

定量薄层层析法用于 内切 β -1,3-葡聚糖酶筛选纯化过程中 酶活力测定

李晶¹,朱莉²,詹晓北^{1,*},徐敏¹,郑志永¹

(1.江南大学生物工程学院糖化学与生物技术教育部重点实验室,江苏无锡 214122;

2.江苏瑞光生物科技有限公司,江苏无锡 214125)

摘要:根据寡糖与显色剂反应后的呈色物质在 540nm 处吸光值强度,建立了一种用于分析水解液中寡糖浓度的定量薄层层析法。应用阴离子交换层析结合两步分子筛层析技术在 β -葡聚糖酶样品(来源于 *Trichoderma reesei*)中纯化得到一种内切 β -葡聚糖酶(EndoG,23.6ku),内切酶纯化 44.5 倍,酶活回收率 12.4%。底物特异性及水解产物分析表明该酶属于内切 β -1,3-葡聚糖酶,初步分类为 EC3.2.1.39。经测定,EndoG 降解热凝胶主要生成昆布二糖和昆布三糖,最适反应条件为 pH5.0,50℃。由于 EndoG 对水不溶性底物热凝胶具有较高的水解活性,对该酶的深入研究可以为提高热凝胶利用率 and 应用范围提供帮助。

关键词:内切 β -1,3-葡聚糖酶,热凝胶,定量薄层层析,纯化

Determination of enzymatic activity during endo- β -1,3-glucanase screening and purification processes using quantitative thin layer chromatography

LI Jing¹,ZHU Li²,ZHAN Xiao-bei^{1,*},XU Min¹,ZHENG Zhi-yong¹

(1.Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology of Ministry of Education,School of Biotechnology,
Jiangnan University,Wuxi 214122,China;2.Jiangsu Rayguang Biotech Co.Ltd.,Wuxi 214125,China)

Abstract: A quantitative thin layer chromatography method was established in this study to determine the concentration of oligosaccharides in curdlan hydrolyzate according to the absorbance of color materials at 540nm. Then,based on this method,an endo- β -1,3-glucanase(EndoG) was purified to unity from *Trichoderma reesei* product by means of anion exchange chromatography combining with two-stage size exclusion chromatography process.The purification fold of 44.5 and enzymatic yield of 12.4% were achieved at the final step.The molecular weight of EndoG was 23.6ku.According to the substrate specificity and hydrolysis pattern,EndoG was classified into EC3.2.1.39.Results indicated that laminaribiose and laminaritriose were the major products released from curdlan hydrolyzate and the optimal pH and temperature were 5.0 and 50℃,respectively.A further investigation of EndoG will favor the utilization and application of water-insoluble curdlan due to the definite hydrolysis activity of EndoG on curdlan.

Key words: endo- β -1,3-glucanase;curdlan;quantitative thin layer chromatography;purification

中图分类号:TS207

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2013)23-0298-05

β -葡聚糖广泛存在于自然界各种生物体中,包括动物、植物、真菌和细菌等,并且具有多种重要的生理功能^[1-3]。 β -1,3-葡聚糖是多种真菌和细菌等微生物的细胞壁组成成分^[4],保护细胞质抵抗外界环境压力。研究表明, β -1,3-葡聚糖和相关寡糖具有多种生理活性,如抗 HIV 活性^[5]、植物诱抗^[6]等。而 β -1,3-葡聚糖酶降解葡聚糖是获取寡糖的重要方

法。根据功能和底物特异性分类, β -1,3-葡聚糖酶分为内切酶(EC3.2.1.6,EC3.2.1.39)和外切酶(3.2.1.58)两类^[7]。根据来源不同,内切葡聚糖酶具有多种生物学功能,研究发现植物中内切 β -1,3-葡聚糖酶参与植物的萌芽、开花和组织分化^[8]。有报道显示,内切 β -1,3-葡聚糖酶具有抑制植物病原真菌的生长的作用^[9]。热凝胶是由土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.)发酵获得的无支链线性 β -1,3-葡聚糖^[10]。相比于其它 β -葡聚糖,如昆布多糖、酵母 β -葡聚糖或大麦 β -葡聚糖等,生产热凝胶的成本更低,以热凝胶为原料制备 β -1,3-葡聚糖具有广阔前景。然而热凝胶的水不溶性不利于水解反应进

收稿日期:2013-04-22 *通讯联系人

作者简介:李晶(1986-),男,博士研究生,研究方向:蛋白纯化与功能测定。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171640)。

行,限制了其广泛应用。已报道的许多内切 β -1,3-葡聚糖酶对热凝胶降解活性较弱^[11-12],不适于对热凝胶的降解。为此,我们以热凝胶为底物从来源于里氏木霉(*Trichoderma reesei*)的葡聚糖粗酶中纯化得到1种能够特异性水解热凝胶生成昆布二糖和昆布三糖的内切酶,本研究对该酶的筛选、纯化、蛋白和酶学性质进行了描述。由于该酶对水不溶性底物热凝胶具有较高的水解活性,本研究可以为提高热凝胶利用率以及拓展热凝胶的应用范围提供有益的帮助。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

10种 β -葡聚糖酶样品,编号分别为XSHF、XSH3、XSH6、SKH、BK、NOVO、BAC、13A、13B和13C
江苏瑞光生物科技有限公司(无锡);热凝胶 Kirin Kyowa Foods Company, Ltd.(日本);昆布多糖(来源于*Laminaria digitata*) Sigma公司(美国);低分子标准蛋白(14400~97000,69043661) 国药集团化学试剂有限公司(上海);其余试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司(上海);Silica gel 60 F₂₅₄层析板 Merck KGaA,(德国)。

CS-9301PC 双波长飞点扫描薄层分析仪 Shimadzu Corp.,日本;JYSCZ2+凝胶电泳仪 北京君意东方电泳设备有限公司,北京;中空超滤膜 截留分子量10000u,Merck Millipore,美国;阴离子交换层析系统 Armen,法国;ToyoPearl SuperQ-650M层析柱(55mm×80cm) Tosoh Corp.,日本;ÄKTA Purifier 体积排阻层析系统 GE Healthcare Bio-Sciences AB,瑞典;HiLoad 26/600 Superdex 75 prep grade层析柱 瑞典;HiPrep 26/10 Desalting 脱盐层析柱 瑞典。

1.2 分析方法

1.2.1 定量薄层层析(TLC) 取2 μ L测试溶液点样于10cm×10cm层析板展开55min,展开剂为乙酸乙酯/冰乙酸/水(体积比2:2:0.9)。结束后以硫酸-地衣酚溶液为显色剂(每1L显色液中含有750mL无水乙醇,100mL浓硫酸,50mL去离子水和2g地衣酚),于105℃显色5min。显色后层析板采用双波长飞点扫描薄层分析仪于波长540nm处进行扫描,获得每种寡糖的响应曲线,然后根据响应峰面积计算每种寡糖质量浓度。最终面积由三次扫描结果平均获得。响应峰与寡糖浓度校正曲线由葡萄糖和麦芽糖标准品分别测得,浓度有效范围为0.1~2.0g/L。

1.2.2 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析 浓缩胶和分离胶浓度分别为5%和15%,电泳电流恒定为25mA。低分子标准蛋白用于绘制蛋白校正曲线。样品分子量通过校正曲线插值法获得。

1.3 内切 β -1,3-葡聚糖酶纯化过程

1.3.1 阴离子交换层析(AEC) β -葡聚糖酶样品首先经过中空超滤膜超滤处理除去小分子杂质。然后,采用阴离子交换层析系统对超滤后的酶液进行AEC分离。进样前采用0.05mol/L磷酸缓冲液

(PBS,pH7.5)平衡层析柱,流速20mL/min。然后进样50mL,进样后以0.05mol/L PBS(pH7.5)洗脱45min,随后45~180min以0~0.25mol/L NaCl溶液线性梯度洗脱,然后180~210min以0.25~1.00mol/L NaCl溶液线性梯度洗脱。根据洗脱液在215nm处吸光值自动绘制洗脱曲线。洗脱液内切酶活性采用定量TLC方法测定。

1.3.2 体积排阻层析(SEC) AEC洗脱获得的活性组分通过SEC进一步纯化。层析第一阶段,洗脱剂为0.05mol/L PBS和0.08mol/L NaCl混合液(pH7.0),流速2.350mL/min,进样量5mL;第二阶段,洗脱剂为0.20mol/L NaCl,流速1.800mL/min,进样量500 μ L。两阶段柱温均维持20℃,以215nm处吸光值自动绘制洗脱曲线。分部收集样品的内切酶活性采用定量TLC方法测定。

1.3.3 纯化后样品脱盐 纯化后的内切 β -1,3-葡聚糖酶进行脱盐处理,层析洗脱剂为去离子水,流速3.000mL/min,进样量10mL。柱温维持20℃,以215nm处吸光值监测洗脱过程。

1.4 内切 β -1,3-葡聚糖酶性质测定

1.4.1 蛋白浓度测定 采用考马斯亮蓝G250染色法测定,以牛血清白蛋白为标准蛋白绘制拟合曲线。

1.4.2 内切 β -1,3-葡聚糖酶活性分析 依据寡糖生成量定义内切酶活力:以热凝胶为底物,水解反应1min,生成1 μ g寡糖所需的酶量定义为1酶活单位(1U)。

1000 μ L反应体系,包含250 μ L 20g/L热凝胶水悬液,200 μ L 0.10mol/L柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH5.0),10 μ L 0.5g/L内切 β -1,3-葡聚糖酶和540 μ L去离子水,用于测定内切酶活性。反应液置于50℃水浴4h,反应结束后沸水浴加热10min终止反应。随后,水解液中寡糖含量采用定量TLC方法测定。所有样品均采用三次平行测定。

1.4.3 酶学性质测定 采用0.10mol/L柠檬酸-磷酸盐缓冲液,在45℃,pH3.5~7.5范围内测定pH对内切 β -1,3-葡聚糖酶活性影响。然后在pH5.0,20~70℃范围内测定内切酶活性以确定最佳反应温度。所有结果均为三次测定平均值。

为测定纯化后内切葡聚糖酶水解糖苷键特异性,选择了 β -1,3-连接的热凝胶、 β -1,4连接的CM-纤维素、 β -1,3(1,6)-连接的昆布多糖和 α -1,4-连接的可溶性淀粉4种多糖作为底物进行测定,采用前述酶活测定方法,反应体系1000 μ L。所有测定均于pH5.0,50℃条件下反应4h,样品均采用三次平行测定。

2 结果与分析

2.1 TLC响应值与样品浓度相关性

实验发现,定量TLC响应值与样品浓度两者之间呈非线性关系,无法直接根据响应值获取浓度信息。因此,本实验首先以葡萄糖和麦芽糖作为标准测定了TLC响应值校正曲线(图1)。由图1可以看出,TLC响应面积随着样品浓度增加而逐渐增加,并且在样品浓度0.1~2.0g/L区间内,与样品对数浓度

呈现较好的二次曲线关系 ($R^2 > 0.996$)。另外,葡萄糖和麦芽糖两种样品得到了几乎完全重叠的结果,说明该方法只与浓度有关,对样品分子量并不敏感,可以用于低聚寡糖浓度的测定。

通过与 HPLC 分析结果, Aminex HPX-87H 色谱柱比较,在上述浓度区间内定量 TLC 表现出相近的精确度。然而相比于 HPLC 方法 30min 样品的处理量,优化后 TLC 方法可以在 2h 时间内处理 24 个样品,考虑到 β -葡聚糖酶筛选、分离和纯化过程中,需要同时对大量分部收集的蛋白样品进行水解产物的寡糖含量分析,在测定结果相近的情况下,定量 TLC 方法能够更快速地同时处理多批次样品,因此,更适合用于 β -葡聚糖酶纯化过程。因此,本研究后续实验中寡糖浓度分析均依据该定量薄层层析法。

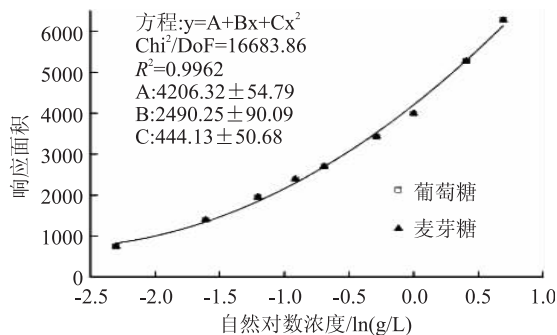


图1 定量薄层层析响应面积对样品浓度校正曲线

Fig.1 Calibration curve of response area in quantitative thin layer chromatography versus sample concentration

2.2 β -葡聚糖酶来源筛选与预处理

本研究以热凝胶为底物,对来源于霉菌和细菌的 10 种 β -葡聚糖酶样品内切酶活性进行了测定(表 1)。水解 pH 和温度范围分别为 pH4.0~6.0 和 35~50℃。结果表明,3 种样品(XSHF, BAC 和 13B)表现出了明显的降解热凝胶活性,但是相比于 XSHF (100%), BAC 和 13B 的单位酶活均较低,分别为 14.9% 和 2.5%。另外, XSH3, BK 和 SKH 3 种样品表现出微弱内切活性,而 XSH6, NOVO, 13A 和 13C 对热凝胶无降解作用。最终选择 XSHF (产自里氏木霉)作为内切 β -葡聚糖酶纯化的原料来源。

经测定, 100g/L XSHF 样品溶液电导率达到 91.2mS/cm, 对离子交换层析造成明显干扰。因此,

表 1 10 种 β -葡聚糖酶降解热凝胶活性分析

Table 1 Analysis of the curdlan-hydrolyzing activity of 10 β -glucanases

β -葡聚糖酶编号	XSHF	XSH3	XSH6	BK	SKH	NOVO	BAC	13A	13B	13C
内切酶相对活性(%)	100	<1*	-**	<1	<1	-	14.9	-	2.5	-

注: * 表示检测到微弱活性; ** 表示无活性。

表 2 纯化过程内切 β -葡聚糖酶回收率汇总表

Table 2 Purification yield of endo- β -glucanase

纯化步骤	总蛋白含量(mg)	总酶活(U)	比酶活(U/mg)	纯化倍数	酶活回收率(%)
超滤	2088.0	78831	37.8	1	100
阴离子交换层析	156.0	28137	180.4	4.8	35.7
分子筛层析(stage 01)	7.54	10861	1440.5	38.2	13.8
分子筛层析(stage 02)	5.81	9765	1680.7	44.5	12.4

本研究首先对粗酶液进行了超滤处理(截留分子量 10000u), 最终超滤截留液电导率下降至 1.51mS/cm, 已经低于 0.025mol/L PBS (pH7.5) 电导率水平 (2.31mS/cm)。

2.3 内切 β -葡聚糖酶纯化过程

采用阴离子交换层析(AEC)对超滤截留液进行了初步分离。经洗脱条件优化,以 0.05mol/L PBS (pH7.5)作为洗脱剂,采用两阶段 NaCl 线性梯度洗脱得到了较好的分离效果(图 2)。热凝胶降解实验表明,保留时间 205~215min 的洗脱液表现出了最强的内切酶活性。

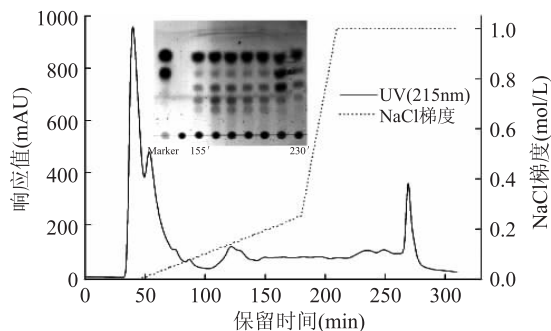


图2 阴离子交换层析分离 XSHF 样品洗脱曲线

Fig.2 Elution profile of XSHF sample by anion exchange chromatography

注:TLC 图片为保留时间 150~230min 的分部收集洗脱液对热凝胶水解结果, Marker 为葡萄糖和昆布二糖混合物。

随后,本实验采用分子筛层析对 AEC 中的活性组分进一步分离。洗脱条件优化(stage 01)后,保留时间 87min 的洗脱峰具有明显的内切活性(图 3),然而经 SDS-PAGE 测定(数据未列出),该组分仍然具有少量的杂蛋白条带。因此又进行了二次纯化(stage 02)。通过调整洗脱剂中无机盐含量及洗脱流速,杂蛋白与内切酶蛋白实现了较好的分离(图 4A)。图 4B 显示了保留时间 90~130min 内的洗脱组分水解热凝胶产物,结合 SDS-PAGE 结果表明,保留时间 112min 的洗脱峰为纯化后的内切 β -葡聚糖酶组分,命名为 EndoG。纯化过程中各步蛋白和内切酶活性回收率见表 2。最终蛋白回收率 0.28%,内切酶纯化 44.5 倍,酶活回收率达到 12.4%。

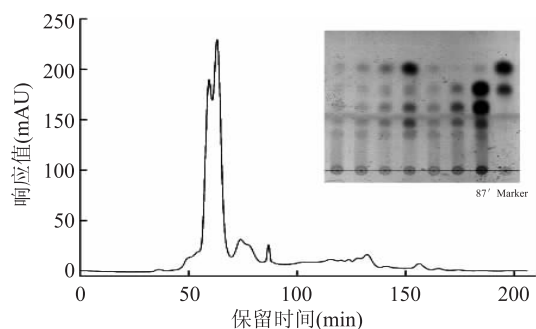


图3 第一阶段分子筛层析分离内切酶组分洗脱曲线

Fig.3 Elution profile of β -glucanase component by size exclusion chromatography in stage 01

注:TLC 图片为 50~90min 洗脱液对热凝胶原水解结果。

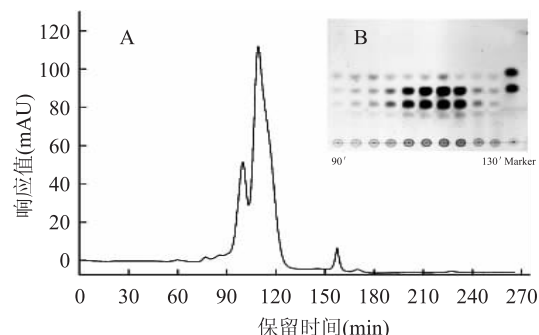


图4 第二阶段分子筛层析分离内切酶组分洗脱曲线

Fig.4 Elution profile of β -glucanase component by size exclusion chromatography in stage 02

注:TLC 图片为 90~130min 洗脱液对热凝胶原水解结果。

2.4 EndoG 酶学性质测定

本研究对纯化后蛋白的性质进行了初步测定。经 SDS-PAGE 电泳分析(图 5), EndoG 分子质量为 23.6ku。Tanabe^[13]和 Cota^[14]分别报道了两种性质不同的内切 β -1,3-葡聚糖酶的紫外吸收谱,最强负峰出现在 210~220nm 之间。而 EndoG 扫描图谱显示,最强负峰出现在 205~210nm,与报道相比偏向于紫外端,可能与 β -折叠及无规卷曲等结构含量存在差异有关。结果表明,尽管催化 β -葡聚糖水解脱功能相似,但是蛋白二级结构的不同可能造成了葡聚糖酶酶学性质的差异。

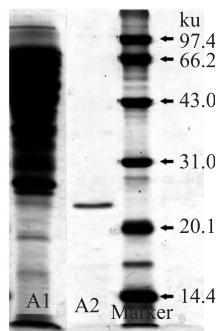


图5 β -葡聚糖酶 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 SDS-PAGE analysis of β -glucanase

注:A1, XSHF 粗酶样品;A2, 纯化后内切 β -1,3-葡聚糖酶。

采用 4 种不同类型多糖作为底物考察了 EndoG

的底物特异性。结果表明, EndoG 对热凝胶原表现出最大活性,对以 β -1,3(1,6)-糖苷键连接的昆布多糖相对活性减弱为 5%。对淀粉和以 β -1,4-糖苷键连接 CM-纤维素无降解活性。根据 EndoG 底物特异性及对热凝胶原的水解产物分析(图 4),表明 EndoG 具有明显的 β -1,3-内切活性,属于内切 β -1,3-葡聚糖酶。根据文献中通常采用的方法^[15-16],初步将该酶分类为 EC3.2.1.39。

然后以热凝胶原为底物,测定了 EndoG 作用的最佳温度和 pH(图 6)。结果表明, EndoG 最高活性出现在 pH5.0,在 pH4.0~5.5 时相对酶活高于 85%。而在 50℃时 EndoG 具有较高的活性,并且在 45~55℃温度区间内活性变化不明显。由于水不溶性特点,热凝胶原的应用受到较大限制。但是热凝胶原可以通过土壤杆菌发酵获得,相比于其它 β -1,3-葡聚糖,如昆布多糖或酵母 β -葡聚糖等,生产成本更低。因此,如果能够解决水解问题,以热凝胶原为原料制备 β -1,3-葡寡糖将有广阔前景。本研究获得的 EndoG 对热凝胶原显示出了较强的底物特异性和水解活性,能够有效地降解热凝胶原生成低聚寡糖。因此,本研究可以为提高热凝胶原利用率以及拓展热凝胶原的应用范围提供有益的帮助。由于 EndoG 含量较低(纯化后蛋白回收率仅有 0.28%),后续实验中可尝试通过对生产菌(里氏木霉)中 EndoG 表达基因进行分离,并构建真菌高效表达系统以大规模制备内切 β -1,3-葡聚糖酶。

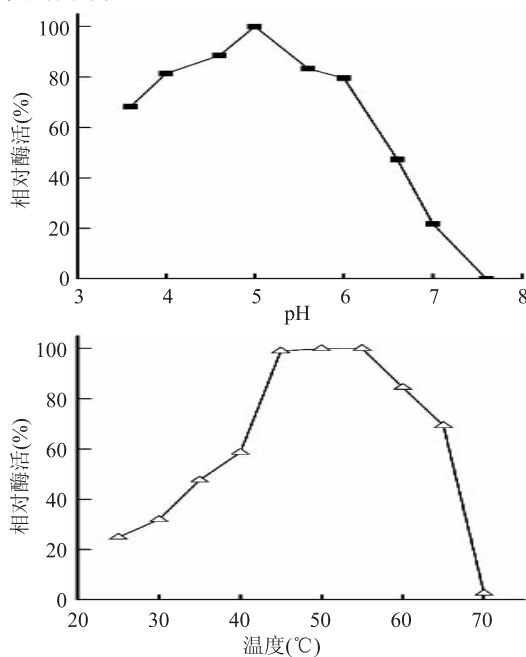


图6 pH 和温度对 EndoG 水解热凝胶原活性影响

Fig.6 Effect of pH and temperature on the curdlan-hydrolyzing activities of endo- β -1,3-glucanase, EndoG

3 结论

本研究建立了一种定量薄层层析法用于测定样品中寡糖浓度,然后,采用阴离子交换层析结合两步分子筛层析方法对来源于里氏木霉的 β -葡聚糖酶

样品进行了分离,最终纯化得到一种内切 β -葡聚糖酶(EndoG)。经电泳方法测定,该酶分子量 23.6ku。实验结果表明,EndoG 降解热凝胶主要生成昆布二糖和昆布三糖,最适反应条件为 pH5.0,50℃。通过底物特异性及水解产物分析,表明 EndoG 属于内切 β -1,3-葡聚糖酶,分类为 EC3.2.1.39。由于 EndoG 对水不溶性底物热凝胶具有较高的水解活性,对该酶的深入研究可以为提高热凝胶利用率和应用范围提供帮助。

参考文献

- [1] Stanisich V A, Stone B A. Functional roles of (1,3)- β -glucans and related polysaccharides: prokaryotes. In: Bacic A, et al. Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1-3)- β -Glucans and Related Polysaccharides [M]. Boston: Academic Press, 2009: 327-352.
- [2] Myklestad S, Granum E. Biology of (1,3)- β -glucans and related glucans in protozoans and chromistans. In: Bacic A, et al. Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1-3)- β -Glucans and Related Polysaccharides [M]. Boston: Academic Press, 2009: 353-385.
- [3] Clavaud C, Aïmanianda V, Latge J P. Organization of fungal, oomycete and lichen (1,3)- β -glucans. In: Bacic A, et al. Chemistry, Biochemistry, and Biology of (1-3)- β -Glucans and Related Polysaccharides [M]. Boston: Academic Press, 2009: 387-424.
- [4] Duan F, Lu X. Enzymatic properties and kinetics of an endo- β -1,3-glucanase of *Mitsuaria chitosanitabida* H12 and preparation of 1,3- β -D-glucooligosaccharides from yeast β -glucan[J]. Annals of microbiology, 2012, 62(1): 307-312.
- [5] Borjihan G, Zhong G, Baigude H, et al. Synthesis and anti-HIV activity of 6-amino-6-deoxy-(1 \rightarrow 3)- β -D-curdlan sulfate[J]. Polymers for Advanced Technologies, 2003, 14(3-5): 326-329.
- [6] Klarzynski O, Plesse B, Joubert J M, et al. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco [J]. Plant Physiology, 2000, 124(3): 1027-1038.
- [7] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics [J]. Nucleic acids research, 2009, 37

(suppl 1): D233-D238.

- [8] Ueda M, Yamaki K, Goto T, et al. Purification and characterization of 1,3- β -D-glucanase from *Eisenia foetida* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(1): 271-276.
- [9] Hong T Y, Cheng C W, Huang J W, et al. Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3- β -glucan [J]. Microbiology, 2002, 148(4): 1151-1159.
- [10] Yu L, Wu J, Liu J, et al. Enhanced curdlan production in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 by addition of low-polyphosphates [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2011, 16(1): 34-41.
- [11] Sakamoto Y, Nakade K, Konno N. Endo- β -1,3-glucanase GLU1, from the fruiting body of *Lentinula edodes*, belongs to a new glycoside hydrolase family [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(23): 8350-8354.
- [12] Nobe R, Sakakibara Y, Fukuda N, et al. Purification and characterization of laminaran hydrolases from *Trichoderma viride* [J]. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2003, 67(6): 1349-1357.
- [13] Tanabe Y, Oda M. Molecular characterization of endo-1,3- β -glucanase from *Cellulosimicrobium cellulans*: Effects of carbohydrate-binding module on enzymatic function and stability [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2011, 1814(12): 1713-1719.
- [14] Cota J, Alvarez T M, Citadini A P, et al. Mode of operation and low-resolution structure of a multi-domain and hyperthermophilic endo- β -1,3-glucanase from *Thermotoga petrophila* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 406(4): 590-594.
- [15] Kikuchi T, Shibuya H, Jones J T. Molecular and biochemical characterization of an endo- β -1,3-glucanase from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* acquired by horizontal gene transfer from bacteria [J]. Biochemical Journal, 2005, 389(Pt 1): 117-125.
- [16] Zakharenko A M, Kusaykin M I, Kovalchuk S N, et al. Enzymatic and molecular characterization of an endo-1,3- β -D-glucanase from the crystalline styles of the mussel *Perna viridis* [J]. Carbohydrate research, 2011, 346(2): 243-252.

(上接第 297 页)

- [7] 唐玉芳, 梁漪莲. 无汞吸收法测定白糖中亚硫酸盐[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 270-272.
- [8] 杨文英, 王芳. 甲醛吸收-盐酸副玫瑰苯胺法测定食品中的亚硫酸盐[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(4): 400-402.
- [9] 戎江瑞, 俞安复, 张立军, 等. 无汞吸收液测定食品中亚硫酸盐方法探讨[J]. 现代预防医学, 2007, 34(7): 1342-1344.
- [10] 余娟, 卢家炯, 郭剑雄. 三乙醇胺吸收-盐酸副玫瑰苯胺分光光度法测定白砂糖中的二氧化硫[J]. 甘蔗糖业, 2009(1): 41-45.
- [11] 滕金兰, 宁方尧. 白砂糖中二氧化硫测定结果的不确定

度分析[J]. 广西轻工业, 2009(2): 5-6, 17.

- [12] 王玫. 甲醛吸收-盐酸副玫瑰苯胺分光光度法测定污染源中二氧化硫的改进[J]. 福建分析测试, 2011(2): 34-36.
- [13] 张伟. 甲醛缓冲溶液吸收-盐酸副玫瑰苯胺分光光度法测定空气中二氧化硫几点探讨[J]. 科技与企业, 2012(8): 326.
- [14] 顾海峰. 甲醛吸收-副玫瑰分光光度法测定环境空气中的二氧化硫[J]. 轻工科技, 2012(6): 128-129.
- [15] 余娟. 白砂糖中二氧化硫测定方法的分析及探讨[D]. 南宁: 广西大学, 2007.