

# 酵母细胞壁 $\beta$ -D-葡聚糖定量测定方法的比较分析

田晓丽<sup>1,2</sup>, 杨萍<sup>1,\*</sup>, 姜文侠<sup>1,\*</sup>

(1.天津市工业生物系统与过程工程重点实验室, 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308; 2.天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:**通过对酵母胞壁不溶性 $\beta$ -D-葡聚糖的几种定量测定方法的比较分析, 表明经酸水解法处理后得到的测定结果偏高, 经酸-酶水解法处理后的测定结果更准确; 对水解后产生的葡萄糖采用生物传感仪法定量, 结果稳定, 操作时间短, 更适合在生产过程和质量控制中使用; 待测样品中的 $\alpha$ -葡聚糖对测定结果有明显的干扰,  $\beta$ -D-葡聚糖含量应为总葡聚糖含量与 $\alpha$ -葡聚糖含量之差。

**关键词:**  $\beta$ -D-葡聚糖; 酵母细胞壁; 水解方法; 定量测定; 生物传感仪法

## Comparative Analysis of Quantitative Assay Methods for $\beta$ -D-Glucan from Yeast Cell Walls

TIAN Xiaoli<sup>1,2</sup>, YANG Ping<sup>1,\*</sup>, JIANG Wenxia<sup>1,\*</sup>

(1. Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China; 2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** This study was conducted to compare and analyze several quantitative assay methods for insoluble  $\beta$ -D-glucan from yeast cell walls. It was indicated that the sample pretreatment by acid hydrolysis provided higher results for the determination of  $\beta$ -D-glucan, while the results obtained by acid-enzymatic hydrolysis were more precise. Among different test methods for glucose obtained after hydrolysis, the biosensor method was found to be faster, more stable and suitable for quality control in the production process. Besides,  $\alpha$ -glucan in the samples had a significant interference effect on the results of determination. Thus  $\beta$ -D-glucan should be calculated by subtraction from total glucose of the glucose obtained from  $\alpha$ -glucan.

**Key words:**  $\beta$ -D-glucan; yeast cell walls; hydrolysis method; quantitative determination; biosensor method

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201602017

中图分类号: Q539

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 02-0099-05

引文格式:

田晓丽, 杨萍, 姜文侠. 酵母细胞壁 $\beta$ -D-葡聚糖定量测定方法的比较分析[J]. 食品科学, 2016, 37(2): 99-103. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201602017. <http://www.spkx.net.cn>

TIAN Xiaoli, YANG Ping, JIANG Wenxia. Comparative analysis of quantitative assay methods for  $\beta$ -D-glucan from yeast cell walls[J]. Food Science, 2016, 37(2): 99-103. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201602017. <http://www.spkx.net.cn>

不溶性 $\beta$ -D-葡聚糖是构成酵母细胞壁的主要成分之一, 作为难以被消化的膳食纤维, 它在机体内具有抗癌、抗菌、抗病毒、降血脂及增强动物免疫活性等重要的生理活性功能<sup>[1-6]</sup>。这种葡聚糖不溶于水、酸、碱及醇和醚等有机溶剂, 而且没有标准品, 因而难以准确地定量检测, 这个问题已经影响到 $\beta$ -D-葡聚糖的研究、生产及其产品的质量的控制。

目前的 $\beta$ -D-葡聚糖定量测定方法, 一般采用酸水解

法直接将其水解为葡萄糖<sup>[7-9]</sup>, 再用苯酚硫酸法<sup>[10]</sup>、二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid method, DNS)法<sup>[11]</sup>、葡萄糖氧化酶-过氧化物酶双酶(glucose oxidase-peroxidase method, GOPOD)法<sup>[12]</sup>或高效液相色谱(high performance liquid chromatography method, HPLC)法<sup>[13-15]</sup>等定量方法测定葡萄糖含量, 再计算得到葡聚糖含量。但苯酚-硫酸法测定的是总糖含量<sup>[16]</sup>, DNS法测定的是还原糖含量<sup>[17]</sup>, GOPOD法和HPLC法对葡萄糖专一性

收稿日期: 2015-04-24

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2012AA021403)

作者简介: 田晓丽(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: tianxiaoli83080103@126.com

\*通信作者: 杨萍(1978—), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: yang\_p@tib.cas.cn

姜文侠(1964—), 男, 研究员, 本科, 研究方向为发酵工程。E-mail: jiang\_wx@tib.cas.cn

较强。很多学者<sup>[18-19]</sup>对上述检测方法进行了优化和改进,以便更准确地反映 $\beta$ -D-葡聚糖含量。本研究对常用的几种水解方法及专一性较强的葡萄糖定量检测方法进行对比分析,以求优选出一种测定准确、操作简便的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1#  $\beta$ -D-葡聚糖样品(标注含量为70%)、2#  $\beta$ -D-葡聚糖样品(标注含量为90%)、3#  $\beta$ -D-葡聚糖样品(标注含量为58.5%) 市购; 4#  $\beta$ -D-葡聚糖样品(含量为80%) 本实验室制备; 凝胶多糖(纯度 $\geq 99\%$ )、K-YBGL  $\beta$ -葡聚糖(酵母和蘑菇)检测试剂盒(外切-1,3- $\beta$ -葡聚糖酶(20 U/mL)与葡糖苷酶(4 U/mL)的混合酶液、淀粉转葡糖苷酶(1 630 U/mL)均为检测试剂盒中的酶制剂) 爱尔兰Megazyme公司; 硫酸(色谱纯) 美国Sigma-Aldrich公司; 其余试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

AB204-S分析天平 瑞士梅特勒-托利多公司; TU-1810紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; TGL-16M高速台式冷冻离心机 湘仪离心机仪器有限公司; SBA-40D生物传感分析仪 山东省科学院生物研究所; 1260型HPLC仪 美国安捷伦公司; JN-10C高压细胞破碎仪 广州聚能生物科技有限公司; Sorvall Evolution RC冷冻大容量离心机 赛默飞世尔科技有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品的水解

##### 1.3.1.1 酸水解法<sup>[20]</sup>

称取约0.5 g待测样品(或凝胶多糖),精确到0.001 g,加入质量分数72%的 $H_2SO_4$ 溶液5 mL,混匀,室温水解3 h;加25 mL蒸馏水使 $H_2SO_4$ 稀释至2 mol/L,封管,沸水浴2 h;冷却至室温,用NaOH溶液调pH值至6.5~7.0,用蒸馏水定容至100 mL,3 570 $\times$ g离心10 min,上清液为样品的酸水解液。

以凝胶多糖作为对照品,按照上述水解条件对酸水解进行校正。校正系数 $F$ 通过式(1)进行计算:

$$F = \frac{C' \times (1-A) \times m}{C \times V \times 0.9} \quad (1)$$

式中:  $C'$ 为凝胶多糖的纯度/%;  $A$ 为凝胶多糖的含水量/%;  $m$ 为凝胶多糖的质量/g;  $C$ 为凝胶多糖水解液中葡萄糖的质量浓度/(g/mL);  $V$ 为凝胶多糖水解液的定容体积,100 mL; 0.9为葡萄糖换算成葡聚糖的系数。

经酸水解后,待测样品中 $\beta$ -D-葡聚糖含量通过式(2)进行计算:

$$X/\% = \frac{C \times V}{m} \times F \times 0.9 \times 100 \quad (2)$$

式中:  $X$ 为 $\beta$ -D-葡聚糖含量/%;  $C$ 为样品水解液中葡萄糖的质量浓度/(g/mL);  $V$ 为样品水解液的定容体积,100 mL;  $m$ 为待测样品的质量/g; 0.9为葡萄糖换算成葡聚糖的系数。

#### 1.3.1.2 酸-酶水解法

称取约0.1 g待测样品至比色管中,精确到0.001 g,加入1.5 mL浓盐酸,30 $^{\circ}C$ 水解45 min,然后加入10 mL蒸馏水,封管,沸水浴2 h,冷却至室温,用KOH溶液调pH 6.5~7.0,以0.2 mol/L pH 5.0醋酸钠缓冲溶液定容至200 mL,1 500 $\times$ g离心10 min。取0.1 mL上清液,加入0.1 mL外切-1,3- $\beta$ -葡聚糖酶和葡糖苷酶的混合酶液,40 $^{\circ}C$ 水浴1 h使之充分酶解为葡萄糖,即得到样品的酸-酶水解液。

经酸-酶水解后,待测样品中 $\beta$ -D-葡聚糖含量通过式(3)进行计算:

$$X/\% = \frac{C \times V}{m} \times 0.9 \times 100 \quad (3)$$

式中:  $X$ 为 $\beta$ -D-葡聚糖含量/%;  $C$ 为样品水解液中葡萄糖的质量浓度/(g/mL);  $V$ 为样品水解液的定容体积,200 mL;  $m$ 为待测样品的质量/g; 0.9为葡萄糖换算成葡聚糖的系数。

#### 1.3.2 葡萄糖的定量检测

##### 1.3.2.1 GOPOD法

采用张惟杰<sup>[21]</sup>所述的方法测定。

##### 1.3.2.2 生物传感仪法

将适当稀释后的水解液,取25  $\mu$ L用SBA-40D生物传感分析仪测定葡萄糖质量浓度。

##### 1.3.2.3 HPLC法<sup>[22]</sup>

色谱柱: 美国Bio-Rad公司Aminex HPX-87H有机酸柱,300 mm $\times$ 7.8 mm;柱温65 $^{\circ}C$ ;示差检测器温度40 $^{\circ}C$ ;流动相为0.005 mol/L  $H_2SO_4$ 溶液;流速0.6 mL/min;进样量20  $\mu$ L。

#### 1.3.3 $\alpha$ -葡聚糖含量的检测

称取约0.1 g待测样品,精确到0.001 g,加入2 mL的2 mol/L KOH溶液,冰水浴20 min,然后加入8 mL的1.2 mol/L pH 3.8醋酸钠缓冲液和0.2 mL淀粉转葡糖苷酶,40 $^{\circ}C$ 水浴30 min,1 500 $\times$ g离心10 min。上清液中的葡萄糖含量用GOPOD法进行测定。 $\alpha$ -葡聚糖含量按式(4)计算:

$$X_a/\% = \frac{C \times V}{m} \times 0.9 \times 100 \quad (4)$$

式中:  $X_a$ 为 $\alpha$ -葡聚糖含量/%;  $C$ 为上清液中葡萄糖的质量浓度/(g/mL);  $V$ 为最终总体积,10.3 mL;  $m$ 为待测样品的质量/g; 0.9为葡萄糖换算成葡聚糖的系数。

## 1.4 数据处理

采用SPSS 19软件(2010, 美国IBM公司)进行数据处理, 数据分析采用 $t$ 检验法和方差分析法。3次实验取平均值得到测定结果, 当 $P<0.05$ 时, 结果差异显著。结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品水解方法的比较分析

定量测定 $\beta$ -D-葡聚糖, 必须先将葡聚糖水解为葡萄糖, 再通过检测葡萄糖对 $\beta$ -D-葡聚糖进行定量。为考察水解方法对结果的影响, 本研究对比了酸水解法和酸-酶水解法。

酸水解法通常先使用高浓度的酸, 短时间低温水解, 然后再用低浓度酸进行沸水浴水解。刘晓永<sup>[23]</sup>比较了高浓度酸预处理和没有预处理的水解效果, 发现经高浓度酸预处理后的回收率显著提高。因此, 本实验先用高浓度酸处理后再用低浓度酸对各 $\beta$ -D-葡聚糖样品进行水解。而酸-酶水解法先采用酸将不溶性 $\beta$ -D-葡聚糖初步降解成可溶性的物质, 再通过外切-1,3- $\beta$ -葡聚糖酶和葡糖苷酶进行专一性酶切。通过对酶解产物的测定来定量 $\beta$ -D-葡聚糖。

#### 2.1.1 水解方法对葡萄糖稳定性的影响

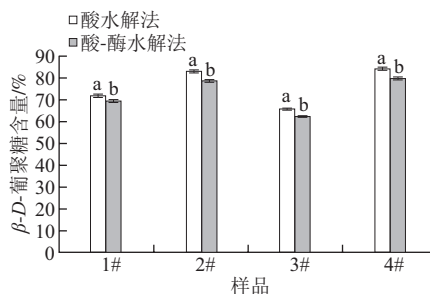
由于 $\beta$ -D-葡聚糖的测定是依据水解后得到的葡萄糖含量来进行定量的, 如果在水解过程中破坏了葡萄糖, 则会影响 $\beta$ -D-葡聚糖的定量结果, 因此本实验将葡萄糖分别用不同的水解方法处理, 考察水解方法对葡萄糖的影响。

葡萄糖经酸水解法处理后的回收率仅为 $(90.03\pm 0.51)\%$ , 表明酸水解对葡萄糖的破坏显著。因此, 采用酸水解法测定不溶性 $\beta$ -D-葡聚糖应该引入不溶性 $\beta$ -D-葡聚糖的标准品或对照品对水解条件进行校正。但由于目前没有该标准品或对照品, 一些使用酸水解法的研究者<sup>[24-25]</sup>采用水溶性的凝胶多糖作为对照品进行校正, 本研究的酸水解法也采用凝胶多糖为对照品, 得到校正系数。

葡萄糖经酸-酶水解法处理后的回收率为 $(99.37\pm 0.60)\%$ , 该水解方法没有破坏葡萄糖, 因而不必进行校正。

#### 2.1.2 水解方法对样品测定结果的影响

为比较不同水解方法对样品测定结果的影响, 本研究分别采用酸水解法和酸-酶水解法分别对1#、2#、3#和4#样品进行水解处理, 通过HPLC法对葡聚糖样品水解程度进行判定并对水解液中葡萄糖含量进行测定。



同一样品不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ,  $n=3$ )。

图1 不同水解法对 $\beta$ -D-葡聚糖含量测定结果的影响

Fig.1 Effect of different hydrolysis methods on the results of determination of  $\beta$ -D-glucan content

上述样品经不同方法水解后, 用HPLC测定, 均未发现二糖和低聚糖的峰, 证明两种水解方法都已将葡聚糖样品水解完全, 不会因水解不彻底而对测定结果造成影响。通过葡萄糖含量计算得到的 $\beta$ -D-葡聚糖含量, 如图1所示。每种样品经两种水解方法处理后得到的测定结果之间均存在显著差异 ( $P<0.05$ ), 而且同一样品, 经酸水解法处理后测定的结果均比酸-酶水解法处理后的结果高, 这可能是由于酸水解破坏了部分水解得到的葡萄糖, 使计算得到的校正系数 $F$ 偏高, 导致计算得到的 $\beta$ -D-葡聚糖含量偏高。因此, 选用酸-酶水解法测定 $\beta$ -D-葡聚糖的结果更加准确、可靠。

### 2.2 葡萄糖定量检测方法的比较分析

对4种样品进行酸-酶水解后, 分别用生物传感仪法、GOPOD法和HPLC法测定水解液中的葡萄糖含量, 得到的样品中 $\beta$ -D-葡聚糖含量见表1。

表1 葡萄糖的检测方法对 $\beta$ -D-葡聚糖含量测定结果的影响  
Table 1 Effect of different glucose test methods on the results of determination of  $\beta$ -D-glucan content

检测方法	1#样品		2#样品		3#样品		4#样品	
	测定值	RSD	测定值	RSD	测定值	RSD	测定值	RSD
生物传感仪法	69.96 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00	79.12 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00	62.13 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00	80.34 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00
GOPOD法	69.34 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	0.58	78.53 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	0.62	61.61 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.30	80.20 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	0.50
HPLC法	69.47 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.19	78.74 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.05	61.53 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.03	80.27 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.10

注: 同列不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ,  $n=3$ )。

从表1可见, 不同的葡萄糖检测方法对 $\beta$ -D-葡聚糖含量测定值的影响无显著差异, 生物传感仪法、GOPOD法和HPLC法对葡萄糖的专一性强, 精密度均较高(相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值均小于1%), 均适用于葡萄糖含量的测定。但在生产过程中需快速测定大量样品时, 选择生物传感仪法更加适宜。因为GOPOD法的试剂价格较高, 测定成本较高。HPLC法对实验的仪器要求较高, 样品的前处理复杂, 检测时间较长。而生物传感仪法操作更简便、快捷, 结果重复性好(RSD=0.00)。



### 2.3 $\alpha$ -葡聚糖含量对测定结果的影响

由于样品的制备方法和原料的差异,  $\beta$ -D-葡聚糖产品中可能不同程度地含有 $\alpha$ -葡聚糖。为了探究 $\alpha$ -葡聚糖含量对测定结果的影响, 用 $\beta$ -葡聚糖(酵母和蘑菇)检测试剂盒分别测定3#样品、主要成分为 $\alpha$ -葡聚糖的可溶性淀粉和添加了可溶性淀粉的3#样品, 得到其中的总葡聚糖、 $\alpha$ -葡聚糖及 $\beta$ -D-葡聚糖含量见表2。添加可溶性淀粉的3#样品, 其总葡聚糖含量为3#样品和可溶性淀粉的葡聚糖含量之和, 其中的 $\beta$ -D-葡聚糖含量与未添加可溶性淀粉的3#样品相当。该结果表明, 通过对酸-酶水解后的葡萄糖定量只能得到总葡聚糖含量, 不能排除样品中 $\alpha$ -葡聚糖的干扰, 因为样品中 $\alpha$ -葡聚糖的酸水解后产物也是葡萄糖, 对测定结果有显著影响。因此,  $\beta$ -D-葡聚糖含量应为总葡聚糖含量减去 $\alpha$ -葡聚糖含量。

表2 可溶性淀粉的添加对3#样品中葡聚糖含量的影响

Table 2 Effect of addition of soluble starch on the determination of glucan contents of 3# sample

样品	总葡聚糖含量/mg	$\alpha$ -葡聚糖含量/mg	$\beta$ -D-葡聚糖含量/mg
3#样品100 mg	61.61±0.19	2.75±0.03	58.86±0.21
可溶性淀粉100 mg	75.84±0.23	75.41±0.58	0.43±0.35
3#样品100 mg+可溶性淀粉100 mg	136.90±0.57	77.59±0.83	59.32±0.26

注: a. 酸-酶水解后, GOPOD法进行葡萄糖定量; b. 总葡聚糖含量减去 $\alpha$ -葡聚糖含量。

### 2.4 市购样品的测定

表3 样品中不同葡聚糖含量

Table 3 Contents of different glucans in various samples

样品	总葡聚糖含量		$\alpha$ -葡聚糖含量		$\beta$ -D-葡聚糖含量	
	测定值	RSD	测定值	RSD	测定值	RSD
1#样品(70%)	69.34±0.41	0.58	23.32±0.22	0.95	46.02±0.19	0.41
2#样品(90%)	78.53±0.49	0.62	22.69±0.14	0.62	55.84±0.44	0.79
3#样品(58.5%)	61.61±0.19	0.30	2.75±0.03	0.91	58.86±0.21	0.36
4#样品(81%)	80.20±0.40	0.50	0.08±0.02	0.00	80.12±0.34	0.50

用 $\beta$ -葡聚糖(酵母和蘑菇)检测试剂盒测定标注含量不同的市购样品中不溶性 $\beta$ -D-葡聚糖含量, 结果见表3。1#样品和2#样品中的 $\beta$ -D-葡聚糖含量仅是标注值的2/3上下, 且在这两个样品中均含有较多的 $\alpha$ -葡聚糖。1#样品的标注含量是以总葡聚糖的测定为依据, 未考虑 $\alpha$ -葡聚糖的干扰; 2#样品的标注含量显著高于总葡聚糖的测定结果; 3#样品中虽然含有 $\alpha$ -葡聚糖, 但标注的 $\beta$ -D-葡聚糖含量与实际含量一致, 表明标注含量已排除了 $\alpha$ -葡聚糖的影响; 由于在4#样品的制备过程中去除了其中的 $\alpha$ -葡聚糖, 因此未检测到 $\alpha$ -葡聚糖, 总葡聚糖与 $\beta$ -D-葡聚糖的测定结果一致。

### 3 结论

本研究通过实验比较认为, 对于不溶性 $\beta$ -D-葡聚糖的水解, 应选用酸-酶水解法, 该水解法先用酸处理, 然后采用外切-1,3- $\beta$ -葡聚糖酶和葡糖苷酶的定向催化水解, 专一性强, 水解彻底, 条件温和, 不需要校正, 测定的结果更加可信、准确。在葡萄糖的几种定量测定方法的比较中, 生物传感仪法、GOPOD法和HPLC法在测定结果上没有显著性差异, 而生物传感仪法操作简便、测定时间短、成本低, 更适合在生产过程和质量控制检测中使用。待测样品中 $\alpha$ -葡聚糖含量对测定结果有显著影响, 因此,  $\beta$ -D-葡聚糖含量应为总葡聚糖含量减去 $\alpha$ -葡聚糖含量。

### 参考文献:

- [1] KOGAN G. (1-3,1-6)- $\beta$ -D-Glucans of yeasts and fungi and their biological activity[J]. Studies in Natural Products Chemistry, 2000, 23: 107-152.
- [2] WILLIAMS D L, MUELLER A, BROWDER W. Glucan-based macrophage stimulators: a review of their anti-infective potential[J]. Clinical Immunotherapeutics, 1996, 5(5): 392-399.
- [3] BEER M U, ARRIGONI E, AMADO R. Extraction of oat gum from oat bran: effects of process on yield, molecular weight distribution, viscosity and (1-3)(1-4)- $\beta$ -D-glucan content of the gum[J]. Cereal Chemistry, 1996, 73(1): 58-62.
- [4] BOHN J A, BEMILLER J N. (1,3)- $\beta$ -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships[J]. Carbohydrate Polymers, 1995, 28(1): 3-14. DOI:10.1016/0144-8617(95)00076-3.
- [5] MYERS M J, DICKENS C S, SCHOOK L B. Alteration of macrophage antitumor-activity and transferrin receptor expression by exposure to dimethylnitrosamine *in vivo*[J]. Immunopharmacology, 1987, 13(3): 195-205. DOI:10.1016/0162-3109(87)90058-0.
- [6] HOFER M, POSPISIL M. Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice. A survey of the authors' results[J]. International Journal of Immunopharmacology, 1997, 19(9/10): 607-609. DOI:10.1016/s0192-0561(97)00057-x.
- [7] 刘晓永, 王强, 刘红芝, 等. 酿酒酵母 $\beta$ -D-葡聚糖测定方法的研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2007, 33(2): 150-157. DOI:10.3321/j.issn:1008-9209.2007.02.007.
- [8] NGUYEN T H, FLEET G H, ROGERS P L. Composition of the cell walls of several yeast species[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998, 50(2): 206-212.
- [9] MAGNELLI P, CIPOLLO J F, ABEIJON C. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and  $\beta$ -1,6-glucan fine structure[J]. Analytical Biochemistry, 2002, 301: 136-150. DOI:10.1006/abio.2001.5473.
- [10] 徐希柱, 辛培超. 不溶性酵母多糖分析方法的研究[J]. 中国酿造, 2008, 27(13): 80-83. DOI:10.3969/j.issn.0254-5071.2008.07.026.
- [11] THAMMAKITI S, SUPHANTHARIKA M, PHAESUWAN T, et al. Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potential applications in the food industry[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39(1): 21-29. DOI:10.1111/j.1365-2621.2004.00742.x.

- [12] THANARDKIT P, KHUNRAE P, SUPHANTHARIKA M, et al. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18(6): 527-539. DOI:10.1023/a:1016322227535.
- [13] 陈少峰, 望忠福. HPLC法测定酵母葡聚糖[J]. 食品科技, 2009, 34(7): 278-280.
- [14] GIOVANI G, ROSI I. Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(1): 19-24. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.008.
- [15] 王静. 面包酵母 $\beta$ -D-葡聚糖的提取和分析[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [16] 孙丽娜. 胖大海多糖的结构分析和活性研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2009.
- [17] 王俊丽, 聂国兴, 李素贞, 等. DNS法测定还原糖含量时最适波长的确定[J]. 河南农业科学, 2010(4): 115-118. DOI:10.3969/j.issn.1004-3268.2010.04.032.
- [18] SUPHANTHARIKA M, KHUNRAE P, THANARDKIT P, et al. Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Bioresource Technology, 2003, 88(1): 55-60.
- [19] RHEE S J, CHO S Y, KIM K M, et al. A comparative study of analytical methods for alkali-soluble  $\beta$ -glucan in medicinal mushroom, Chaga (*Inonotus obliquus*)[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(3): 545-549. DOI:10.1016/j.lwt.2007.03.028.
- [20] DALLIES N, FRANCOIS J, PAQUET V. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall, application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast, 1998, 14(14): 1297-1306.
- [21] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 10-15.
- [22] XIMENES E, KIM Y, MOSIER N, et al. Inhibition of cellulases by phenols[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(3/4): 170-176. DOI:10.1016/j.enzmictec.2009.11.001.
- [23] 刘晓永. 酿酒酵母 $\beta$ -D-葡聚糖制备、构象及免疫功效研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- [24] 工业和信息化部. QB/T 4572—2013 酵母 $\beta$ -葡聚糖[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [25] FREIMUND S, SAUTER M, KAPPELI O, et al. A new non-degrading isolation process for 1,3- $\beta$ -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54(2): 159-171. DOI:10.1016/s0144-8617(03)00162-0.