

# 低聚磷酸盐对粪产碱杆菌合成热凝胶的影响

于丽珺 路敬 吴剑荣\* 郑志永 詹晓北

(江南大学生物工程学院 教育部工业微生物重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 粪产碱杆菌合成热凝胶需要消耗大量 ATP 用于前体物质 UDPG 的再生, 利用 3 种具有不同高能磷酸键的低聚磷酸盐  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (2P)、 $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  (3P) 和  $(\text{NaPO}_3)_6$  (6P) 作为高能磷酸键供体, 并取代培养基中的  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  (1P) 而作为磷元素供体, 研究其对粪产碱杆菌合成热凝胶的影响。结果表明相对于对照磷元素摩尔含量的单倍和双倍量添加 3P 和 6P 能够分别提高热凝胶产量 23% 和 134%, 达到 15.1 g/L 和 30.0 g/L; 同时副产物乙酸分别较对照降低了 87.5% 和 77.7%; 在以双倍量添加 6P 后, 副产物甲酸的生成也显著降低 75.7%。当培养基中不含碳酸钙进行低聚磷酸盐添加实验时, 生物量显著降低, 热凝胶合成几乎没有, 发酵液 pH 最低降到 2.1。以磷元素单倍量和双倍量分别添加 3P 和 6P, 并与 1P 混合发酵时, 热凝胶产量变化不大; 但是, 当发酵液不存在碳酸钙而 1P 被作为缓冲物质时, 以单倍量和双倍量添加 6P 使得热凝胶产量较对照分别提高 60.4% 和 49.4%, 分别达到 18.4 g/L 和 16.9 g/L。

**关键词:** 低聚磷酸盐, 高能磷酸键, 热凝胶, 残磷, 有机酸

## Influence of Low-polyphosphates on Curdlan Production by *Alcaligenes faecalis* var. *myxogene*

YU Li-Jun LU Jing WU Jian-Rong\* ZHENG Zhi-Yong ZHAN Xiao-Bei

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** A large amount of ATP is consumed to regenerate precursor UDPG for curdlan biosynthesis in *Alcaligenes faecalis* var. *myxogens*. In this study, low-polyphosphates with high-energy phosphate bond of  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  (2P),  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  (3P) and  $(\text{NaPO}_3)_6$  (6P) were employed as high-energy phosphate bond and phosphate donor to substitute  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  (1P) in medium for curdlan production by *Alcaligenes faecalis* var. *myxogene*. Results showed that curdlan production was enhanced 23% and 134% than that of control respectively, which reached 15.1 g/L and 30.0 g/L, when one-fold and two-fold high concentration of phosphate from 3P and 6P were added in the medium. Meanwhile, byproducts of acetic acid were decreased 87.5% and 77.7% respectively. Formic acid was also decreased 75.7% when two-fold 6P were added in the medium. However, when  $\text{CaCO}_3$  was removed in the medium, pH and biomass were decreased remarkably, therefore, little or no curdlan was produced when these low-polyphosphates were



酸钠[(NaPO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]为化学纯;焦磷酸钠(Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)等其他试剂均为国产分析纯;乙腈为色谱纯。

**1.1.3 培养基:**斜面培养基(g/L):葡萄糖 40,酵母粉 5.0,琼脂粉 20, CaCO<sub>3</sub> 5, pH 7.0–7.2。种子培养基(g/L):葡萄糖 20,酵母粉 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.74, MgSO<sub>4</sub> 0.5, pH 7.0–7.2。发酵培养基(g/L):葡萄糖 50,酵母粉 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.7, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.7, MgSO<sub>4</sub> 0.5, CaCO<sub>3</sub> 5, 10 mL 无机盐浓缩液, pH 7.0–7.2。

## 1.2 方法

**1.2.1 种子培养:**从斜面上挑取一环菌,接入装有 60 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 30°C、200 r/min 培养 17–18 h。

**1.2.2 摇瓶发酵培养:**将 5 mL 种子液接入装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶, 30°C、200 r/min 培养 72 h。

**1.2.3 热凝胶产量测定:**取 20 mL 发酵液,于 8000 r/min 离心 20 min,向离心得到的沉淀中添加 1 mol/L 的 NaOH 20 mL,振荡放置 3 h,使热凝胶充分溶解,离心,取上清液,用 3 mol/L HCl 调 pH 至中性,得到半透明的凝胶,再离心,向沉淀中加蒸馏水洗涤离心若干次,在 85°C 烘干至恒重,称重计算产量。

**1.2.4 生物量测定:**干重法测定,对提取热凝胶后的沉淀物,加 1 mol/L HCl 溶解其中的 CaCO<sub>3</sub>,反复洗涤,烘干,称量,计算菌体浓度。

**1.2.5 残糖测定:**DNS 法<sup>[18]</sup>,取少量发酵液上清置于 25 mL 比色管中,补足水至 3 mL,加入 1.5 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min,冰水浴冷却,用水补足到 25 mL,波长 520 nm 下测定吸光度。

**1.2.6 有机酸测定:**高效液相色谱法;色谱柱:安捷伦 ZORBAX SB-Aq 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温:30°C;紫外检测波长:210 nm。

**1.2.7 残磷测定方法:**钼酸铵法,取一定量发酵液上清置于 25 mL 比色管中,补水至 3 mL,加入 2 mL 25 g/L 的钼酸铵、1 mL 5 g/L 对苯二酚和 1 mL 200 g/L 的亚硫酸钠溶液,振荡均匀,在室温下显色 30 min,波长 550 nm 下测定吸光度。

**1.2.8 数据分析:**本实验每个处理和空白对照都分别设置 3 个重复平行实验,将实验结果输入 SPSS 13.0,进行 T 值检测,在 95%的置信区间内,如果  $P < 0.05$ ,则表明试验组与空白对照组有显著性

差异,文中所有统计均依照此方法。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同低聚磷酸盐对粪产碱杆菌发酵生产热凝胶的影响

为了研究低聚磷酸盐能否替代发酵培养基中的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1P)而被用于粪产碱杆菌生物合成热凝胶,本研究分别添加 2 个浓度的 Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (2P)、Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub> (3P)和(NaPO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> (6P)进行摇瓶发酵研究。对照原始培养基中 1P 的磷元素含量 0.027 mol/L,选择低聚磷酸盐添加量中磷元素含量分别为 0.027 mol/L 和 0.054 mol/L,即为原始培养基 1P 中磷元素摩尔量的单倍和双倍,发酵 72 h,测定终发酵液中的残磷、生物量、热凝胶含量和 pH 值等参数,实验结果如图 3 所示。当以单倍和双倍于空白的磷元素量添加 3 种磷酸盐发酵 72 h 后,发酵液 pH 值(数据未列出)和生物量较空白没有显著性变化;单倍浓度添加 3P 的热凝胶产量最高,达到 15.1 g/L,较空白显著提高 23%,而添加 2P 和 6P 时热凝胶产量较空白无显著性变化。以双倍浓度添加 6P 时热凝胶产量较空白显著性提高 134%,达到 30.0 g/L。残磷分析表明,分别以两个浓度添加低聚磷酸盐发酵后,发酵液的残磷含量都比空白低,磷元素聚合度越高,发酵液残磷含量越低,并且残磷含量随低聚磷酸盐初始添加量的提高而上升。

### 2.2 添加不同低聚磷酸盐发酵液有机酸含量分析

低聚磷酸盐的添加可能会影响细胞的生理代谢特征,因此本研究通过高效液相色谱(HPLC)测定了发酵液副产物有机酸含量,结果如图 4 所示。当以单倍和双倍浓度添加 3 种低聚磷酸盐后,发酵液中乙酸含量都较空白显著性降低,但是添加 3 种磷酸盐发酵液之间的乙酸含量没有显著变化。以单倍和双倍浓度分别添加 3P 和 6P 在提高热凝胶产量的同时也使乙酸含量分别较空白降低 87.5%和 77.7%;以两种浓度添加 3P 后,发酵液甲酸含量没有显著变化。但是以双倍浓度添加 6P 后,发酵液甲酸含量较空白显著性降低 75.7%,即以含双倍于空白磷元素量的浓度添加 6P 在提高热凝胶产量的同时降低了多种副产物有机酸的合成。这个结果可能是由于低聚磷酸盐的加入降低了菌体对于 EMP 和 TCA 循环

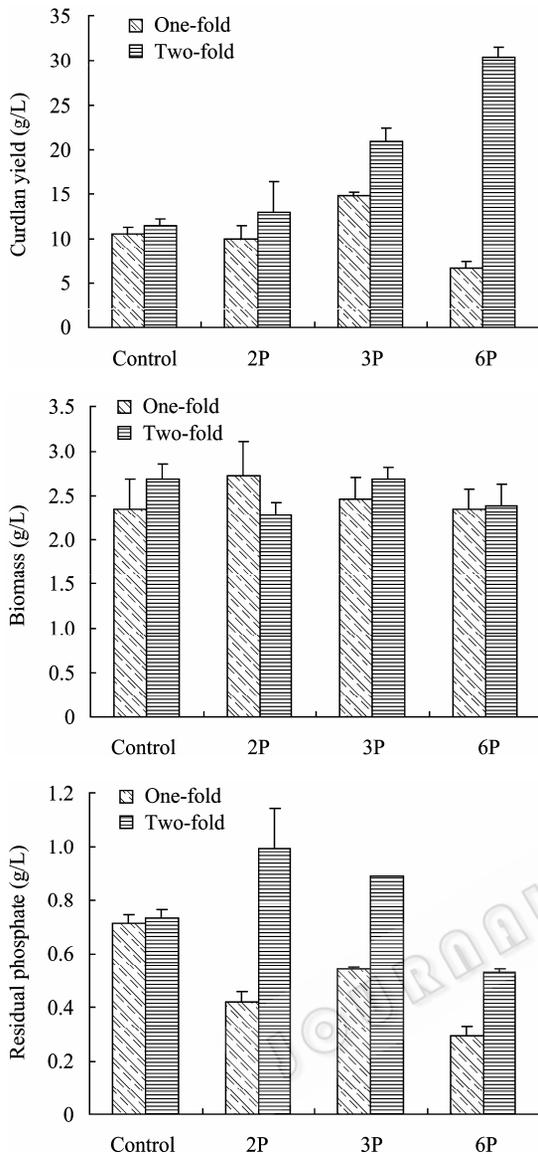


图 3 以单倍和双倍磷元素量添加低聚磷酸盐对热凝胶生产的影响

Fig. 3 Influence of low-polyphosphates on curdian production at one-fold and two-fold adding amount

注: 图中 2P、3P、6P 分别代表  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  和  $(\text{NaPO}_3)_6$ 。  
Note: 2P, 3P and 6P represented  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  and  $(\text{NaPO}_3)_6$ .

所产生的能量物质 ATP 的需求, 而其自身磷元素的解离所释放的高能磷酸键被用于热凝胶前体物质 UTP 的再生; 也可能是菌体胞内聚合磷元素含量的变化从更深层次上影响了菌体抵抗氮源限制环境的能力, 提高了胞外多糖的合成, 例如提高热凝胶合成关键酶编码基因的转录和表达等。

### 2.3 无碳酸钙条件下低聚磷酸盐对粪产碱杆菌发酵生产热凝胶的影响

粪产碱杆菌发酵生产热凝胶过程中 pH 变化

是非常重要的参数。在发酵罐中可通过调节前期 pH 7.0、后期 pH 5.6 进行控制发酵; 在摇瓶中则通过碳酸钙和磷酸氢盐调节。为了确定低聚磷酸盐是否通过改变发酵液 pH 而影响粪产碱杆菌合成热凝胶以及是否和 1P 一样具有一定的缓冲能力, 本研究进行了一组培养基不添加碳酸钙而添加低聚磷酸盐的实验, 结果如图 5 所示。以单倍浓度添加低聚磷酸盐发酵 72 h 后, 发酵液 pH 变化剧烈, 都较空白显著性降低, 并且随着磷元素聚合度的升高, 发酵液 pH 呈降低趋势, 最低达到 pH 2.0, 生物量也随之降低。当提高磷元素添加量到双倍时, 发酵液的 pH 和生物量整体有所提高, 可能是由于提高添加量会少量增加发酵液的缓冲能力, 但是热凝胶产量还是显著低于对照。说明这 3 种低聚磷酸盐没有或者有较弱的缓冲能力, 并且聚合度越高, 缓冲能力越弱。在碳酸钙存在下添加时, 发酵液的最终 pH 相对于参照都没有显著性变化, 菌体能正常的生长和合成产物。但是, 当培养基不含有碳酸钙作为缓冲物质时, 最终发酵液 pH 发生显著变化, 不适于菌体的生长。因此以低聚磷酸盐代替 1P 进行热凝胶发酵时, 必须要加入  $\text{CaCO}_3$  等类似的缓冲物质, 也可能菌体利用聚合磷的多聚磷转移酶的活性维持或提高需要钙离子参与。

### 2.4 低聚磷酸盐和 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 混合添加对热凝胶发酵的影响

上述研究表明在添加低聚磷酸盐进行热凝胶发酵时必须在培养基中添加具有缓冲能力的物质, 例如磷酸二氢钾或者碳酸钙, 才能维持发酵过程中菌体所需的最适酸度。为此, 我们研究了低聚磷酸盐与 1P 共存于发酵培养基时对热凝胶发酵的影响, 即在发酵时能否同时利用 1P 的缓冲能力和低聚磷酸盐的高能磷酸键。本实验按照前述实验优化的低聚磷酸盐添加种类和浓度, 进行低聚磷酸盐和 1P 混合发酵研究, 实验分培养基含碳酸钙和不含碳酸钙的两种情况进行, 进一步研究钙离子在低聚磷酸盐影响热凝胶发酵中的作用。

从图 6 中可以看出, 以两个浓度(单倍和双倍)添加 3P 和 6P 分别与 1P 混合发酵 72 h 后, 当存在  $\text{CaCO}_3$  和 1P 时, 各组实验之间的 pH 没有显著差异。发酵液残磷含量较空白显著升高, 符合前述实验结论, 即发酵液残磷随着低聚磷酸盐添加量的增加而

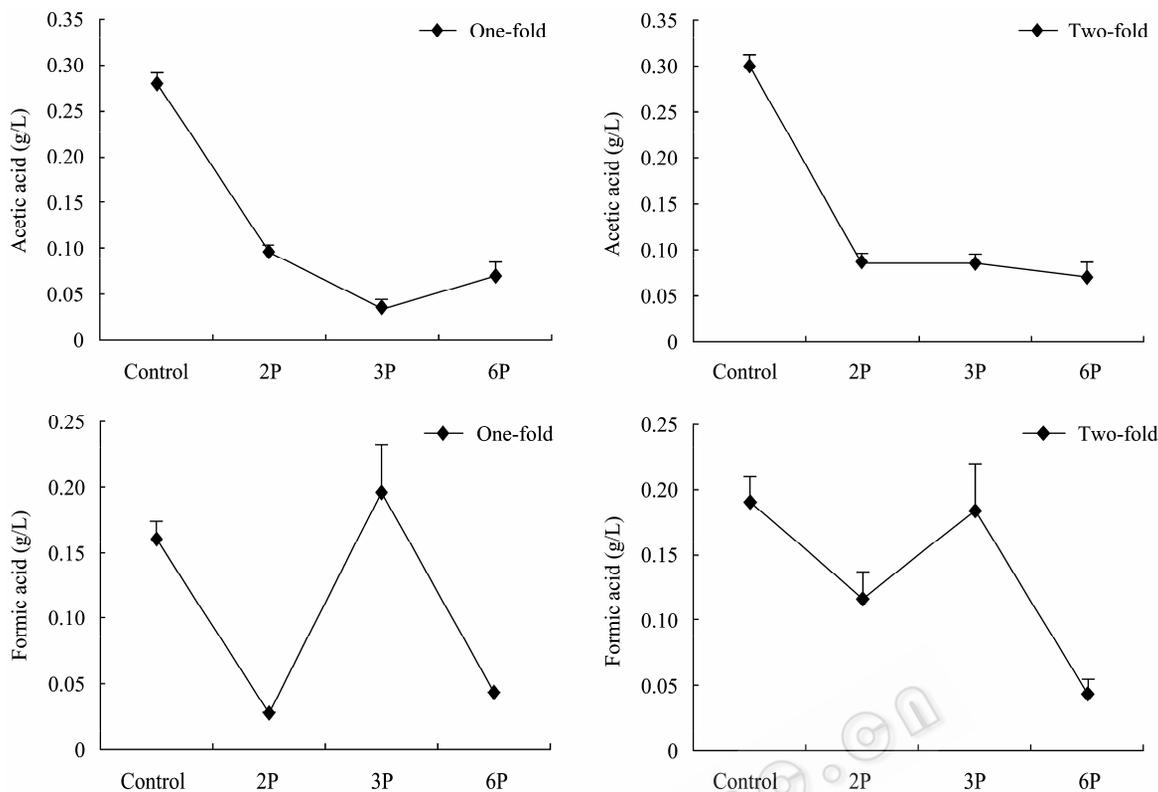


图4 添加不同低聚磷酸盐发酵液有机酸含量分析

Fig. 4 Analysis of organic acids in final medium after adding different low-polyphosphates

注: 图中 2P、3P、6P 分别代表  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  和  $(\text{NaPO}_3)_6$ 。

Note: 2P, 3P and 6P represented  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  and  $(\text{NaPO}_3)_6$ 。

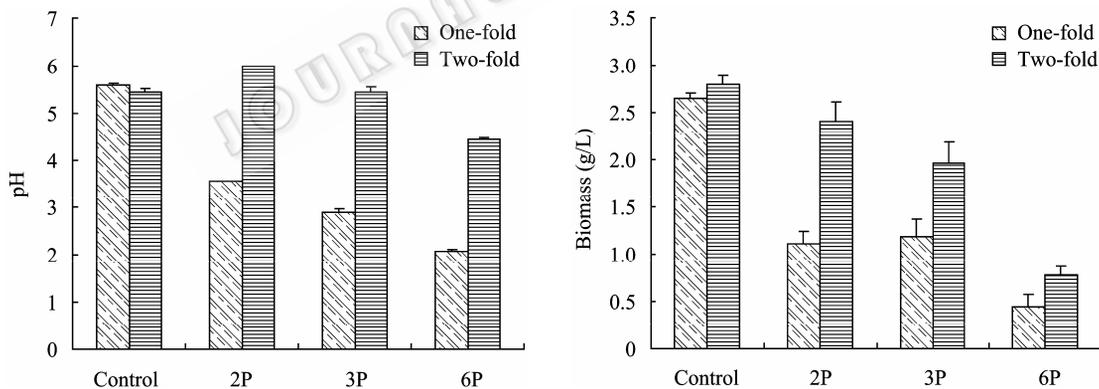


图5 无碳酸钙条件下低聚磷酸盐对热凝胶发酵的影响

Fig. 5 Influence of low-polyphosphates on curdlan production without  $\text{CaCO}_3$  in medium

注: 图中 2P、3P、6P 分别代表  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  和  $(\text{NaPO}_3)_6$ 。

Note: 2P, 3P and 6P represented  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  and  $(\text{NaPO}_3)_6$ 。

增加,但是相同添加浓度下随着磷元素聚合度的升高而发酵液残磷降低,所以在相同添加浓度下,添加 3P 的残磷含量最多。若以单倍浓度添加这两种低聚磷酸盐,热凝胶产量与对照没有显著性差异。但是以双倍浓度添加时,热凝胶产量都较参照减少了,这可能是由于发酵液存在碳酸钙作为缓冲物质时,1P 不需要被作为缓冲物质,并且当发酵液中共存这

两类磷酸盐时,菌体对二者的利用符合细胞经济原理,即优先利用容易解离的 1P,使发酵液残磷含量过多,不利于热凝胶的合成。当发酵培养基中不含  $\text{CaCO}_3$  并同时添加 1P 和低聚磷酸盐时,由于没有  $\text{CaCO}_3$  的存在,降低了发酵液自身的缓冲能力,添加两种低聚磷酸盐的发酵液 pH 都较空白显著降低。分别以两个浓度添加 6P 时,发酵液热凝胶产量较空白

分别提高 60.4%和 49.4%, 达到 18.4g/L 和 16.9 g/L。可能是由于部分 1P 被用于缓冲物质, 使低聚磷更多地被解离, 释放更多地高能磷酸键, 利于热凝胶的合成。而添加 3P 的发酵液残磷含量最高, 不利于产物合成, 由此可得出聚合磷酸盐的聚合度越高越适于需能物质合成。

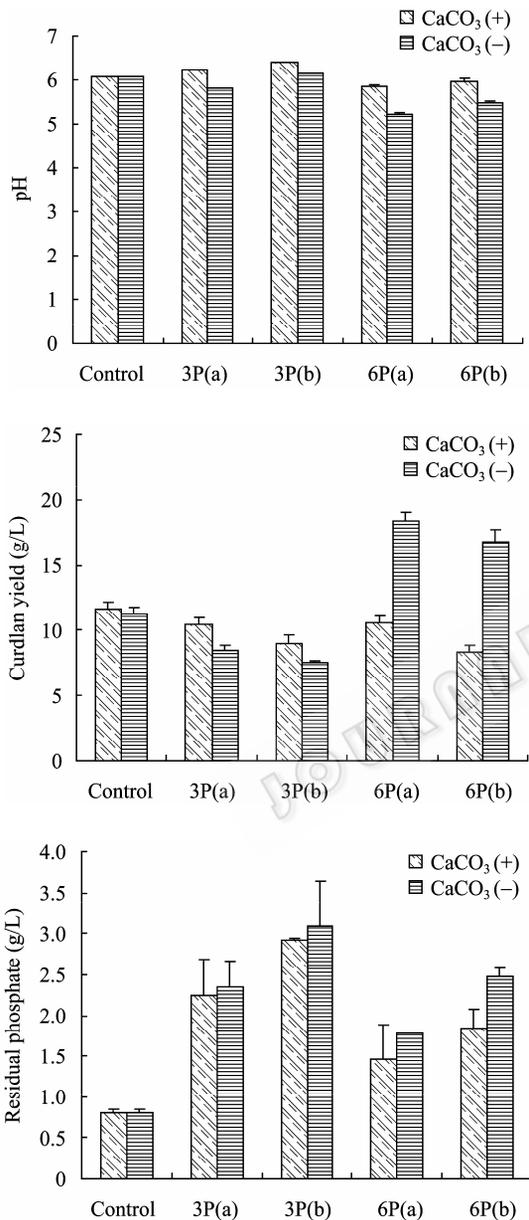


图 6 3P, 6P 分别与  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  混合添加对热凝胶发酵的影响

Fig. 6 Influence of 3P, 6P mixed with  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  on curdlian production

注: 图中 2P、3P、6P 分别代表  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  和  $(\text{NaPO}_3)_6$ ; a: 单倍添加量; b: 双倍添加量。

Note: 2P, 3P and 6P represented  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  and  $(\text{NaPO}_3)_6$ ; a: One-fold; b: Two-fold.

## 2.5 不同浓度和方式添加 6P 对热凝胶产量的影响

从上述几组实验可以得出, 6P 在不同的添加浓度和方式下对粪产碱杆菌合成热凝胶都有显著影响。表 1 总结了 6P 在不同添加方式和浓度下对热凝胶产量的影响。

表 1 不同添加浓度和方式添加 6P 对热凝胶产量的影响  
Table 1 Influence of 6P on curdlian production at different adding amount and style

添加量 Amount	CaCO <sub>3</sub>	1P	热凝胶(g/L) Curdlian yield (g/L)
One-fold	+	-	6.8 ± 0.64
Two-fold	+	-	30.0 ± 1.02
One-fold	-	-	0
Two-fold	-	-	0
One-fold	+	+	10.6 ± 0.59
Two-fold	+	+	8.3 ± 0.54
One-fold	-	+	18.1 ± 0.63
Two-fold	-	+	16.9 ± 0.82

从表 1 中可以看出, 6P 以单倍量添加在以  $\text{CaCO}_3$  为缓冲物质而没有 1P 的发酵液中时, 热凝胶产量较低, 但是当提高添加量为两倍时, 热凝胶产量显著提高到 30.0 g/L。当同时添加  $\text{CaCO}_3$  和 1P 作为缓冲物质时, 以两种浓度添加时, 热凝胶产量变化不大, 但是当发酵液不存在  $\text{CaCO}_3$ 、1P 作为缓冲物质, 而磷元素主要由 6P 提供时, 以两个浓度添加 6P 时热凝胶产量都显著提高。因此, 为使得 6P 发挥高能磷酸键和磷元素供体作用, 培养基中必须要有缓冲物质维持发酵液 pH 稳定, 而且没有比它易解离的一磷酸盐或其他低聚磷酸盐与其竞争作为磷元素供体。从表 1 还可以看出, 在发酵液中以磷酸氢盐作为缓冲物质时, 添加 6P 对热凝胶产量的提高没有以  $\text{CaCO}_3$  为缓冲物质的高, 进一步说明磷酸氢盐在作为缓冲物质的同时还为发酵液提供了一定的磷元素, 不利于聚磷酸盐发挥作用。

## 3 讨论

低聚磷酸盐对粪产碱杆菌发酵生产热凝胶有多方面的显著影响, 其中之一就是低聚磷酸盐的解离度。在以 2 个浓度添加 2P、3P 和 6P 后, 由于磷元素高度聚合的原因, 导致在与空白相同的添加浓度下解离的磷元素较少, 使得发酵液残磷含量显著低

于空白并且磷元素聚合度越高发酵液残磷含量越低。当低聚磷酸盐添加浓度较低时,解离的磷元素不能满足菌体生长,生物量显著降低,不能有效合成热凝胶;但是当提高低聚磷酸盐的添加量,使解离的磷元素能保证菌体的正常生长时,热凝胶产量提高且副产物减少。如果发酵液存在缓冲物质,并且没有一磷酸盐与其竞争作为磷元素供体,低聚磷酸盐会较多的被解离,释放较多的高能磷酸键,利于热凝胶的合成。但是发酵液残磷含量浓度不能超过菌体的耐受范围,因此磷元素聚合度越高越利于热凝胶合成。

本研究为提高微生物发酵生产胞外多糖的能力开辟了一条新的途径,未来研究可以采用聚合度更高的聚磷酸盐作为高能磷酸键和磷元素的供体进一步研究其对微生物发酵生产胞外多糖的影响,研究聚合磷加入后菌体胞内能荷物质及热凝胶合成关键酶活性的变化,从更深的理论层面研究聚合磷酸盐对微生物合成胞外多糖的影响。

## 参 考 文 献

- [1] Jagodzinski PP, Wiaderkiewicz R, Kurzawski G, *et al.* Mechanism of the inhibitory effect of curdlan sulfate on HIV-I infection *in vitro*. *Virology*, 1994, **202**(2): 735–745.
- [2] Mikio K, Yoshiro O, Hiroto O, *et al.* Water soluble  $\beta$ -(1,3)-glucan derivative and antiviral agent containing the derivative. Japan. 07228601, 1995.
- [3] Evans SG, Morrison D, Kaneko Y, *et al.* The effect of curdlan sulfate on development *in vitro* of *Plasmodium falciparum*. *Trans R So Trop MedHyg*, 1998, **92**(1): 87–89.
- [4] Lawford HG, Phillips KR, Lawford GR. Two stage continuous process for the production of thermogelable curdlan-type exopolysaccharide. *Biotechnol Lett*, 1982, **4**(11): 689–694.
- [5] Lee JH, Lee IY, Kim MK, *et al.* Optimal pH control of batch process for production of curdlan by *Agrobacterium* species. *J and Microbio Biotechnol*, 1999, **23**(2): 143–148.
- [6] Lee JH, Lee IY. Optimization of uracil addition for curdlan ( $\beta$ -1,3-glucan) production by *Agrobacterium* sp.. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**(14): 1131–1134.
- [7] Lee IY, Kim MK, Lee JH, *et al.* Influence of agitation speed on production of curdlan by *Agrobacterium* species. *Bioprocess Eng*, 1999, **20**(4): 283–287.
- [8] West TP. Pyrimidine base supplementation effects curdlan production in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749. *J Basic Microbiol*, 2006, **46**(2): 153–157.
- [9] Zheng ZY, Lee JW, Zhan XB, *et al.* Effect of metabolic structures and energy requirements on curdlan production by *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2007, **12**(4): 359–365.
- [10] Noguchi T. Use of *Escherichia coli* polyphosphate kinase for oligosaccharide synthesis. *Biosci Biotechnol Biochempotential*, 1998, **92**(8): 1594–1596.
- [11] Murata K, Uchida T, Kato J, *et al.* Polyphosphate kinase: distribution, some properties and its application as an ATP regeneration system. *Agric Biol Chem*, 1988, **52**(6): 1471–1477.
- [12] Kulaev I, Vagabov V. New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J of Biosci Bioeng*, 1999, **88**(2): 111–129.
- [13] Ziyi Liu, Jianbo Zhang, Xi Chen, *et al.* Combined biosynthetic pathway for de novo production of UDP-galactose: catalysis with multiple enzymes immobilized on agarose beads. *Chembiochem*, 2002, **3**(4): 348–355.
- [14] Kwang-Seo Kim, Narayana N Rao, Cresson D Fraley, *et al.* Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp.. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(11): 7675–7680.
- [15] Thomas P Werner, Nikolaus Amrhein, Florian M Freimoser. Inorganic polyphosphate occurs in the cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii* and accumulates during cytokinesis. *Plant Biol*, 2007, **7**(51): 1–11.
- [16] Boguslaw Nocek, Samvel Kochinyan, Michael Proudfoot, *et al.* Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(46): 17730–17735.
- [17] Seishi Iwamoto, Kei Motomura, Yasuharu Shinoda, *et al.* Use of an *Escherichia coli* recombinant producing thermostable polyphosphate kinase as an ATP regenerator to produce fructose 1,6-diphosphate. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(17): 5676–5678.
- [18] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **31**(3): 426–428.