

# 高通量 MBTH 法测定 $\beta$ -葡聚糖酶的活力

张永勤, 刘征东, 程袁芬, 常海燕, 吴国耀, 韩美芳

(青岛科技大学化工学院, 山东青岛 266042)

**摘要:** 本文建立了一种以 3-甲基-2-苯并噻唑酮腈(MBTH)为氧化剂, 以微孔板测定  $\beta$ -葡聚糖酶活力的新方法, 该法特别适合于成分复杂的材料中痕量  $\beta$ -葡聚糖酶活力的测定。根据 MBTH 法测定  $\beta$ -葡聚糖酶解产物还原端基的特点, 设计并优化了酶活力测定的关键参数。结果表明, 在最适 pH 5.0 和 30 °C 条件下测定  $\beta$ -葡聚糖酶活力, 所得酶的工作浓度范围为 0~12.3 mU/mL, 饲料中酶的工作浓度范围均为 0~2.94 U/g, 本法测  $\beta$ -葡聚糖酶和四种饲料样品中酶的平均回收率分别为 93.1%、97.5%、104.3%、97.0%、106.4%,  $\beta$ -葡聚糖酶活力检测限为 0.37 mU/mL, 定量限为 1.24 mU/mL, 四种饲料酶活力检测限分别为 0.10 U/g、0.09 U/g、0.14 U/g、0.09 U/g, 定量限分别为 0.33 U/g、0.30 U/g、0.46 U/g、0.31 U/g。该法准确、低成本、省时、省力, 特别是其灵敏度远高于 DNS 法, 可极大程度上避开饲料中其它成分对测定的干扰。

**关键词:** 高通量法; MBTH;  $\beta$ -葡聚糖酶; 活力; 饲料; 测定

文章编号: 1673-9078(2015)1-221-225

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.038

## High Throughput Determination of $\beta$ -Glucanase Activity Using the 3-Methyl-2-benzothiazole Hydrazine (MBTH) Method

ZHANG Yong-qin, LIU Zheng-dong, CHENG Yuan-fen, CHANG Hai-yan, WU Guo-yao, HAN Mei-fang

(College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

**Abstract:** In this paper, a novel microplate-based method, using 3-methyl-2-benzothiazole hydrazine (MBTH) as the oxidant, for assaying  $\beta$ -glucanase activity was established. This method was suitable for the determination of trace levels of  $\beta$ -glucanase activity, especially in materials with complex composition. The parameters of the activity assay were designed and optimized based on the characteristics of the reducing end groups in the products of  $\beta$ -glucanase-mediated enzymatic hydrolysis. The results showed that, for enzymatic activity determination carried out under optimal pH (pH = 5.0) and temperature (30 °C) conditions, the activity of pure  $\beta$ -glucanase was linear in the 0~12.3 mU/mL range, while the  $\beta$ -glucanase activities in the four types of feeds were linear within the 0~2.94 U/g range. The average recoveries using pure  $\beta$ -glucanase and the enzymes in the four feeds were 93.1%, 97.5%, 104.3%, 97.0%, and 106.4%, respectively. The limits of detection for pure  $\beta$ -glucanase and the enzymes in the four feeds determined using this method were 0.37 mU/mL, 0.10 U/g, 0.09 U/g, 0.14 U/g, and 0.09 U/g, respectively. The limits of quantitation for pure  $\beta$ -glucanase and the enzymes in the four feeds determined using this method were 1.24 mU/mL, 0.33 U/g, 0.30 U/g, 0.46 U/g, and 0.31 U/g, respectively. This method was accurate, low-cost, as well as time and labor saving. In particular, the sensitivity of this method was much higher than that of the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. Moreover, interference from other components present in the feeds could largely be avoided.

**Key words:** high throughput; 3-methyl-2-benzothiazole hydrazine;  $\beta$ -glucanase; activity; feed; determination

$\beta$ -葡聚糖是以混合的  $\beta$ -(1-3)和  $\beta$ -(1-4)糖苷键连接形成的以  $\beta$ -吡喃葡萄糖为基本单位的 D-型葡萄糖聚合物<sup>[1]</sup>, 具有线型的空间结构, 属植物细胞壁中的结构性非淀粉多糖, 是谷物类细胞壁的主要成分之一, 约占其干重的 5.5%<sup>[2]</sup>, 也存在于褐藻、酵母、大型真菌的细胞壁<sup>[3]</sup>中, 也是某些细菌的分泌多糖<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2014-04-15

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2013CM027)

作者简介: 张永勤 (1965-), 女, 博士, 教授, 研究方向为酶工程、生化分析

$\beta$ -葡聚糖水解酶是一类酶系家族, 包括 1, 3-1, 4- $\beta$ -葡聚糖酶、1, 3- $\beta$ -葡聚糖酶、1, 2-1, 4- $\beta$ -葡聚糖酶、1, 4- $\beta$ -葡聚糖酶和 1, 3-1, 6- $\beta$ -葡聚糖酶, 均属于半纤维素酶类。广义而言,  $\beta$ -葡聚糖酶包括了一切能分解  $\beta$ -糖苷键连成的葡萄糖聚合物的酶系<sup>[5]</sup>。该酶系可使  $\beta$ -葡聚糖降解, 释放葡低聚糖、葡寡糖或葡萄糖等, 破坏细胞壁, 使细胞内容物释放出来, 从而降低植物细胞混合液的粘度, 有利于动物对营养物质的消化和吸收, 提高对粮食的转化率<sup>[6]</sup>。因此该酶在饲料、食品、酿酒、生物能源、纺织、造纸等工业具有广阔的应用前景。

酶活力是衡量酶生物活性的重要指标, 多糖水解酶活力的测定主要有黏度法、琼脂糖扩散法、生色底物法、酶联吸附分析法和还原端基法等, 通常采用的方法为还原端基法, 其中最常用的方法是 DNS 法<sup>[7-8]</sup>, 目前已广泛应用于  $\beta$ -葡聚糖酶的活力测定<sup>[9-13]</sup>。但由于该法定量不够准确<sup>[10]</sup>, 且灵敏度远低于 MBTH 法<sup>[14]</sup>, 不适合于成分复杂的配合饲料中痕量  $\beta$ -葡聚糖酶的活力测定。本文拟采用 MBTH 法, 以简便, 快速, 低用量, 高效率的高通量手段<sup>[15]</sup>取代人力物力消耗过大, 不利于大批量测定的试管法, 并结合微量恒温振荡器、酶标仪的特点, 通过关键参数优化, 建立配合饲料中痕量  $\beta$ -葡聚糖酶活力的测定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

$\beta$ -葡聚糖酶,  $1.47 \times 10^4$  U/g, 宁夏和氏璧生物技术有限公司; 葡萄糖, 国药集团化学试剂有限公司;  $\beta$ -葡聚糖, 武汉百特纯大分子科技有限公司; 3-甲基-2-苯并噻唑酮腓 (MBTH)、二硫苏糖醇 (DTT), Sigma; FE20 型数字酸度计, 梅特勒-托利多; 酶标仪, 美国 BIO-RAD 公司; 移液枪, ThermoElectron 公司; 恒温金属浴, 艾本森科学仪器有限公司; 配合猪饲料样品 1、2、3、4 分别为六和中期、六和前期、六和 UV2、六和北徐 (山东六和集团有限公司)

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 溶液的配制

##### 1.2.1.1 $\beta$ -葡聚糖溶液

准确称取 0.1000 g  $\beta$ -葡聚糖于小烧杯中, 并加入适量蒸馏水,  $80^\circ\text{C}$  水浴加热溶解后冷却, 转移到容量瓶中, 用蒸馏水定容至 25 mL, 以 0.1 mol/mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液为溶剂, 将定容好的  $\beta$ -葡聚糖溶液转移并定容至 50 mL 容量瓶中, 得 2 mg/mL 的  $\beta$ -葡聚糖溶液, 于  $4^\circ\text{C}$  贮藏备用。

##### 1.2.1.2 $\beta$ -葡聚糖酶饲料浸提液的配制

准确称取已粉碎至 80 目的饲料粉 1.0000 g, 加入 50 mL 0.05 M pH 5.0 缓冲液于小烧杯中, 冰浴条件下磁力搅拌 15 min 放置 5 min, 于  $4^\circ\text{C}$  条件下, 8000 r/min (6400RCF) 离心 15 min, 取上清液, 即得 20 mg/mL 的饲料浸提液, 将该溶液与酶溶液按 1:1 的比例充分混匀即得添加酶的饲料浸提液。

##### 1.2.1.3 MBTH 法所用溶液

硫酸铁铵试剂: 0.5%  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.5% 氨基磺酸, 0.5 mol/L 盐酸。

MBTH 试剂: 3 mg/mL MBTH 溶液和 1 mg/mL DTT 溶液等体积混合, 现用现配。

#### 1.2.2 还原糖的测定方法及标准曲线的绘制

在锥形微孔板中, 加入 50  $\mu\text{L}$  的葡萄糖溶液, 加入 50  $\mu\text{L}$  的 0.5M NaOH, 50  $\mu\text{L}$  MBTH 试剂, 充分混匀, 用恒温振荡器在  $80^\circ\text{C}$  条件下加热 15 min 后, 立即加入 100  $\mu\text{L}$  的硫酸铁铵试剂, 充分混匀待显色稳定后将溶液移入酶标板中, 于 630 nm 波长下测定其吸光度值。每个样品做 4 个平行样 (以下同)。

用于标准曲线绘制的 50  $\mu\text{L}$  葡萄糖溶液由 25  $\mu\text{L}$  的葡聚糖溶液 (1.2.1.2) 或者缓冲液与 25  $\mu\text{L}$  的具有不同浓度系列的葡萄糖溶液 (0~150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 相混合而配成终浓度为 0~75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的葡萄糖溶液, 并以所测吸光度值为纵坐标, 葡萄糖浓度为横坐标绘制标准曲线。

#### 1.2.3 $\beta$ -葡聚糖酶的活力测定方法及参数优化

##### 1.2.3.1 酶活力测定方法

将 96 孔微孔板中预热至酶解温度的 25  $\mu\text{L}$   $\beta$ -葡聚糖溶液与预热至同一温度的 25  $\mu\text{L}$   $\beta$ -葡聚糖酶浸提液充分混匀, 于恒温振荡仪上起始酶解反应, 准确计时, 酶解 30 min 后, 迅速用 12 道移液枪加入 50  $\mu\text{L}$  0.5M NaOH 溶液, 充分混匀以终止反应, 参照 1.2.2 的方法进行还原糖浓度的测定。酶解空白的制作方法与试样测定过程相同, 只是保温 30 min 后, 先加相同浓度的 NaOH, 然后再加相应浓度的酶溶液。活力单位可被定义为: 在上述条件下, 使每毫升酶解液中每分钟产生 1  $\mu\text{mol}$  相当于葡萄糖的还原糖端基的量为 1 个酶活力单位 (1U)。

##### 1.2.3.2 酶标准曲线的绘制

用 0.05 M pH 5.0 缓冲液配制酶溶液使其终浓度为 0~2.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 按照 1.2.3.1 的方法测定酶活力, 其中酶溶液的终浓度为 0~1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 以酶解产物的吸光度值为纵坐标, 以酶溶液浓度为横坐标绘制标准曲线。

##### 1.2.3.3 酶解温度对底物稳定性及酶活力测定的影响

按照 1.2.3.1 的方法测定酶活力, 其中酶解温度分别为  $30^\circ\text{C}$ 、 $37^\circ\text{C}$ 、 $45^\circ\text{C}$ 、 $50^\circ\text{C}$ 、 $55^\circ\text{C}$ , 以不含酶的底物溶液为研究对象, 考查其在不同温度条件下的还原糖浓度变化, 以考查温度对底物稳定性的影响。

##### 1.2.3.4 pH 对酶活力测定的影响

按照 1.2.3.1 的方法测定酶活力, 其中配制酶溶液的缓冲液的 pH 分别为 4.5、5.0、5.5、6.0 以不同 pH 条件下以酶解产物的吸光度值为考查对象, 以考查 pH 对酶活力测定的影响。

#### 1.2.4 饲料中酶标准曲线的绘制及方法验证

将按照 1.2.1.2 的方法配制的 0~2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的  $\beta$ -葡聚糖酶饲料浸提液代替 1.2.3 的方法中的酶液来测定酶

活力并绘制酶标准曲线。

回收率实验: 加标回收率就是在测定样品的同时, 于一样品的子样中加入一定量的标准物质进行测定, 将其测定结果扣除样品的测定值, 而得到加入标准物质的回收率。

其计算公式为: 回收率/%=(加标试样测定值-试样测定值)/加标量×100%, 本实验采用的加标量为 0.2 μg/mL 和 0.5 μg/mL。

检测限(DL)和定量限(QL)是由回归直线方程确定<sup>[16]</sup>, 由方程(1)和(2)计算所得

$$DL=3 \times S_{b1}/b \quad (1)$$

$$QL=10 \times S_{b1}/b \quad (2)$$

注:  $S_{b1}$  是酶空白溶液的标准偏差;  $b$  为回归方程的斜率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 葡萄糖标准曲线的建立

$\beta$ -葡聚糖酶可催化  $\beta$ -葡聚糖水解释为低聚糖从而增加还原端基的量, 通过测定后者的增加速率即得该酶的酶活力。还原端基一般以相当于葡萄糖的量来计算。由于产生的还原端基存在于含有大量底物分子的酶解液中, 且测定是在酶解初期, 可认为此时底物分子水解程度极少, 因此, 本文以含有底物的葡萄糖溶液模拟酶解液, 建立了葡萄糖标准曲线, 从而避开底物对测定的干扰。DNS 法<sup>[17]</sup>的葡萄糖测量范围在 (0~2 mg/mL), 因此, 与 DNS 法相比, 该法 (0~75 μg/mL, 即 0~0.42 μmol/mL) 具有超高灵敏度, 由于测定是在较高的饲料稀释倍数下测定, 这极大程度上降低了其他干扰因素对测定的影响。

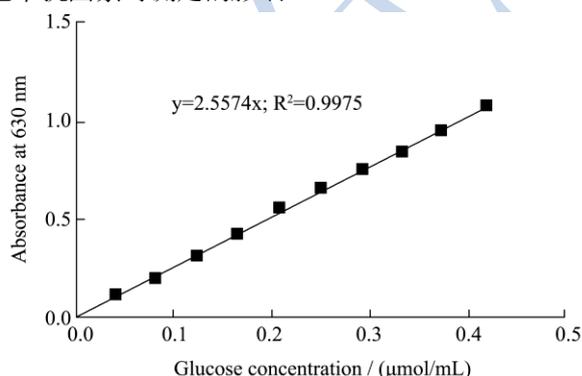


图1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

### 2.2 温度对酶活力测定的影响

酶活力测定的最适温度是酶在酶解过程中受多种因素影响的综合结果, 而且, 对  $\beta$ -葡聚糖酶而言, 其热稳定性因其来源不同而差别各异, 所以, 用于酶活

力测定的酶解温度不能简单地使用酶的最适温度。如图 2b, 在相同的酶质量浓度条件下, 温度越高, 体现酶活力越大, 但是, 随着酶质量浓度的提高, 其酶活力并未呈线性增长, 这特别体现在高温区域。而且, 由图 2a 可以看出, 随着温度的升高, 本底吸光度值也在逐渐升高, 这主要是由于  $\beta$ -葡聚糖的热稳定性较差, 其分子内糖苷键在高温条件下发生部分断裂, 进而使还原糖浓度升高, 导致底物  $\beta$ -葡聚糖在酶解过程中同时发生了非酶降解, 尽管测定时可消掉本底值, 但仍会造成酶解动力学偏移。综上两方面因素, 为防止底物的非酶降解和  $\beta$ -葡聚糖酶的热失活, 酶活力测定应选择在较低温度进行。然而, 温度过低会使底物粘度增加, 从而降低酶解的传质速率且增加测量误差, 而且, 还要考虑到温度设置的可行性 (如在炎热的夏季等), 因此, 在 30 °C 条件下进行酶活力测定是比较合理的, 在该条件下  $\beta$ -葡聚糖酶浓度在 0~0.84 μg/mL (0~12.3 mU/mL) 范围内呈线性相关, 其线性相关系数  $R^2=0.9959$ 。当然, 在实验技术允许的情况下, 37 °C 也可用于酶活力测定, 其线性范围在 0~0.48 μg/mL (0~7.0 mU/mL)。

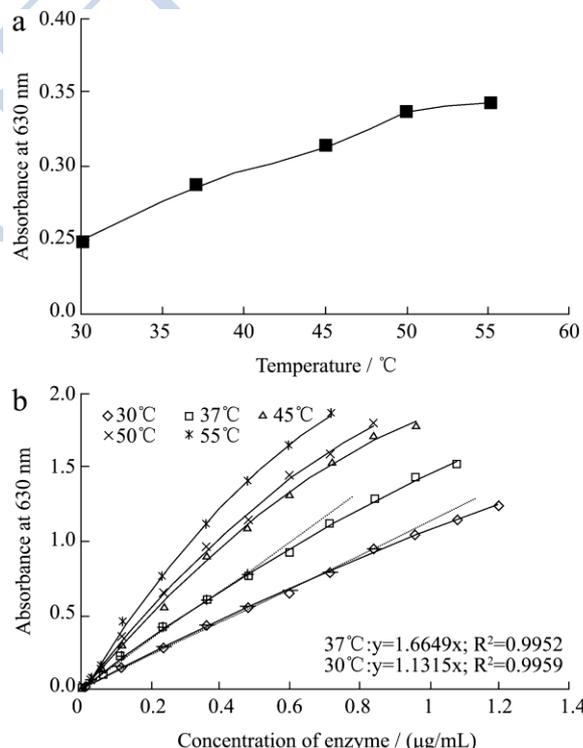


图2 温度对酶活力测定的影响

Fig.2 Effect of temperature on the activity assay

注: 图中 a 和 b 分别为温度对底物和酶解产物还原端产生量的影响。

### 2.3 pH 对酶活力测定的影响

由于酶活力的大小受 pH 影响很大, 并且该酶在

最适 pH 条件下催化酶解进程才能体现最大酶活力。由图 3 可以看出,  $\beta$ -葡聚糖酶活力的最适 pH 为 5.0, 不因酶浓度变化而变化。

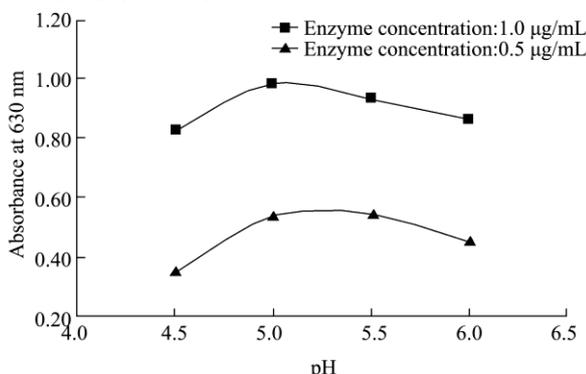


图 3 pH 对酶活力测定的影响

Fig.3 Effect of pH on the activity assay

#### 2.4 纯酶和饲料中酶活力、回收率、检测限、定量限的测定

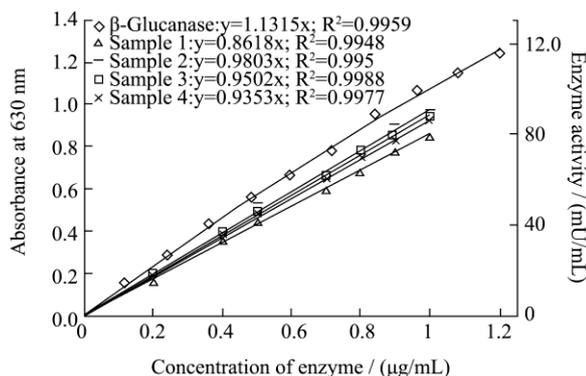


图 4 纯酶和四种饲料中酶标准曲线

Fig.4 Standard curves of the pure enzyme and of the four feeds

注: 方程中, y: Absorbance.

表 1 纯酶和四种饲料酶活力测定的回收率、检测限及定量限

Table 1 The recovery, detection limit and quantitation limit of activity assay in the four feedstuffs and the pure enzyme

	回收率/%			工作浓度范围/(U/g)	检测限/(U/g)	定量限/(U/g)
	加标 1*	加标 2**	平均			
纯酶	94.4	92.0	93.1	0~12.3***	0.37***	1.24***
样品 1	104.4	90.5	97.5	0~2.94	0.10	0.33
样品 2	118.5	90.2	104.3	0~2.94	0.09	0.30
样品 3	99.4	94.6	97.0	0~2.94	0.14	0.46
样品 4	114.4	98.4	106.4	0~2.94	0.09	0.31

注: \*加标 1: 为加标量为 0.2 µg/mL; \*\*加标 2: 加标量为 0.5 µg/mL; \*\*\* 单位为 mU/mL。

以山东六和饲料有限公司提供的四种配合饲料为实验材料, 分别进行了酶活力测定和方法验证, 并以  $\beta$ -葡聚糖酶的纯酶制品为对照。从表 1 和图 4 可看出,

纯酶和四种饲料样品的酶活力测定回收率接近理论值 100%, 在酶浓度曲线斜率方面, 纯酶的明显大于饲料中的, 即, 相同酶质量浓度下的酶活力, 纯酶的明显高于饲料的, 可能原因是饲料添加剂中含有抑制因子抑制了酶活力, 从而使酶活力部分丧失。四种饲料中标准曲线的线性均较好, 其斜率存在一定差异, 可能是由在不同饲料中存在的不同抑制因子或激活因子造成的; 此外, 虽然该分析方法测得的纯酶的检测限和定量限低于四种饲料 (可能是饲料添加剂中的抑制因子或酶浸提不够彻底所致), 但是该法测得的四种饲料检测限和定量限已足以满足饲料中酶活力测定的需要<sup>[18]</sup>, 这是 DNS 法无法企及的。

### 3 结论

本文基于高通量分析法对  $\beta$ -葡聚糖酶活力测定的影响参数进行了研究, 并且建立了  $\beta$ -葡聚糖酶活力测定的整个体系。结果表明, 在最适酶解 pH5.0, 酶解温度 30 °C 条件下进行酶活力测定, 酶工作浓度范围为 0~0.84 µg/mL (0~12.3 mU/mL) 时与还原端基生成速率呈线性相关, 本法测  $\beta$ -葡聚糖酶及其在四种饲料样品中的酶工作浓度范围均为 0~1.0 µg/mL (0~2.94 U/g), 酶活力的平均回收率分别为 93.1%、97.5%、104.3%、97.0%、106.4%,  $\beta$ -葡聚糖酶活力检测限为 0.37 mU/mL, 定量限为 1.24 mU/mL, 四种饲料酶活力检测限分别为 0.10 U/g、0.09 U/g、0.14 U/g、0.09 U/g, 定量限分别为 0.33 U/g、0.30 U/g、0.46 U/g、0.31 U/g。高通量法跟试管法相比较操作简单方便、迅速、试剂用量少、处理样品量大、成本较低、效率高等优点。

### 参考文献

- [1] Navarro A, Manzanares P, Carbonell JV, et al. Determination of 1, 3-1, 4- $\beta$ -D-glucanase activity by a calcofluor-flow injection analysis method [J]. J. Cereal. Sci., 1995, 22: 275-284
- [2] Bai Ying-guo, Wang Jian-she, Zhang Zhi-fang, et al. Expression of an extremely acidic  $\beta$ -1, 4-glucanase from thermoacidophilic Alicyclobacillus sp. A4 in Pichia pastoris is improved by truncating the gene sequence [J]. Agric. Food Chem., 2010, 58(3): 1970-1975
- [3] Ko YT, Lin Yu-ling. 1, 3- $\beta$ -Glucan quantification by a fluorescence microassay and analysis of its distribution in foods [J]. Agric. Food Chem., 2004, 52(11): 3313-3318
- [4] Stasinopoulos SJ, Fisher PR, Stone BA, Stanisich VA. Detection of two loci involved in (1-3)- $\beta$ -glucan (curdian) biosynthesis by

- Agrobacterium sp. ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene [J]. Glycobiology, 1999, 9: 31-41
- [5] 邹东恢,江洁. $\beta$ -葡聚糖酶的开发与应用研究[J].农产品加工,2005,42(8):7-9  
ZOU Dong-hui, JIANG Jie. Developing and application research of  $\beta$ -glucanase [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2005, 42(8): 7-9
- [6] Officer DI. Effect of multi-enzyme supplements on the growth performance of piglets during the pre- and post-weaning periods [J]. Anim. Feed Sci. Tech., 1995,55: 55-65
- [7] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analyt Chem., 1959, 31(3):426-428
- [8] 张永勤,薛长湖,汤浩源,等.还原糖的可见分光光度法研究进展[J].食品与发酵工业,2007,33(5):97-100  
ZHANG Yong-qin, XUE Chang-hu, TANG Hao-yuan. Progress of visible spectrophotometric determination of reducing sugar [J]. Food and Fermentation Industries, 2007, 33(5): 97-100
- [9] Cosson T, Vendrell AM Perez, Teresa B Gonzalez, et al. Enzymatic assays for xy lanase and  $\beta$ -glucanase feed enzymes [J]. Anim. Feed Sci. Tech., 1999, 77(3): 345-353
- [10] Sengupta S, Jana ML, Sengupta D, et al. A note on the estimation of microbial glycosidase activities by dinitrosalicylic acid reagent [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000, 53(6): 732-735
- [11] 唐艳斌,闫巧娟,江正强,等.枯草芽孢杆菌产 $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶的响应面优化[J].微生物学通报,2013,40(4):551-557  
TANG Yan-bin, YAN Qiao-juan, JIANG Zheng-qiang, et al. Optimization of fermentation conditions for  $\beta$ -1, 3-1, 4-glucanase production by the thermophilic bacillus subtilis d-6 using the response surface methodology [J]. Microbiology China, 2013, 40(4): 551-557
- [12] 邵敏,李长福,葛正龙.基于易错 PCR 技术定向进化枯草芽孢杆菌 $\beta$ -葡聚糖酶[J].农业生物技术通报,2013,12:141-145  
SHAO Min, LI Chang-fu, GE Zheng-long. Directed Evolution of Neutral Endoglucanase Gene by Error-prone PCR [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013,12: 141-145
- [13] 李一男,贾会勇,闫巧娟,等.定向进化提高嗜热拟青霉 J18 耐热  $\beta$ -1, 3-1, 4-葡聚糖酶在酸性条件下的催化能力[J].生物工程学报,2011,27(12):1797-1804  
LI Yi-nan, JIA Hui-yong, YAN Qiao-juan, et al. Improvement of catalytic capability of paecilomyces thermophila j18 thermostable  $\beta$ -1, 3-1, 4-glucanase under acidic condition by directed evolution [J]. Chinese Journal Technology, 2011, 27(12): 1797-1804
- [14] 张永勤,王哲平,宋雨梅,等.还原糖测定方法的比较研究[J].食品工业科技,2010,31(6):323-326  
ZHANG Yong-qin, WANG Zhe-ping, SONG Yu-mei, et al. Comparative study on the determination of reducing sugar [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(6): 323-326
- [15] 张永勤,曾凡伟. $\beta$ -葡聚糖酶活力测定方法的研究进展[J].食品科学,2011,32(19):316-320  
ZHANG Yong-qin, ZENG Fan-wei. Research progress of determination methods for  $\beta$ -glucanase activity [J]. Food Science, 2011, 32(19): 316-320
- [16] Miller JN. Basic statistical methods for analytical chemistry Part 2. Calibration and regression methods a review [J]. Analyst, 1991, 116: 3-14
- [17] Ramada MHS, Lopes FÁC, Ulhoa CJ, et al. Optimized microplate  $\beta$ -1, 3-glucanase assay system for *Trichoderma spp.* screening [J]. J. Microb. Meth., 2010, 81: 6-10
- [18] Rosefelder P, Eklund M, Mosenthin R. Nutritive value of wheat and wheat by-products in pig nutrition: a review [J]. Anim. Sci. Technol., 2013, 185: 107-125