

酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖测定方法研究

王志¹, 谢婷¹, 李冬芝¹, 潘亚芳¹, 陈雄¹, 曾雨雷², 李彪²

(1. 工业发酵湖北省协同创新中心, 发酵工程教育部重点实验室, 湖北工业大学生物工程学院, 湖北武汉 430068)

(2. 安琪酵母股份有限公司, 湖北宜昌 443000)

摘要: 建立了刚果红法快速检测酵母三股螺旋结构活性 β -葡聚糖的方法, 检测体系中酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的助溶剂二甲基亚砜浓度为 2%, 最大吸收波长为 523 nm, β -葡聚糖的质量(Y)与 ΔOD_{523} 值(x)的回归方程为 $Y=923.0x-5.641$, 线性系数 $R^2=0.996$, β -葡聚糖的质量在 35~199 μg 与相应的 ΔOD 有良好的线性关系。刚果红法测得酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量的精密度高, 其相对标准偏差为 2.21%; 该方法测得酵母细胞壁样品中三股螺旋结构 β -葡聚糖的含量为 18.33%, 回收率在 97.68~103.90% 之间, 平均回收率为 99.60%, 回收率的相对标准偏差为 2.32%。说明刚果红法测定三股螺旋结构 β -葡聚糖的回收率高, 适用于酵母三股螺旋结构活性 β -葡聚糖的测定, 是一种快速、简便且高效的适用于工业生产过程检测的测定方法。

关键词: 酵母葡聚糖; 生物活性; 三股螺旋结构; 刚果红法

文章编号: 1673-9078(2014)11-213-217

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.037

Method to Determine the Triple-Helical β -glucan Content in Yeast

WANG Zhi¹, XIE Ting¹, LI Dong-zhi¹, PAN Ya-fang¹, CHEN Xiong¹, ZENG Yu-lei², LI Biao²

(1. Hubei Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation, Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), College of bioengineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

(2. Angel Yeast Co., LTD., Yichang 443000, China)

Abstract: A quick method to determine the triple-helical β -glucan content in yeast using Congo red was established. The final concentration of dimethyl sulfoxide, which was the cosolvent for the yeast triple-helical β -glucan in the measuring system, was 2%, and the maximum absorption wavelength of the Congo red system was 523 nm. The regression equation for the β -glucan mass (Y) and ΔOD_{523} value (X) was $Y=923.0x-5.641$, with a coefficient of determination (R^2) of 0.996. The β -glucan mass and ΔOD demonstrated a strong linear relationship in the mass range of 35~199 μg of β -glucan. High accuracy was achieved using the Congo red method to measure yeast triple-helical β -glucan, with a relative standard deviation (RSD) of 2.21%. Using this method, the content of triple-helical β -glucan in yeast cell wall samples was 18.33%. The recovery rate varied from 97.68% to 103.90% (average, 99.60%), and the RSD of the recovery rate was 2.32%. The results indicated that the Congo red method used to determine the triple-helical β -glucan content had a high recovery rate and was suitable to measure yeast triple-helical β -glucan. It was a rapid, simple, and efficient determination method that could meet the demands of the industrial production process.

Key words: yeast β -glucan; biological activity; triple helical structure; Congo red method

酵母是一类与人类生活密切相关的真核微生物。酿酒酵母细胞壁含有碱不溶性、碱溶性、酸溶性葡聚糖^[1], 碱不溶性 β -葡萄糖即使使用热碱处理也能保持酵母细胞形状和坚固性。碱不溶性葡聚糖以 β -1,3-葡萄糖为主链以 β -1,6-葡萄糖为侧链, 呈三股螺旋高级结构^[2], 可作为膳食纤维发挥作用^[3], 另外, 具有一定分子量的三股螺旋结构的 β -1,3-1,6-葡聚糖具有增强细胞免疫力、提高巨噬细胞活性及具有抗肿瘤等功效

收稿日期: 2014-05-26

基金项目: 湖北省重大科技专项项目 (2012ACA15)

作者简介: 王志 (1971-), 男, 副教授, 从事微生物工程研究

通讯作者: 陈雄 (1969-), 男, 教授, 从事功能酵母与酿造微生物研究

^[4-6], 其作用机理是 β -葡聚糖通过特异性受体与粒细胞和巨噬细胞特异性结合, 启动粒细胞和巨噬细胞, 引起 T 细胞和 B 细胞的增殖^[7]。

葡聚糖纯度的测定方法有酸水解法和酶试剂盒法, 通常是将其处理成为葡萄糖, 用一定的方法测定葡萄糖的含量, 再将葡萄糖与葡聚糖按照一定关系折算, 得到葡聚糖的纯度。酸 (如: 硫酸、三氟乙酸、盐酸) 水解法中的酸处理时间、温度和酸浓度是影响测定结果的重要因素^[8-9]。酶试剂盒法是适宜浓度的盐酸与高纯的 1,3- β -葡聚糖外切酶和 β -葡糖苷酶混合彻底水解葡聚糖成葡萄糖, 该方法检测精度高, 但是样品前处理以及操作程序复杂、费用昂贵, 不能满足工

业生产快速、准确的检测要求。而且上述这些方法仅能确定葡聚糖的纯度,不能用于测定具有三股螺旋结构活性 β -葡聚糖含量的检测。

刚果红分子与三股螺旋结构 β -葡聚糖结合后,发生特征性红移,且红移后在 523 nm 处吸收值在一定条件下与三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量浓度存在线性关系^[10]。因此,以实验室自制的酵母细胞壁碱不溶性葡聚糖,即酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖为实验材料,研究并优化了刚果红法测定酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖体系的参数条件,建立了快速、简便且高效的检测方法,对于指导、优化酵母三股螺旋结构活性 β -葡聚糖的生产非常有意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂

酵母碱不溶性三股螺旋结构 β -葡聚糖由实验室自备;二甲亚砜(DMSO)、氯化钠、柠檬酸、柠檬酸钠等,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产;0.08%的刚果红溶液用pH为7的0.20 mol/L的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液配制。

1.1.2 仪器与设备

立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;TG18M台式高速离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司;RE-52AA旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;SHZ-D(III)循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限责任公司;BCD-575WYM/E34容声冰箱,广东容声电器股份有限公司;UVmini-1240紫外可见分光光度计,武汉天行健科学仪器设备有限公司;DF-IOIS集热式磁力搅拌器,金坛市华龙实验仪器厂。

1.2 方 法

1.2.1 酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的纯化

参考文献^[11]进行。称取碱不溶性酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖 13.50 g,将其溶于一定量的蒸馏水中制成悬浮液,搅拌均匀,置于立式压力蒸汽灭菌器中,125℃处理 2 h,冷却至 45℃,4000 r/min,离心 15 min。离心后将沉淀用蒸馏水复溶,搅拌混匀,4000 r/min,离心 15 min,重复水洗两次,离心。沉淀用一定量蒸馏水稀释混匀,加热至 60℃,调节 pH=9,分别在 0 h、1 h、2 h 时边搅拌边加入一定量蛋白酶,处理 2 h 后,用冰醋酸中和,4000 r/min,离心 15 min,离心后沉淀用蒸馏水复溶,搅拌混匀,4000 r/min,离心 15 min,重复水洗两次,离心。沉淀用过量的丙酮过夜处理后

抽滤得到沉淀,将其置于-20℃预冷冻 24 h,-60℃冷冻干燥 10 h,得到浅乳白色、松软的酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖粉末,经试剂盒酶法检测其纯度为 65%。

1.2.2 酵母葡聚糖标准溶液配制

称取 90 mg 纯化的酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖,加 DMSO 溶解,在集热式磁力搅拌器中 60℃恒温水浴 3 h,用 0.20 mol/L 的 NaCl 定容至 500 mL,制得 117 μ g/mL 的标准品溶液,备用。

1.2.3 刚果红法测定体系

①刚果红组:对照管:3.50 mL 的 0.20 mol/L 的 NaCl,加 pH 为 7 的 0.20 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 3 mL 及 0.50 mL 的刚果红溶液。实验管:系列标准品样液(0.30~1.70 mL)用 0.20 mol/L 的 NaCl 补足 3.50 mL,加 pH 为 7 的 0.20 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 3 mL 以及 0.50 mL 的刚果红溶液。

②背景组:对照管:3.50 mL 的 0.20 mol/L 的 NaCl,加 pH 为 7 的 0.20 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 3.50 mL。实验管:系列标准样液(0.30~1.70 mL)用 0.20 mol/L 的 NaCl 补足 3.50 mL,加 pH 为 7 的 0.20 mol/L 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 3.50 mL。

1.2.4 刚果红法检测体系最大吸收波长的确定

取 0.70 mL 标准溶液,按 1.2.3 得到酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量为 82 μ g 的检测样,用分光光度计测不同波长下的 OD 值,样品中酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量对应的是 Δ OD 值(刚果红组 OD 值减去背景组 OD 值),以波长(nm)为横坐标, Δ OD 值为纵坐标,作图,以确定最大吸收波长。

1.2.5 刚果红法标准溶液中 DMSO 最适浓度的确定

1.2.2 制备中,以 DMSO 为变量,其终浓度分别为 1%、2%、3%、5%、8% 和 10%,制备标准溶液,取 0.70 mL 标准溶液,按 1.2.3 制备酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖质量为 82 μ g,其质量浓度为 11.70 μ g/mL 的检测样,在 523 nm 处测 OD 值,样品中三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量对应的是 Δ OD 值,以标准溶液中 DMSO 浓度为横坐标, Δ OD 值为纵坐标,作图,判断标准溶液配制时 DMSO 最适浓度。

1.2.6 刚果红法标准溶液配制以及刚果红法测定体系

称取 90 mg 纯化酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖,加 10 mL DMSO 溶解,在集热式磁力搅拌器中 60℃恒温水浴 3 h,用 0.20 mol/L 的 NaCl 定容至 500 mL,制得 117 μ g/mL 的标准品溶液,备用。

按 1.2.3 制得刚果红法检测酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖质量的刚果红组和背景组的测定体系如表一和

表 2。

表 1 刚果红法测酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的刚果红组测定体系

Table 1 Summary of the Congo red group using the Congo red method to determine the triple helical β -glucan content in yeast

葡聚糖含量/ μg	0	35	59	82	105	129	152	176	199
葡聚糖标样/mL	0	0.30	0.50	0.70	0.90	1.10	1.30	1.50	1.70
0.2 mol/L NaCl/mL	3.50	3.20	3.00	2.80	2.60	2.40	2.20	2.00	1.80
Buffer/mL	3	3	3	3	3	3	3	3	3
刚果红/mL	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

表 2 刚果红法测酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的背景组测定体系

Table 2 Summary of the control group using Congo red method to determine the triple-helical β -glucan content in yeast

葡聚糖含量/ μg	0	35	59	82	105	129	152	176	199
葡聚糖标样/mL	0	0.30	0.50	0.70	0.90	1.10	1.30	1.50	1.70
0.2 mol/L NaCl/mL	3.50	3.20	3.00	2.80	2.60	2.40	2.20	2.00	1.80
Buffer/mL	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50

1.2.7 刚果红法测定酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量标准曲线的绘制

按表一和表二的方法得到刚果红组和背景组的测定体系，利用紫外可见分光光度计在波长 523 nm 处测 OD 值，样品中酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量对应的是 ΔOD 值，以 ΔOD 值为横坐标，三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量 (μg) 为纵坐标，绘制标准曲线。

1.2.8 刚果红法测定体系精密度

取 0.70 mL 标准溶液，按 1.2.3 得到酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖质量为 82 μg 的检测样，利用紫外可见分光光度计在波长 523 nm 处测得 ΔOD 值，平行测定 5 次，将 ΔOD 值代入标准曲线，计算其相对标准偏差 (RSD)。

1.2.9 刚果红法测定体系回收率

称取酵母细胞壁样品 300 mg，用 10 mL DMSO 溶解，在集热式磁力搅拌器中 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 3 h，用 0.20 mol/L 的 NaCl 定容至 500 mL，备用。

分别取 0.50 mL 酵母细胞壁样液于 10 mL 比色管中，同时分别加入酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖标准溶液 0、0.10、0.20、0.30、0.40 和 0.50 mL，组成样液体系，按 1.2.3 制得刚果红法测定体系，摇匀后在波长 523 nm 处测得 ΔOD 值，将 ΔOD 值代入标准曲线，计算酵母细胞壁样品中三股螺旋结构 β -葡聚糖的含量、回收率和 RSD。其中：

$$\text{酵母细胞壁样品中三股螺旋结构}\beta\text{-葡聚糖的含量}(\%) = m_1 V / 1000 m V_1 \times 100\%$$

注： m_1 -酵母细胞壁样品中三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量 (μg)，代入标准方程计算得到； m -酵母细胞壁样品质量 300 mg； V -酵母细胞壁样品制成的样液总体积 500 mL； V_1 -检测体系中酵母细胞壁样品制成的样液体积 0.5 mL。

$$\text{回收率}(\%) = A / (B + C) \times 100\%$$

注：A-加入酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖后样品总的三股螺旋结构 β -葡聚糖测定质量 (μg)；B-酵母细胞壁样品中三股螺旋结构 β -葡聚糖的测定质量 (μg)；C-加入标准酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量 (μg)。

1.2.10 数据分析

所得实验数据均为最少三次平行实验的平均值，其中标准曲线除外。

2 结果与分析

2.1 刚果红法检测体系最大吸收波长的确定

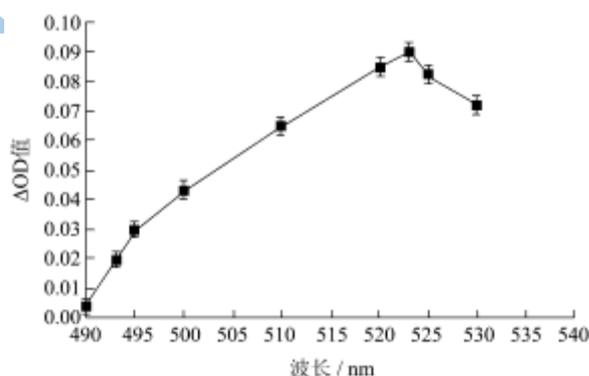


图 1 酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的刚果红体系的吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra of the Congo red system for yeast triple-helical β -glucan

刚果红可与 β -1,3-1,6-葡聚糖的三股螺旋结构发生相互作用，从而使复合分子最大吸收波长由 493 nm 红移至 523 nm，且在一定三股螺旋结构 β -葡聚糖浓度的范围内，吸光值的增加与三股螺旋结构 β -葡聚糖浓度的增加成线性关系^[10]。在最大吸收波长下进行 OD 值的测定将有效地提高测定灵敏度。测定体系中质量为 82 μg 的酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖 (质量浓度为 11.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对应的 ΔOD 值与吸收波长之间的关系如

图 1 所示。

测定体系在 523 nm 处有最大吸收峰，故确定刚果红法检测酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖含量的最大吸收波长为 523 nm。这与经典文献^[10]报道一致。

2.2 刚果红法标准溶液中 DMSO 最适浓度的确定

酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖不溶于水，且不溶于无水乙醇、丙酮等有机溶剂，但能溶解于 DMSO。标准溶液配制时需要借助 DMSO 溶解酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖，但过高 DMSO 可能会对酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的高级结构有所破坏^[12]，从而影响刚果红检测体系的精密度。因此，控制测定体系中 DMSO 浓度是十分必要的。刚果红法标准溶液中 DMSO 浓度与含有 82 μg 的酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖样品（质量浓度为 11.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）对应的 ΔOD 值之间的关系如图 2 所示。

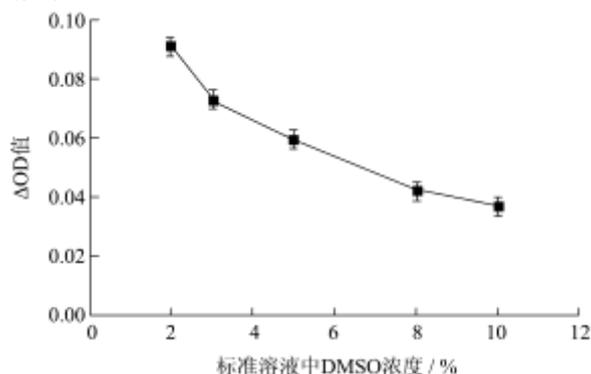


图 2 刚果红测定体系中 DMSO 浓度对 ΔOD_{523} 值的影响

Fig.2 Influence of DMSO concentration on the ΔOD_{523} value in the Congo red system

标准样液中 DMSO 浓度为 1~1.50% 时样品溶解的不好，有絮状沉淀存在，因此，DMSO 的浓度采用 2~10%。从图二可以看出，随着 DMSO 浓度增加，酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖质量为 82 μg （质量浓度为 11.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的测定体系对应的 ΔOD 值逐渐减小，

表 3 刚果红体系的精密度

Table 3 Accuracy of the Congo red system

	重复实验次数					平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5		
ΔOD 值/A	0.091	0.094	0.096	0.093	0.092	0.093	2.08
酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖质量计算值/ μg	78.35	81.12	82.97	80.20	79.28	80.38	2.21

通过对酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖质量为 82 μg 的检测样（质量浓度为 11.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）重复性实验，对该方法的精密度进行测定，实验结果如表三所示：测得酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖质量平均值为 80.38

其中 DMSO 浓度为 2% 时 ΔOD 值最大，比 DMSO 浓度为 3% 和 5% 的 ΔOD 值分别增加了 25%、54%；比 8% 和 10% 的 ΔOD 值分别提高了近 1.20 倍和 1.50 倍。这与过高浓度的 DMSO 会影响多糖高级结构中氢键的稳定性有关^[12]。2% 的 DMSO 溶解体系稳定而且 ΔOD_{523} 值最大，因此，确定标准溶液中 DMSO 最适浓度为 2%。

2.3 刚果红法测定三股螺旋结构 β -葡聚糖标准曲线的绘制

按 1.2.7 的方法，以酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量对应的 ΔOD 值为横坐标，以相应的三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量 (μg) 为纵坐标，绘制标准曲线如图 3 所示。

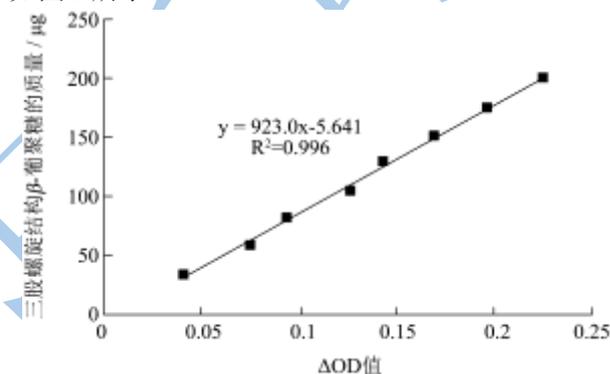


图 3 刚果红法测得酵母三螺旋结构 β -葡聚糖的标准曲线

Fig.3 Standard curve of yeast triple-helical β -glucan using the Congo red method

回归方程为 $Y=923.0x-5.641$ ，三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量与 ΔOD 值的线性系数 $R^2=0.996$ 。刚果红法测定酵母三螺旋结构 β -葡聚糖时，酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量在 35~199 μg 与 ΔOD 值有良好的线性关系。

2.4 刚果红法测定体系精密度

精密度测定结果如表 3 所示。

μg ，RSD 为 2.21%，表明该方法检测重复性好，精密度高。

2.5 刚果红法测定体系回收率

称取酵母细胞壁样品 300 mg, 溶解、定容至 500 mL, 分别加入不同质量的酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖, 按 1.2.3 制得刚果红法测定体系, 计算酵母细胞壁

样品中酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖、回收率和 RSD。回收率测定结果如表 4 所示。

表 4 刚果红体系的回收率

Table 4 Recovery rate for the Congo red system

加入酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖质量/ μg	测得酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖总质量/ μg	酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖的加样总质量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0	54.99	54.99	100.00		
11.70	65.14	66.69	97.68		
23.40	77.14	78.39	98.41		
35.10	88.22	90.09	97.92	99.60	2.32
46.80	105.76	101.79	103.90		
58.50	113.14	113.49	99.69		

由表 4 看出: 回收率在 97.68~103.90%之间, 平均回收率为 99.60%, RSD 为 2.32%。同时由上表可知, 0.50 mL 的酵母细胞壁样品中三股螺旋结构 β -葡聚糖的质量为 54.99 μg , 按 1.2.9 中关于酵母细胞壁样品中三股螺旋结构 β -葡聚糖的计算公式, 计算得酵母细胞壁样品中三股螺旋结构 β -葡聚糖的含量为 18.33%。

通过加样回收率测定该方法的准确度, 结果表明其测定准确度较高, 完全能够满足快速测定的需要。

3 结论

3.1 建立了检测酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖质量的刚果红检测方法, 精密度和准确度均较高, 测得酵母三股螺旋结构 β -葡聚糖质量 RSD 值分别为 2.21% 和 2.32%, 是一种快速、简便且高效的测定方法。

3.2 实验结果表明: 酵母葡聚糖标准溶液中 DMSO 终浓度为 2%, 刚果红法检测体系的最大吸收波长为 523 nm, 利用此方法检测得酵母细胞壁样品中三股螺旋结构 β -葡聚糖的含量为 18.33%。

3.3 三股螺旋结构是 β -葡聚糖具有生物活性的前提, 因此, 确定的三股螺旋结构 β -葡聚糖质量的快速测定方法对于指导、优化活性 β -葡聚糖的生产非常有意义。

参考文献

- [1] Bohn J, Kogan G, Kacurakova M, et al. Microbial(1 \rightarrow 3)- β -D-Glucans, their preparation, physico-chemical characterization and Immunomodulatory activity [J]. Carbohydrate Polymers, 1999, 38: 247-253
- [2] David J Manners, Alan J Masson, James C Paterson. The structure of a β -1,3-glucan from yeast cell walls [J]. Biochem. J., 1973A, 135: 19-36
- [3] 王淼, 丁霄霖. 葡聚糖生物活性与结构的关系[J]. 无锡轻工大学学报, 1997, 16(2): 90-94

- WANG Miao, DING Xiao-lin. Relationship between biological activity and structure of glucan [J]. Journal of Wuxi Light Industry University, 1997, 16(2): 90-94
- [4] 何朝勇, 王立为. 多糖的免疫调节作用综述[J]. 安徽中医学院学报, 2002, 21(4): 62-64
- HE Chao-yong, WANG Li-wei. Review the immunoregulatory effects of polysaccharides [J]. Journal of Anhui Institute of Traditional Chinese Medicine, 2002, 21(4): 62-64
- [5] Fen Qin, Finn L Aachmann, Bjorn E Christensen. Chain length distribution and aggregation of branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90: 1092-1099
- [6] WANG Chenglong, et al. Progress on preparation and application of water-soluble yeast glucan [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2010, 31(12): 128-131
- [7] Li B, Allendorf D J, Hansen R, et al. Yeast β -glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-Phosphatidylinositol 3-kinase pathway [J]. The Journal of Immunology, 2006, 177: 1661-1665
- [8] 王福荣. 生物工程分析与检验[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 148. WANG Fu-rong. Biological engineering analysis and testing [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005: 148
- [9] 孔庆胜, 魏洪伟, 等. 多糖类的生物功能[J]. 济宁医学院学报, 1998, 21(3): 80-82. KONG Qing-sheng, WEI Hong-wei, et al. Biological function of polysaccharide [J]. Journal of Jining Medical College, 1998, 21(3): 80-82
- [10] J Nitschke, et al. A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms [J]. Food Chemistry, 2011, 127: 791-796
- [11] 祁业明. 酵母葡聚糖的研制[D]. 天津: 天津科技大学, 2007.

- QI Ye-Ming. The development of yeast glucan [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2007
- [12] Marit Sletmoen, Bjørn T. Stokke. Review higher order structure of (1,3)- β -D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities [J]. Biopolymers, 2008, 89(4): 310-211

