyme might have a substrate specificity such as  $\beta$ -glucosidase.

Key words : *Basidiomycete* (担子菌), *eryngii* (エリンギ), **trehalose** (トレハロース),  
**trehalase** (トレハラーゼ),  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -グルコシダーゼ),  
**affinity chromatography** (アフィニティークロマトグラフィー)

#### 1. 緒言

トレハロースは2分子のグルコースが $\alpha$ -1,1-結合した非還元性の2糖で、高等植物、藻類、地衣類、菌類、細菌類、昆虫などに広く存在している。我が国では新規酵素により、デンプンを原料としてトレハロースを極めて安価に生産する方法が確立され<sup>1)</sup>、各種食品の製造や加工に広く利用されるようになってきている<sup>2)</sup>。トレハロースの特徴は、メイラード反応による褐変を起こさず、熱や酸に対しても安定で、難吸湿性であることや、デンプンの老化防止、タンパク質の変性防止、矯味・矯臭作用、鮮度保持効果などが報告されている。また、人に対する機能性として低い蝕食や骨粗鬆症予防などがある<sup>3,4)</sup>。

きのこ類にはトレハロースを水溶性貯蔵糖質として

保持しているものが多い。きのこ類のトレハラーゼに関しては、トレハラーゼ量の多少はあっても、多くの担子菌に普遍的に存在しているとされている<sup>5)</sup>。当研究室の渡部らは、担子菌トレハラーゼの酵素的性質を明らかにするため、大量入手可能な食用人工栽培きのこのまいたけを試料とし、そのトレハラーゼを精製して酵素化学的性質を報告した<sup>6)</sup>。近年、国内で食用に供されるようになったエリンギ (*Pleurotus eryngii*) はトレハロースを高濃度で含有するといわれている<sup>7,8)</sup>。そこで、エリンギ子実体中の糖質の組成、含量および糖質分解酵素について検討した結果、トレハロース含量は18.7%という結果が得られ、トレハラーゼの活性も高いことが分かった<sup>9)</sup>。本研究では、これまでの結果を踏まえて、エリンギの各部位における酵素活性

および糖質の分布の検討、トレハラーゼの精製法の検討と酵素化学的な諸性質の解明を試みた。

## 2. 実験方法

### 1) 酵素調製法

市販のエリンギ (500g) に 40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) を加えて磨砕し、遠心分離後の上清に 80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えた。4℃、24h 静置後の沈殿を回収し、67%グリセロールで懸濁し、粗酵素として凍結保存した (以下、これを粗酵素と表示する)。また、以降の実験には、この粗酵素を透析処理、遠心分離後の上清を酵素液として使用した (以下、酵素液と表示)。

### 2) 酵素活性の測定法

酵素活性は、30℃で一晩反応後に生じた還元力を Nelson-Somogyi 法<sup>10)</sup>を用いて波長 500nm (以下、A500 と表示) で測定した。

### 3) 部位別の測定

市販のエリンギ 2本をカサと柄に分け、柄を 4等分にし、カサから順に a~e 画分とした (図 1 a)。収量は a) 51.20g、b) 20.13g、c) 23.37g、d) 27.28g、e) 23.12g であった。これを細かく刻み、40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) を加え石英砂を用いて乳鉢で磨砕し、遠心分離 (25,000xg、15min) で得られた上清を酵素液として以降の実験に用いた。酵素液の収量は a) 85.0ml、b) 29.0ml、c) 38.5ml、d) 36.5ml、e) 42.0ml であった。全糖量はフェノール硫酸法、波長 490nm (以下 A490 と表示) で測定した<sup>11)</sup>。

### 4) カラムによる酵素の精製

- ① Sephacryl S-200 (Pharmacia Biotech) をカラム (1.3cm × 30cm) に充填し、40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で平衡化したものに酵素液を供試し、同緩衝液で溶出、2ml ずつ 50 本を分画した。
- ② Hexyl-Toyopearl (TOSOH) をカラム (1.3cm × 30cm) に充填し、0.5M もしくは 1 M 硫酸を含む 40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で平衡化したものに酵素液を供試し、前半は同緩衝液を用いて、後半は硫酸を含まない緩衝液を用いて 2ml ずつ 60 本

を分画した。

- ③ Sepharose CL-6B (GE Healthcare) をカラム (1.3cm × 30cm) に充填し、2 M 硫酸を含む 40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で平衡化したものに酵素液を供試し、前半は同緩衝液を用いて、後半は硫酸を含まない緩衝液を用いて 2ml ずつ 60 本を分画した。
- ④ Toyopearl HW-55 (TOSOH) カラム (1.3cm × 30cm) を 40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で平衡化したものに酵素液として、Sepharose CL-6B で分画し、回収したピーク 1 をポリビニルピロリドン (PVP) で濃縮後に 40mM 酢酸緩衝液 2ml に溶解したものを供試し、同緩衝液で溶出、2ml ずつ 50 本を分画した。

### 5) トレハラーゼの電気泳動

市販品のゲル (10%ゲルプレート、コスモ・バイオ製) を用いて行った。泳動緩衝液、試料処理液、標準タンパク質は第一化学薬品のものを用いた。Native-PAGE は Davis 法により、SDS-PAGE は Laemmli 法により分析した。バンドの染色は Coomassie Brilliant Blue R250 を 0.25%濃度に、メタノール：酢酸：水 = 5 : 1 : 5 に溶解したものを用いた。脱色はメタノール：酢酸：水 = 50 : 75 : 875 溶液を用い、染色したゲルを活性炭とともに脱色液へ浸漬し、24h 振とうして脱色後、目的とするバンドを得た。

### 6) 基質特異性

エリンギの酵素の基質特異性を測定するために以下の基質を使用した。α-, α-Trehalose、α-, β-Trehalose、β-, β-Trehalose (以上 SIGMA)、Methyl-α-glucoside (関東化学)、Methyl-β-glucoside、Cellobiose (半井化学薬品)、Sucrose、Lactose、Maltose、Chitobiose (和光純薬)。これらの基質を 2%に調製し、酵素液は Sephacryl S-200 で分画後、回収した peak 1、peak 2 を用いた。活性は Nelson-Somogyi 法 (A500)、Glucose-oxidase (GOD 法、和光純薬・測定キット、波長 505nm、以下 A505 と表示) で測定した。

### 7) 至適温度・pH および安定性

これらの実験で使用した酵素液は粗酵素を透析したものの遠心上清、基質は 2%トレハロースを用い、

酵素活性は A500 で測定した。

至適温度は、基質 50 $\mu$ l と酵素液 50 $\mu$ l を混合し、40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) を 200  $\mu$ l 加えたものを、温度勾配装置 (Advantec 製) により 25 $^{\circ}$ C から 65 $^{\circ}$ C までの範囲で段階的に温度を設定し、24 h 反応させた。

温度安定性は、酵素 50 $\mu$ l と 40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) 200 $\mu$ l を混合し、温度勾配装置を用いて各温度で 1 h 反応した後、基質 50 $\mu$ l を加えて 30 $^{\circ}$ C で 24 h 反応して、残存活性を求めた。

至適 pH は、酵素液 50 $\mu$ l、基質 50 $\mu$ l、pH3.0 か

ら pH8.0 まで段階的に調製した McIlvaine buffer を 200  $\mu$ l 混合し、30 $^{\circ}$ C で 24h 反応させた。pH 安定性は酵素液 50 $\mu$ l と McIlvaine buffer 100 $\mu$ l を混合し、30 $^{\circ}$ C で 1 h 反応した後、基質 50 $\mu$ l と 0.2M 酢酸緩衝液 (pH5.2) を 700  $\mu$ l 加え、30 $^{\circ}$ C で 24h 反応して、残存活性を求めた。

### 3. 実験結果

#### 1) トレハラーゼの存在

エリンギを 5 つの部位に分け (図 1 a)、方法に示した通りに処理して得られた抽出液についてタンパ

表 1 エリンギ子実体における各種成分の分布

	Fraction (Top to bottom)					Total
	a	b	c	d	e	
Weight (g)	51.20	20.13	23.37	27.28	23.12	93.90
Extract (ml)	85.0	29.0	38.5	36.5	42.0	-
Protein (mg)	2083	474	694	762	1097	5110
Total sugar (mg)	1640	660	1074	1267	1208	5853
Starch-like sugar (mg)	-	41.9	49.0	37.5	65.6	-
Oligosaccharides (mg)	198	71	125	123	112	629
Reducing sugar (mg)	87.0	31.0	29.4	29.2	38.0	58.6
Carbohydrases ( $\mu$ mole <sup>*</sup> )	58.6	12.9	7.4	7.2	5.8	91.9
Amylase ( $\mu$ mole <sup>*</sup> )	59.5	14.1	8.8	7.8	3.9	94.1
Trehalase ( $\mu$ mole <sup>*</sup> )	99.6	11.9	5.7	5.7	3.0	122.9

\* Enzyme activities were represented by the amount of reducing sugar released as the  $\mu$ mole of glucose.

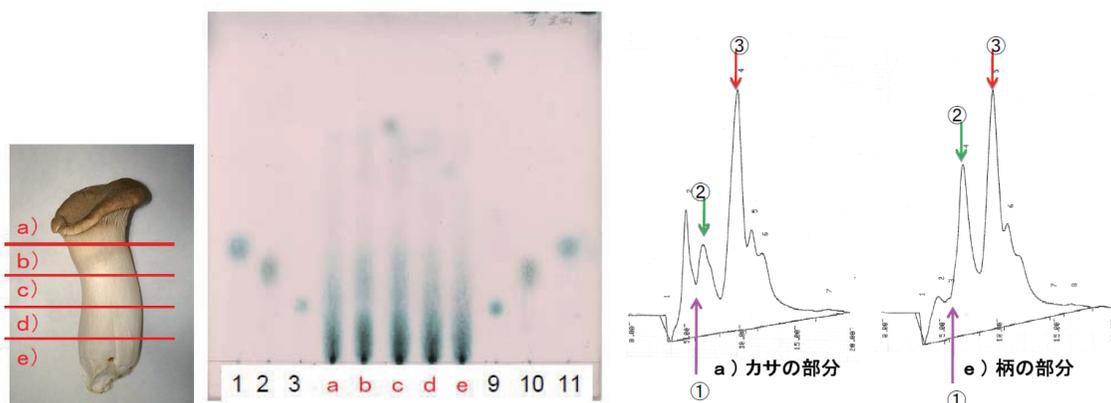


図 1 エリンギの糖質および酵素の部位別の分布

- a、エリンギの各部位の区分; a) カサ; b) 、c) 、d) 、e) 柄の部分。
- b、エリンギの部位別抽出液に含まれる糖質の薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析。Glc、1,11 ; Gal、2,10 ; Trehalose、3,9。a ~ e、エリンギの各部位の抽出物。シリカゲル G 薄層プレート (MERC) を用い、展開溶媒として *n*-ブタノール : 酢酸エチル : イソプロピルアルコール : 酢酸 : 水 = 7 : 20 : 12 : 7 : 6 を調製し、24h 展開した。発色試薬は *p*-アニスアルデヒド、110 $^{\circ}$ C で 15min 加熱発色。
- c、エリンギの部位別抽出物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析。分離カラム、Senshu-Pak (NH2-1251-N 型) ; 装置、Waters 高速液体クロマトグラフ ; 検出、示差屈折計 ; 溶媒、75% アセトニトリル。
- a) カサ ; e) 柄の部分 ; peak ①、Glc ; ②、Gal ; ③、Trehalose。

ク質量、全糖量、酵素活性を測定した。すべての部位において酵素活性が見られたが、a) カサの部分が高値を示した(表1)。全糖量はa) カサに次いで柄の部分 d), e) が高い値を示した。このことから a) カサの部分に多くの糖やトレハラーゼが存在していることが分かった。各部位の抽出液をセントリコン濃縮して TLC で分析した結果、グルコース、トレハロース以外にもオリゴ糖が大量に含まれていることが分かった(図1b)。HPLC 分析では、ガラクトースがカサ部分 a) より柄の部分 e) に多く含まれていたが、グルコース、トレハロース、その他のオリゴ糖はカサ部分 a) に多く含まれていることが分かった(図1c)。

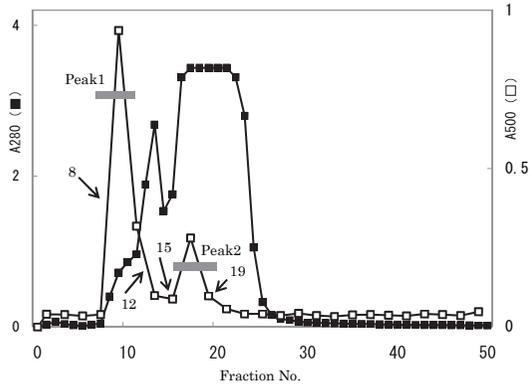


図2 Sephacryl S-200 カラムによるエリンギのトレハラーゼの精製、分画  
タンパク質量 (A280) ■ ; 酵素活性 (A500) □。

## 2) トレハラーゼの精製

エリンギの粗酵素 5g を 40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) 1ml で溶解し、遠心分離して得た上清を Sephacryl S-200 カラムに供した。得られた分画液について、タンパク質量、酵素活性を測定した結果、前半部分に大きい活性ピーク 1 とその後に小さい活性ピーク 2 が得られた(図2)。

次に粗酵素 2g を 40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で溶解し、Hexyl-Toyopearl カラムによる疎水クロマトグラフィーに供した。カラムは硫酸アンモニウムの濃度を 0.5M および 1M で平衡化したものに酵素液を充填、溶出し、途中で硫酸を含まない緩衝液に切り替えて溶出した(図3a, b)。図に見られるよう

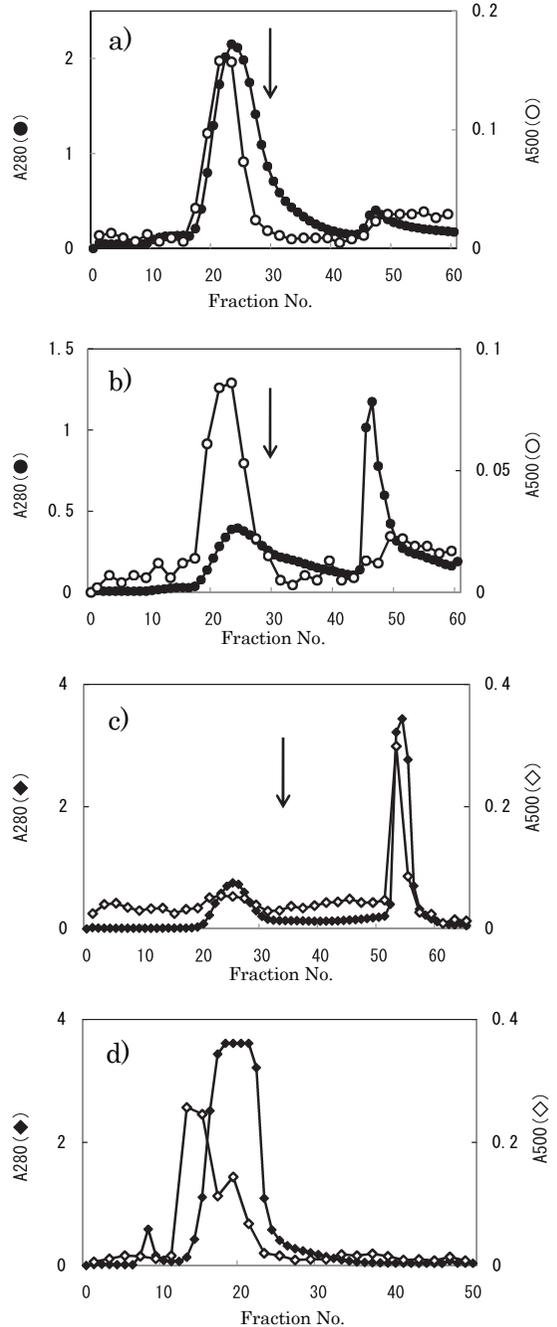
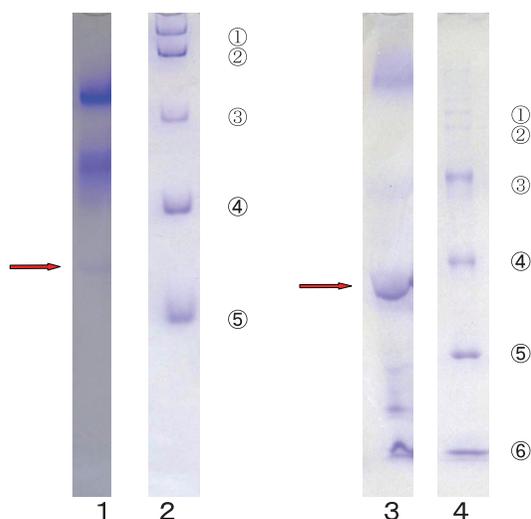


図3 トレハラーゼの各種カラムクロマトグラフィー  
a・b、Hexyl-Toyopearl で分画；タンパク質量 (A280) ●；酵素活性 (A500) ○。a、0.5M 硫酸および 0M 硫酸 (40mM 酢酸緩衝液、pH5.2) の段階溶出で分画；b、1M 硫酸および 0M 硫酸の段階溶出で分画。c・d、Sephacryl S-200 で分画；タンパク質量 (A280) ◆；酵素活性 (A500) ◇。c、2M 硫酸および 0M 硫酸の段階溶出で分画；d、0M 硫酸で分画。図中の矢印は溶媒の切り替え点を表す。



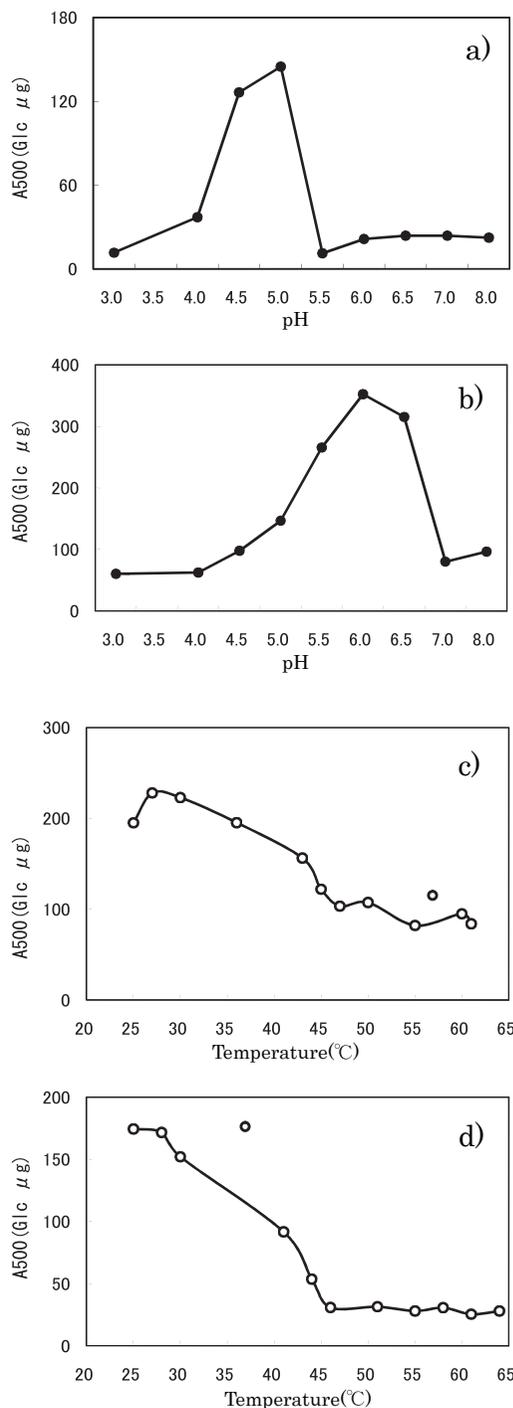
**図 4** トレハラーゼの電気泳動分析  
Native-PAGE：レーン 1 は Sephacryl S-200 カラムのピーク 1 をさらに Toyopearl HW-55 で精製した標品。レーン 2 は標準タンパク質①サイログロブリン 669kDa、②フェリチン 443kDa、③乳酸脱水素酵素 139kDa、④ウシ血清アルブミン 66kDa、⑤トリプシンインヒビター 20kDa。SDS-PAGE：レーン 3 は Sephacryl S-200 カラムのピーク 1 をさらに Toyopearl HW-55 で精製した標品。レーン 4 は標準タンパク質①ミオシン 200kDa、②β-ガラクトシダーゼ 116kDa、③ウシ血清アルブミン 66kDa、④アルドラーゼ 42kDa、⑤カルボニックアンヒドラーゼ 30kDa、⑥ミオグロビン 17kDa。図中の矢印はモノマー酵素の位置を示す。

に硫酸の初濃度が高いとカラムに吸着されるタンパク量が多くなること、トレハラーゼ活性の一部も吸着されることが分かった。

また、粗酵素 2 g を 40mM 酢酸緩衝液 (pH5.2) で溶解し、2 M および 0 M 硫酸で平衡化した Sepharose CL-6B カラムに供した (図 3 c, d)。前者は途中で硫酸を含まない緩衝液に切り替えて溶出した。その結果、トレハラーゼ活性は高濃度の硫酸の存在下でより強くゲルに吸着され、硫酸を含まない緩衝液で溶出されたことから、Sephacryl ゲルはエリンギのトレハラーゼの精製に有用であり、アフィニティーカラムとして使用できることが分かった。

### 3) トレハラーゼの電気泳動分析

上述のカラムクロマトグラフィーにより部分精製された酵素を用いて電気泳動分析を行った (図 4)。Davis 法による SDS を含まない Native 系での



**図 5** エリンギのトレハラーゼの至適温度・至適 pH・安定性

a、至適 pH；b、pH 安定性；c、至適温度；d、温度安定性。縦軸の酵素活性 (A500) はグルコース量に換算した遊離還元糖量 (μg/ml) で記載。

表2 エリンギのトレハラーゼ・ピーク1、2の基質特異性\*

Substrate (2% conc)	A505 (GOD method)		A500 (Nelson-Somogyi method)	
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2
$\alpha$ - $\alpha$ -Trehalose	0.38	0.30	0.49	0.23
$\alpha$ - $\beta$ -Trehalose	0.11	0.63	0.37	0.41
$\beta$ - $\beta$ -Trehalose	0.93	12.67	0.74	18.09
Methyl- $\alpha$ -glucoside	0.10	0.07	0.34	0.24
Methyl- $\beta$ -glucoside	0.23	5.79	0.39	2.05
Sucrose	0.84	2.87	0.66	7.62
Lactose	0.10	0.95	2.99	3.12
Maltose	0.18	1.32	3.78	3.82
Cellobiose	0.41	6.32	3.54	6.88
Chitobiose	0.19	0.15	3.10	4.38

\* Enzyme activities were represented by the amount of reducing sugar released as the  $\mu$ mol of glucose.

泳動では、36kDaのモノマーのバンドと、それより高分子量のテトラマーと思われるバンド、さらに大きいサイズのオリゴマーのバンドなどが得られた。このパターンは酵素液を Sephacryl S-200、Hexyl-Toyopearl、Sephacryl CL-6B カラムの何れかで分画し、さらにこれを Toyopearl HW-55 カラムで精製した標品でもほぼ同様の結果となり、オリゴマー酵素の存在を示すバンドが得られた。また、SDS系の電気泳動では37kDaの主バンドが得られた。それ以外にも幾つかの夾雑タンパク質のバンドが見られたことから、酵素の精製はさらに検討を要するものと考えられる。

#### 4) トレハラーゼの性質

##### a) 酵素の性質

エリンギの粗酵素の透析上清を酵素液として用い、方法に示した通りに処理し酵素活性を測定した(図5a~d)。その結果、エリンギのトレハラーゼ活性はpH5.0付近で最大活性を示した。また、pH5.5からpH6.5付近までのpH範囲では安定であった。このことから本酵素は酸性トレハラーゼであることが示唆された。至適温度は25~30℃付近にあり、27℃から30℃付近までは安定であったが、それ以上の温度では失活した。グラフ(図5d)では35℃の点が高いが、これは実験誤差とみなし、熱安定性は30℃までと判断した。

##### b) 基質特異性

エリンギのトレハラーゼ活性を精製し、ピーク1とピーク2に分けて、それぞれ基質特異性につい

て検討した(表2)。酵素活性はGOD法とNelson-Somogyi法で測定したが、得られた結果は両測定で概ね対応が見られた。活性が高いトレハラーゼのピーク1は $\alpha$ -、 $\alpha$ -トレハラーゼへの作用性が高いことが分かった。ピーク2は $\beta$ -、 $\beta$ -トレハロースやメチル- $\beta$ -グルコシド、セロピオースなどの $\beta$ -結合を有する基質によく作用することから $\beta$ -グルコシダーゼタイプであることがわかった。 $\alpha$ -、 $\beta$ -トレハロースはピーク1、2間での作用の差がはっきりしなかった。また、キトピオースへの作用が見られたことから、エキソ- $\beta$ -グルコサミニダーゼの存在が示唆された。ピーク1、2にはマルトースやラクトースに作用する活性も検出されたことから糖代謝系に関わる酵素群の複雑な分布の一端が明らかになった。

#### 4. 考察

エリンギ子実体をカサから柄の部分に5画分に分けて(図1)糖質および酵素の分布を調べた(表1)。全糖とオリゴ糖はカサの部分に多く、HPLCの結果からトレハロースの存在が示唆された。トレハラーゼの活性もカサ部に多く見られたが、遊離還元糖量の測定値からアミラーゼの他にも各種の糖質分解酵素が含まれていることが分かった<sup>9)</sup>。

エリンギのトレハラーゼの精製法を種々検討した結果、Sephacryl S-200による分画で主ピーク1とそれより低分子量のピーク2が得られた(図2)。Hexyl-Toyopearlによる疎水性クロマトグラフィー(図3a, b)ではカラムの平衡化に用いた硫酸の濃度に依存してタ

ンパク質の溶出パターンが変化し、トレハラーゼ活性の主ピークは 1 M 硫酸の条件で夾雑タンパク質との分離が良かった (図 3b)。先に報告したように、このトレハラーゼはデンプンゲルへのアフィニティーを示したが<sup>12)</sup>、今回の実験では硫酸存在下でのクロマトグラフィーで、Sephacryl CL-6B ゲルへの親和性が高いことが分かった (図 3c, d) が、酵素の精製度を上げるためにはさらに検討が必要である。

次にトレハラーゼの分子量に関する知見を得るために電気泳動分析を行った (図 4)。供試酵素は Sephacryl S-200 と Sepharose CL-6B カラムで得たピーク 1 成分をさらに Toyopearl HW-55 を用いたゲルろ過で精製した標品を使用した。Native-PAGE では分子量 36kDa の位置にバンドが見られた。さらにそれよりも高分子量のオリゴマーの 4 ~ 8 量体に相当する位置に 2 本のバンドが得られた。SDS-PAGE では分子量 37kDa の位置にバンドが見られたが、他にも夾雑タンパク質のバンドがありトレハラーゼの精製がまだ不十分であることが明らかになった。酵母の酵素では分子量が 37 ~ 41kDa<sup>13,14)</sup>、*Rhizopus*、*Fusarium* の酵素では 60kDa のものが報告されている<sup>15,16)</sup>。Native-, SDS-PAGE とともに酵素のバンドが幅広い形をしていたことから、トレハラーゼの酵素タンパク質には糖鎖が結合<sup>14,15)</sup>している可能性も示唆された。オリゴマー型のトレハラーゼの存在は多くのカビ起源の酵素で報告があり、分子量が 100 ~ 580kDa と極めて高度な会合体が存在していることが知られている<sup>17)</sup>。

酵素化学的な諸性質を見ると、エリンギトレハラーゼの至適 pH は 5.0 付近であった。まいたけトレハラーゼの至適 pH は 4.0 であること<sup>6)</sup>から、きのこ類の持つトレハラーゼは酸性型トレハラーゼであると示唆された。また、他のカビのトレハラーゼと比較すると *Aspergillus oryzae* のトレハラーゼ<sup>18)</sup>も至適 pH は 4.0 であり、*Neurospora crassa* のトレハラーゼ<sup>19)</sup>は 5.5 であった。エリンギトレハラーゼは 40℃以下で安定であり、50℃まで安定な他のカビのトレハラーゼとは差が見られた。

基質特異性に関して、エリンギのトレハラーゼ活性のピーク 1 成分は  $\alpha$  -,  $\alpha$  -トレハロースによく作用した (表 2)。ピーク 2 成分は  $\beta$  -,  $\beta$  -型によく作用する  $\beta$  -グルコシダーゼタイプであることが分かった。従って、エリンギのトレハラーゼには 2 種類の異なる

タイプのトレハラーゼが存在するのか、あるいは  $\beta$  -グルコシダーゼが夾雑しているのかの何れかであると考えられる。

また、単離した酵素画分には上記以外にもエキソ -  $\beta$  -グルコサミニダーゼ活性やマルトース、ラクトースに作用するその他の活性が検出されたことからトレハラーゼの他にも興味深い諸酵素の存在が明らかとなった。

## 文献

- 久保田倫夫、澤谷郁夫、奥和之、竹内叶、村井佐恵 : *J. Appl. Glycosci.*, 51, 63 ~ 70 (2004).
- 林原商事 : トレハロースのホームページ. [www.hayashibarashoji.jp/](http://www.hayashibarashoji.jp/)
- 伊藤汎、小林幹彦、早川幸男 : 食品と甘味料、光琳 (2008).
- Y. Nishizaki *et al.* : *Nutr. Res.*, 20, 653 ~ 664 (2000).
- 水野卓、川合正允 : キノコの化学・生化学、学会出版センター (1992).
- 渡部一穂、北沢靖子、馬場美穂子、北原智美 : 実践女子大学生生活科学部紀要、35, 9 ~ 15 (1998).
- ホクト (株) : エリンギのホームページ. [www.hokto-kinoko.co.jp/karada/02.html](http://www.hokto-kinoko.co.jp/karada/02.html).
- 雪国まいたけ (株) : エリンギのホームページ. [www.maitake.co.jp/06dictionary/04\\_yukigunni\\_eringi.html](http://www.maitake.co.jp/06dictionary/04_yukigunni_eringi.html).
- 荒木紀美、中田陽子、菱田桂菜、池和田恵、谷亀久美子、小林幹彦 : 実践女子大学生生活科学部紀要、46, 1 ~ 8 (2009)
- M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, 195, 19 ~ 23 (1952).
- M. Dubois *et al.* : *Anal. Chem.*, 28, 350 ~ 356 (1956).
- 荒木紀美、田中奈穂美、萩原歩美、波多野智子、小林幹彦 : 実践女子大学生生活科学部紀要、47, 71 ~ 77 (2010).
- N. Biswas and A. K. Ghosh : *Biochim. Biophys. Acta*, 1379, 245 ~ 256 (1998).
- K. Mittenbühler and H. Holzer : *Arch. Microbiol.*, 155, 217 ~ 220 (1991).
- A. C. de Aquino *et al.* : *FEMS Microbiol. Lett.*, 251, 169 ~ 175 (2005).
- B. Wolska-Mitaszko *et al.* : *Mycol. Res.*, 111, 456 ~ 465 (2007).
- J. A. Jorge *et al.* : *FEMS Microbiol. Lett.*, 154, 165 ~ 171 (1997).
- K. Horikoshi and Y. Ikeda : *J. Bacteriol.*, 91, 1883 ~ 1887 (1966).
- E. P. Hill and A. S. Susman : *Arch. Biochem. Biophys.*, 102, 389 ~ 396 (1963).