

新型水溶性(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖的性质

黄超, 缪铭, 金征宇, 江波*

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用明串珠菌 SK24.002 发酵制备水溶性(1→3)(1→6)-α-D 葡聚糖, 采用高效液相色谱仪、扫描电镜、Zeta 电位/粒径仪、热分析系统、差示扫描量热仪、旋转流变仪等现代分析方法测定其理化性质。结果表明, 该葡聚糖表面呈多孔网络结构, 能溶于水, 溶液中粒径分布在 40~160 nm 范围内。相对分子质量分布呈单一峰, 具有较高的热稳定性, 200 ℃以下只失去了吸附水, 当温度在 265~345 ℃时, 发生强烈的热裂解反应, (1→3)(1→6)-α-D 葡聚糖溶液的黏度在 5~10 g/dL 范围内随着质量浓度增加呈指数上升, 高浓度的葡聚糖溶液呈现剪切变稀特性, 能形成弱凝胶。

关键词: (1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖; 扫描电镜; 热特性分析; 流变特性

中图分类号: Q 814.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)11—1129—06

Physicochemical Properties of a Novel Water-Soluble(1→3)(1→6)-α-D-Glucan

HUANG Chao, MIAO Ming, JIN Zhengyu, JIANG Bo*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This paper studied physicochemical properties of the water-soluble (1→3)(1→6)-α-D-glucan from *Leuconostoc.sp.* SK24.002 by high performance liquid chromatography, scanning electron microscope (SEM), Zeta Nano, thermogravimetry, differential scanning calorimetry and rotational rheometer. Surface morphology showed that the glucan had a porous structure and its particle size in water solution ranged from 40 to 160 nm. It had a narrow and single weight distribution and a relatively high thermal stability and decomposed at 265~345 ℃. The viscosity increased exponentially with its concentration in the range of 5 to 10 g/100 mL, and concentrated solution showed typical shear-thinning behavior and possessed an obvious weak gel-like character.

Keywords: (1→3)(1→6)-α-D-glucan, SEM, thermal properties, rheological character

多糖是一类空间结构复杂的生物大分子, 广泛存在于各种动植物体内, 也可由微生物合成。水溶性葡聚糖作为一类重要的葡聚糖, 由于其潜在的生物活性及加工性能越来越受到人们的重视^[1]。李哲

涛^[2]等人发现苦瓜多糖和南瓜多糖都具有抗肿瘤活性, 硫酸化修饰可以提高多糖的抗肿瘤活性。Carol F^[3]等发现燕麦中 β-葡聚糖是一种膳食纤维, 可以降低血清中的胆固醇和血糖, 有助于人体健康。李

收稿日期: 2015-01-19

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102102); 国家自然科学基金重点项目(31230057); 江苏省科技攻关计划项目(BE2012613, BE2013311)。

* 通信作者: 江波(1962—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品生物技术研究。

E-mail: bjiang@jiangnan.edu.cn

蓉^[4]等人从甜玉米胚乳中提取的水溶性葡聚糖在体外模拟消化条件下其生物降解速率远低于蜡质玉米淀粉,能缓慢释放葡萄糖,在慢性消化方面显示出较大的优势。此外,一些多糖还具有抗氧化,提高人体免疫力等作用^[5-6]。

作者用到的多糖由明串珠菌 SK24.002 发酵制备,结构单一,纯度高,是一种新型水溶性(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖^[7]。目前国内外对该类型的葡聚糖很少报道。主要通过扫描电子显微镜(SEM)、Zeta 电位/粒径仪、热分析系统(TGA)、差示扫描量热仪(DSC)和流变仪等仪器对(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖基本性质进行探究,为扩大该葡聚糖在食品工业中的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种 明串珠菌 SK24.002:江南大学食品科学与技术国家重点实验室保藏。

1.1.2 主要试剂 葡聚糖标品 Dextran(相对分子质量 650 000):购于 Sigma 公司;阿拉伯胶样品:凯爱瑞集团提供;其余样品均为分析纯。

1.1.3 培养基 MRS 培养基配方:酪蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 10.0 g,酵母粉 5.0 g,葡萄糖 5.0 g,加入 1 L 蒸馏水溶解均匀,后加入乙酸钠 5.0 g,柠檬酸二胺 2.0 g,吐温 80 1.0 mL, K_2HPO_4 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.05 g, 调节 pH 至 6.8, 121 °C 高压灭菌 20 min。

1.1.4 主要仪器设备 Delta 320s 型 pH 计:美国梅特勒-托利多仪器有限公司产品;Centrifuge 5804R 离心机:德国 Eppendorf 公司产品;Zeta 电位/粒径仪(Nano ZS):英国 Malvern 公司产品;数字显示粘度计:美国 Brookfield 公司产品;流变仪:美国 TA 公司产品;扫描电子显微镜:日本日立公司产品;差示扫描量热仪:美国 PerkinElmer 公司产品;热分析系统:瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司产品;AVANCE III 400 MHz 全数字化核磁共振谱仪:美国 Bruker 公司产品;多角度激光光散射凝胶色谱系统(HPSEC-MALLS-RI):美国 Wyatt 公司产品;Shodex OH pak SB-806 HQ 凝胶柱:日本 Shodex 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 水溶性(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖提取 参

考白爱娟等人的方法^[8],将活化后的菌种按体积分数 5%的接种量将种子液接入到 1 L 的发酵培养基中,160 r/min,28 °C 恒温振荡培养 48 h。培养结束后,将发酵液离心(6 000 r/min,15 min)得到上清液。取等体积的无水乙醇与发酵上清液混匀,搅拌 10 min 后,离心(10 000 r/min,10 min),蒸馏水复溶沉淀,加入等体积无水乙醇沉淀、离心、蒸馏水复溶,同样方法重复 3 次,得到的粗多糖利用 Sevage 法除蛋白质^[9]。除完蛋白质后的水溶性葡聚糖用蒸馏水复溶,真空干燥,得到水溶性葡聚糖粉末(苯酚-硫酸法测得总糖质量分数为 96.86%),于干燥皿中保藏。

1.2.2 核磁共振(^{13}C NMR)分析 称取 50 mg 葡聚糖样品溶于 0.45 mL 的 D_2O 中,进行 ^{13}C NMR 分析,测试温度 70 °C,5 mm PABBO-BB 探针,zg30 的脉冲序列。测试条件:1D ^{13}C -NMR:24 038 Hz 的扫描宽度,弛豫时间 2 s,记录 1 401 次扫描。

1.2.3 水溶性葡聚糖表面形态观察 取少量样品粉末,粘着于样品台上,置于真空喷镀仪内喷金,用扫描电子显微镜观察表面形态特征。

1.2.4 水溶性葡聚糖相对分子质量及其分布测定 称取一定质量葡聚糖样品,用去离子水配成浓度为 1 mg/mL 的溶液,过 0.45 μm 的滤膜备用。样品绝对相对分子质量及其分布由高效液相排阻色谱(HPSEC)、多角度激光散射检测器(MALLS)和示差折光检测器(RI)联用系统测定。其中,多角度激光散射检测器中 He-Ne 激光源的波长 λ 为 632.8 nm,选用 Shodex OHpak SB-806HQ 色谱柱,流动相为 0.1 mol/L $NaNO_3$ 溶液,流量为 0.5 mL/min,葡聚糖的折光指数增量设定为 $dn/dc=0.146$,利用 Astra 软件对色谱图中的单个色谱峰进行分析^[7]。

1.2.5 水溶性葡聚糖粒径分布 将水溶性葡聚糖粉末用蒸馏水配成质量分数 0.1%,在 25 °C 下用粒径仪测定其粒径分布。

1.2.6 水溶性葡聚糖的热特性分析(DSC,TGA) 称取 2 mg 水溶性葡聚糖粉末于铝盘中,从 30 °C 到 300 °C 以 10 °C/min 加热速率扫描,测定该水溶性多糖的变性温度和活化能等。

将一定量的水溶性葡聚糖粉末置于热分析天平中,用氮气(50 mL/min)置换,以 10 °C/min 的速率从 45 °C 升温至 550 °C。记录升温过程中的失重曲线。

1.2.7 水溶性葡聚糖流变特性分析 准确称取一定质量的葡聚糖样品,加入去离子水调成不同浓度

的样品溶液。置于磁力搅拌器上加热搅拌 2 h,待样品完全溶解后,放入 4 ℃ 冰箱备用。样品溶液使用前,常温放置 1 h。

不同浓度的水溶性葡聚糖溶液粘度由数字显示粘度仪在 25 ℃ 下测定,选择 RV3 转子。

不同浓度的水溶性葡聚糖样品流变特性由 AR-G2 流变仪测定。采用锥板-平板测量系统。锥板直径 40 mm,设置间隙 0.5 mm,加样后,刮去平板外多余样品,加上盖板,并加入硅油以防止水分蒸发。每次测试均需更换样品。

静态剪切流变测试:在 25 ℃ 下,剪切速率($\dot{\gamma}$)从 0.01~100 s^{-1} 递增,测定多糖溶液随剪切速率增加时表观粘度(η)的变化,由计算机自动进行数据采集和记录。

动态黏弹性测定:采用小幅震荡模式。温度 25 ℃,控制应变 0.2 % (处于线性黏弹区),测定由低频率(0.1 Hz)至高频率(10 Hz)内储能模量(G')、损耗模量(G'')随着频率的变化,由计算机自动进行数据采集和记录。

2 结果与讨论

2.1 水溶性葡聚糖的结构鉴定

利用 ^{13}C -NMR 测定葡聚糖的结构,结果如图 1 所示。葡聚糖 ^{13}C 谱的中,异头碳信号出现在 $90 \times 10^{-6} \sim 110 \times 10^{-6}$,非异头碳信号出现在 $60 \times 10^{-6} \sim 85 \times 10^{-6}$ 。图中 $\delta 99.62 \times 10^{-6}$ 和 $\delta 98.40 \times 10^{-6}$ 出现两个强度相当的信号,均为 α -吡喃葡萄糖残基的 C1 信号峰,说明该葡聚糖中主要含有两种类型的糖苷键,且含量相当。这两个信号分别对应 1,3-糖苷键和 1,6-糖苷键中 C1 的化学位移。C3 和 C6 的化学位移一般出现在 73.00×10^{-6} 和 61.00×10^{-6} 左右^[10],由图 1 可以看出,有部分 C3 和 C6 的信号分别出现在低场 81.57×10^{-6} 和 65.91×10^{-6} ,这是由于糖环上 C3 和 C6 上发生了连接,导致碳信号峰向低场移动,同时也说明该葡聚糖中主要存在 1,3-糖苷键和 1,6-糖苷键。图 1 中 71.94×10^{-6} , 69.70×10^{-6} 和 71.94×10^{-6} 附近的信号峰为其它未被连接的吡喃糖环上 C2, C4 和 C5 的信号峰。

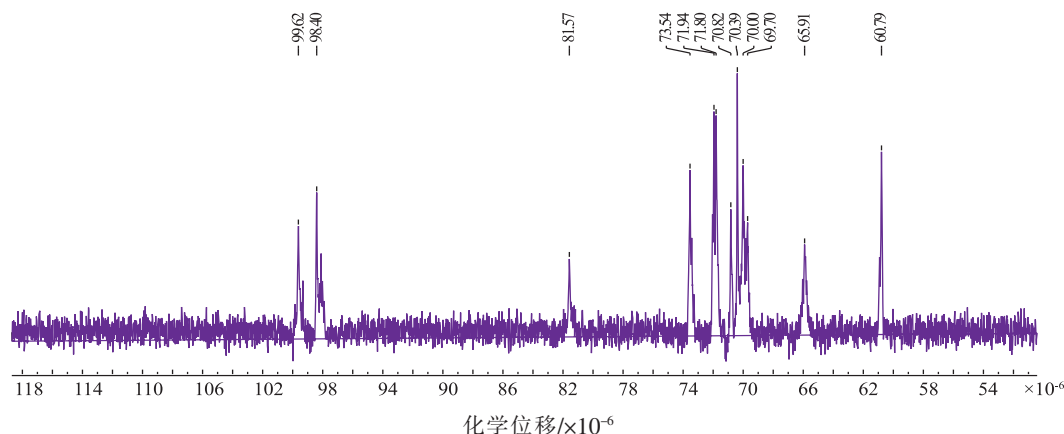


图 1 (1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖 ^{13}C -NMR 谱
Fig. 1 ^{13}C -NMR spectrum of (1→3)(1→6)-α-D-glucan

2.2 水溶性葡聚糖表面形态特征

利用扫描电子显微镜(SEM)观察葡聚糖的表面微观形态,结果如图 2 所示。(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖表面呈现相对比较均一的聚集体,并且聚集的形态比较相似,整体外观呈现聚集的网状结构。这种聚集可能是由于糖链中的一些官能团相互作用交联引起的。Majumder^[11]等人报道的乳酸菌胞外多糖也呈现类似的网状结构。这些网状结构中分布的空隙,能提高聚合物的持水力,使得该葡聚糖可以作为一种质构改良剂应用到食品工业中。

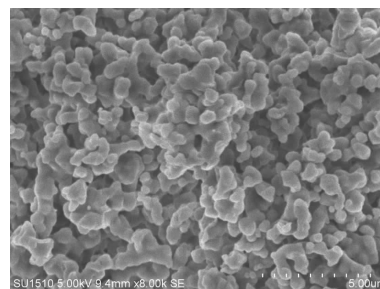


图 2 (1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖表面结构
Fig. 2 Scanning electron micrograph of (1→3)(1→6)-α-D-glucan

2.3 水溶性葡聚糖相对分子质量及其分布

多糖的理化性质往往和其相对分子质量密切相关。(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖的相对分子质量分布如图3所示。该水溶性葡聚糖的液相结果呈现一个单一对称的色谱峰,这表明利用此方法得到的葡聚糖相对分子质量分布均一,纯度高。利用系统软件分析,得到该葡聚糖的重均相对分子质量(M_w)为 1.71×10^7 ,数均相对分子质量(M_n)为 1.48×10^7 ,多分散性指数(M_w/M_n)为 1.16。多分散性指数可以用来表示多糖的相对分子质量分布,值越小,表明多糖的相对分子质量分布越集中。作者得到的水溶性(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖多分散性指数为 1.16,接近 1.0,说明该葡聚糖相对分子质量分布集中、均一。

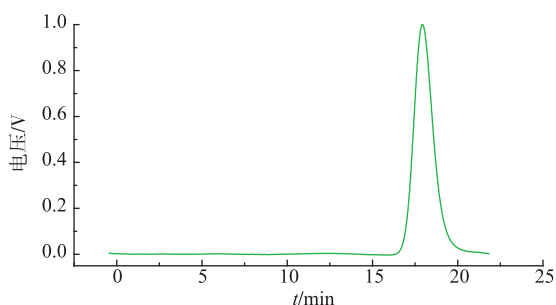


图3 (1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖相对分子质量分布图

Fig. 3 Molecular distribution of (1→3)(1→6)-α-D-glucan

2.4 水溶性葡聚糖粒径分布

利用 Zeta 电位/粒径仪分析葡聚糖在水溶液中的粒径大小及其分布,结果如图4所示。(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖粒径分布在 40~160 nm 范围内,通过 Zeta 电位/粒径仪分析,其平均粒径为 92.06 nm, PDI 值为 0.055。PDI 值反映了溶液体系的分散稳定性, PDI 值越小,则溶液越均一稳定。从实验结果看, (1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖溶于水后,具有稳定均一的分散体系,而且粒径分布集中,是一种典型的纳米微粒。

2.5 水溶性葡聚糖热特性分析

热特性是影响多糖应用的一个关键因素,实验中利用热分析系统(TGA)和差示扫描量热仪(DSC)对水溶性葡聚糖的热特性进行分析。

(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖热降解主要分为3个主要阶段,这与多糖的组成、含水量和聚集状态有关^[12]。在第一阶段中,葡聚糖只失去了吸附水和部

分结构水,整体的质量保持在一个稳定的范围内;当温度达到 265 ℃时,降解进入第二阶段,葡聚糖的重量开始出现快速下降。在该阶段内发生强烈的热裂解反应,发生了碳链和氢键的断裂,生成水和二氧化碳。当温度达到 500 ℃之后,葡聚糖质量损失的趋势再次变缓,这与 Zamora^[13]等人的结果一致。

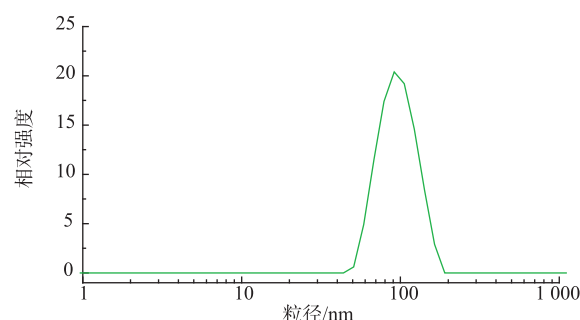


图4 (1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of (1→3)(1→6)-α-D-glucan

从 DSC 结果看, (1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖的相转变温度 (T_m) 在 133.89 ℃,由此产生的熔融焓 (ΔH_m) 为 111.93 J/g,活化能为 240.12 kJ/mol。在 260 ℃左右,葡聚糖开始降解,与热重分析结果相一致。很多乳酸菌胞外多糖的 T_m 值在 140~155 ℃范围内, ΔH_m 值处于 101~217 J/g 之间^[14],与实验结果相符。

2.6 水溶性葡聚糖流变特性分析

(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖、右旋糖苷和阿拉伯胶与市售的右旋糖苷相比, 5 g/dL 的(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖溶液粘度(18 mPa·s)要远远低于右旋糖苷的粘度,这对于相对分子质量在 10^7 数量级的葡聚糖来说并不常见。但是当溶液浓度增加到 10 g/dL 过程中, (1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖溶液的黏度随着浓度的增加呈指数型增长,并且形成了类似凝胶的形态。这可能是由于葡聚糖达到一定质量浓度后,大分子开始聚集,显著提高了溶液粘度。在测量范围内, (1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖溶液的黏度均大于商业化阿拉伯胶的粘度。

不同质量分数的葡聚糖溶液都呈现了一定的剪切变稀行为,其中质量分数较高的 9% 溶液中最明显。剪切稀化是剪切引起的分子形变伴随着流体力学相互作用的变化及其作用下大分子既旋转又形变的状态^[15]。在多糖溶液中,线性大分子之间相

互缠绕。当剪切力很小时,溶液中大分子的缠绕被破坏的速率与形成新缠绕的速率相等,宏观上看,溶液的表观粘度没有下降。随着剪切力的进一步增大,分子结构被拉直取向,缠结点进一步减少,流动阻力降低,缠绕被破坏的速率大于新形成缠绕的速率,表现为表观黏度随着剪切力的增大而下降^[16]。当剪切速率增大到一定值时,大分子间的缠绕被完全破坏,溶液的粘度不再下降。

(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖溶液(质量分数 9%)的储能模量(G')和损耗模量(G'')在测定频率范围内,质量分数 9%葡聚糖溶液的储能模量始终大于损耗模量。这表明在较高质量分数时,溶液能形成“弱凝胶”。此外,质量分数 9%葡聚糖溶液的动态模量对频率的依赖度较低,这表明葡聚糖大分子在高质量分数溶液中形成了复杂缠绕的结构,溶液的流动性受到了限制,这与粘度结果相一致。

3 结 语

利用发酵法合成的新型水溶性 (1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖杂质含量少,相对分子质量分布均一,可形成网状结构,增加持水力。水溶性(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖是一种纳米级多糖,水溶液中粒径分布在 40~160 nm 范围内,是一种潜在的天然纳米级材料。从热分析结果看,水溶性(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖热稳定性高,当温度高于 260 °C 才开始降解,在熔融过程中具有较高的活化能。从流变结果看,水溶性(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖在低质量分数时黏度较低,但黏度随着质量分数呈现指数增长,质量分数高于 10%的葡聚糖溶液很难制备。(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖溶液呈现剪切变稀特征,在测定范围内,质量分数 9%葡聚糖溶液的储能模量始终大于损耗模量,这表明当溶液质量分数达到一定值后,(1→3)(1→6)-α-D-葡聚糖能形成弱凝胶结构。

参考文献:

- [1] SUN Y, WANG S, LI T, et al. Purification, structure and immunobiological activity of a new water-soluble polysaccharide from the mycelium of *Polyporus albicans*(Imaz.) Teng[J]. **Bioresource Technology**, 2008(99): 900-904.
- [2] 李哲涛. 苦瓜多糖、南瓜多糖抗肿瘤与抗氧化活性的研究[D]. 西安:陕西师范大学, 2013.
- [3] KLOPFENSTEIN, CAROL F. The role of cereal beta-glucans in nutrition and health[J]. **Cereal Foods World**, 1988, 33(10).
- [4] 李蓉, 缪铭, 张涛, 等. 甜玉米胚乳中水溶性葡聚糖的结构与性质初探[J]. 食品工业科技, 2012, 33(23): 57-60.
LI Rong, MIAO Ming, ZHANG Tao, et al. Structure and properties of water-soluble glucan from maize endosperm [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 33(23): 57-60. (in Chinese)
- [5] 孟宪军, 孙希云, 朱金艳, 等. 蓝莓多糖的优化提取及抗氧化性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2010(1): 56-60.
MENG Xianjun, SUN Xiyun, ZHU Jinyan, et al. Extraction and antioxidant capability of blueberry polysaccharides [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010(1): 56-60. (in Chinese)
- [6] 陈义勇, 顾小红, 汤坚. 桦褐孔菌多糖的抗肿瘤活性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2011(1): 65-69.
CHENG Yiyong, GU Xiaohong, TANG Jian. Study on anti-tumor activities of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011(1): 65-69. (in Chinese)
- [7] MIAO M, BAI A, JIANG B, et al. Characterisation of a novel water-soluble polysaccharide from *Leuconostoc citreum* SK24. 002 [J]. **Food Hydrocolloids**, 2014, 36: 265-272.
- [8] 白爱娟, 缪铭, 张涛, 等. 明串珠菌 SK24.002 发酵制备水溶性多糖的初步研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 164-167.
BAI Aijuan, MIAO Ming, ZHANG Tao, et al. Study on the water-soluble polysaccharide prepared by *Leuconostoc sp.* SK24.002 fermentation[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2012, 34(3): 164-167. (in Chinese)
- [9] STAUB A. Removal of protein-Sevag method[J]. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, 1965, 5(2): 5-6.
- [10] SEYMOUR F R, KNAPP R D, BISHOP S H, et al. High-temperature enhancement of ¹³C-NMR chemical-shifts of unusual dextrans, and correlation with methylation structural analysis[J]. **Carbohydrate Research**, 1979, 68(1): 123-140.
- [11] MAJUMDER A, GOYAL A. Rheological and gelling properties of a novel glucan from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146 [J]. **Food Research International**, 2009(4): 525-528.
- [12] 倪德江, 陈玉琼, 谢笔钧, 等. 乌龙茶多糖 OPTS 2-1 的光谱特性、形貌特征及热特性研究[J]. 高等学校化学学报, 2004(12):

2263-2268.

NI Dejiang, CHEN Yuqiong, XIE Bijun, et al. Spectrum, Morphological and Thermal Characteristics of OTPS 2-1 in Polysaccharides from Oolong Tea[J]. **Chemical Research In Chinese Universities**, 2004(12):2263-2268. (in Chinese)

[13] ZAMORA F, GONZALEZ M, DUENAS M, et al. Thermodegradation and thermal transitions of an exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6[J]. **Journal of Macromolecular Science**, 2002, 41(3):473-486.

[14] PARIKH A, MADAMWAR D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria [J]. **Bioresource Technology**, 2006, 97(15):1822-1827.

[15] 张雅媛, 洪雁, 顾正彪, 等. 玉米淀粉与黄原胶复配体系流变和凝胶特性分析[J]. **农业工程学报**, 2011(9):357-362.

ZHANG Yayuan, HONG Yan, GU Zhengbia, et al. Rheological and gel properties of corn starch-xanthan mixed systems [J]. **Transactions of the CSAE**, 2011(9):357-362. (in Chinese)

[16] CHANG Y H, CUI S W. Steady and dynamic shear rheological properties of extrusion modified fenugreek gum solutions[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2011, 20:1663-1668.

科 技 信 息

国际食品法典委员会修改单贝大豆产品等标准并征求意见

10月18日消息,世界卫生组织(WHO)及粮农组织(FAO)第20次亚洲会议(CCASIA20)同意修订如下产品标准:

1. “单贝(Tempe)”(CODEX STAN 313R-2013)标准中所列水分、蛋白质含量、脂肪含量以及粗纤维含量分析方法被推荐标准方法中(CODEX STAND234-1999)相关分析方法取代。

2. 修订非发酵大豆制品产品区域标准(CODEX STAN322R-2015)中4.2.2部分有关食品添加剂的使用要求:增加抗氧化剂生育酚(INS:307a、b、c)的使用,最大使用限量200毫克/千克;取消风味促进剂氯化钾(INS:508)的使用,最大使用限量1000 mg/kg。

3. 修订辣酱产品区域标准(CODEX STAN 306R-2011)中第4.5部分食品添加剂使用要求:取消使用亚硫酸氢钙(INS:227)和亚硫酸氢钾(INS:228)。

评价截止日期2017年5月31日。

[信息来源]食品伙伴网. 国际食品法典委员会修改单贝大豆产品等标准并征求意见

[EB/OL]. (2016-10-19). <http://news.foodmate.net/2016/10/400292.html>