

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT CHẤT TĂNG TRƯỞNG THỰC VẬT OLIGO- β -GLUCAN BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ KẾT HỢP XỬ LÝ HYDROPEROXIT

LÊ QUANG LUÂN, NGUYỄN HUỲNH PHƯƠNG UYÊN

Trung tâm Hạt nhân Tp. Hồ Chí Minh

VÕ THỊ THU HÀ

Công ty Cổ phần Sài Gòn thủy canh

Cắt mạch β -glucan từ nấm men bia *Saccharomyces* bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 kết hợp xử lý hóa học là một phương pháp hữu hiệu nhằm tạo ra các sản phẩm tan trong nước có trọng lượng phân tử thấp. Ở liều xạ 250 kGy, việc xử lý kết hợp H_2O_2 ở các nồng độ 0,5; 1 và 2% đã có tác dụng làm gia tăng hàm lượng sản phẩm tan trong nước lên lần lượt là 1,2; 14,5 và 47,1%. Trọng lượng phân tử Mw của β -glucan chiếu xạ kết hợp xử lý với 2% H_2O_2 đã suy giảm từ 33,1 xuống còn 10,2 kDa khi gia tăng liều xạ từ 50 lên 250 kGy. Các chế phẩm β -glucan tan trong nước có Mw khoảng 10,2-33,1 kDa đã được sử dụng để khảo sát hiệu ứng tăng trưởng trên cây rau xà lách và kết quả nhận được cho thấy oligo- β -glucan có Mw ~ 18,9 kDa đã thể hiện hiệu ứng tăng trưởng tối ưu. So với đối chứng không xử lý, khi bổ sung 100 ppm chế phẩm oligo- β -glucan có Mw ~ 18,9 kDa sản xuất bằng phương pháp chiếu xạ 100 kGy hỗn hợp 15% β -glucan trong 2% H_2O_2 đã có tác dụng làm gia tăng sinh khối tươi, chiều cao cây, chiều dài rễ và hàm lượng chất khô của cây xà lách tương ứng là 36,2; 18,2; 41,7 và 6,2%. Chế phẩm oligo- β -glucan sản xuất được hứa hẹn là một sản phẩm có tiềm năng và triển vọng ứng dụng rất tốt trong sản xuất nông phẩm sạch chất lượng cao.

Từ khóa: cắt mạch, chiếu xạ, β -glucan, hydroperoxit, tăng trưởng thực vật.

Đặt vấn đề

β -glucan là một loại polysaccharide được ly trích từ nấm men đã được chứng minh là có tác dụng miễn dịch cho một số loài động vật như chuột (Lee, *et al.*, 2009), cá (Robertsen, *et al.*, 1990), lợn (Stokes, *et al.*, 1987), gà (Chae, *et al.*, 2006) và tôm (Suphantharika, *et al.*, 2003), làm gia tăng số lượng tế bào miễn dịch (Lee, *et al.*, 2001), hạn chế sự phát triển của khối u trên cơ thể người (Driscoll, *et al.*, 2009)... Đối với thực vật, β -glucan còn đóng vai trò kích thích sự tạo thành các chất chống oxy hóa và chế phẩm này cũng được hệ enzyme của thực vật phân giải thành những momilactone A và B vốn là những thành phần chính tạo ra các phytoalexins, khi đạt đến một nồng độ nhất định nó có khả năng chống lại những mầm bệnh từ nấm, vi sinh vật, virus và cả tuyến trùng (Darvill, 1992; Bohn, *et al.*, 1995).

Tuy nhiên, loại β -glucan này có khối lượng phân tử rất lớn cũng như rất khó hòa tan trong nước, gây trở ngại cho việc ứng dụng trong nông nghiệp, sinh học và y dược (Williams, *et al.*, 1991). Nhiều nghiên cứu cho thấy β -glucan có trọng lượng phân tử (Mw) trong khoảng từ 1-30 kDa và tan được trong nước đã có tác dụng tăng cường miễn dịch cao hơn so với các β -glucan có Mw cao (Lehmann and Kunze, 2000). Để sản xuất các sản phẩm β -glucan có thể tan được trong nước và có Mw thấp, người ta chủ yếu sử dụng các phương pháp sau đây: (1) Sử dụng enzyme cắt mạch, (2) Sử dụng các chất oxy hóa mạnh để thủy phân, (3) Biến tính cấu trúc nhằm tạo các gốc ưa nước (Wu, *et al.*, 2012; Qian, *et al.*, 2012). Tuy nhiên, các phương pháp này có một số hạn chế như thời gian phản ứng lâu, phải điều chỉnh nhiệt độ, điều kiện phản ứng, sử dụng chất xúc tác, phải tinh chế sản phẩm, sản phẩm bị biến đổi cấu trúc

STUDY ON PRODUCTION OF PLANT GROWTH PROMOTER OLIGO-β-GLUCAN BY IRRADIATION IN COMBINATION WITH HYDROGEN PEROXIDE TREATMENT

Summary

The degradation of β-glucan extracted from brewer yeast *Saccharomyces* by gamma Co-60 irradiation in combination with chemical treatment is an effective method for producing water-soluble and low molecular weight products. At the dose of 250 kGy, the combined treatment of 0.5, 1 and 2% H₂O₂ has increased the content of water-soluble products to 1.2, 14.5 and 47.1%, respectively. The molecular weight (Mw) of β-glucan and treated with 2% H₂O₂ has decreased from 33.1 to 10.2 kDa by the increasing of the irradiation dose from 50 to 250 kGy. The water-soluble β-glucan preparations with Mw in range of 10.2-33.1 kDa have been applied for investigating the growth promotion effect on lettuce; and the results have shown that, oligo-β-glucan with molecular weight of about 18.9 kDa prepared by irradiation of 15% β-glucan in the 2% H₂O₂ solution at 100 kGy has displayed an optimum promotion. In a comparison with the untreated control sample, the treatment by oligo-β-glucan with Mw ~ 18.9 kDa and at the concentration of 100 ppm has made an increase of fresh biomass, plant height, root length and dried matter content of lettuce about 36.2, 18.2, 41.7 and 6.2%, respectively. The preparation oligo-β-glucan may potentially be applied for production of clean and high quality agro-products.

Keywords: degradation, irradiation, β-glucan, H₂O₂, plant growth promotion.

và gây ô nhiễm môi trường. Cho đến nay, phương pháp cắt mạch bức xạ đã và đang được sử dụng đối với một số loại polysaccharide như alginate (Luan, *et al.*, 2012) và chitosan (Duy, *et al.*, 2011) đã thể hiện nhiều ưu điểm nổi bật như thời gian ngắn, quy trình đơn giản, sản phẩm không cần tinh chế (do không dùng chất xúc tác), độ chính xác cao và thân thiện với môi trường. Trong những năm gần đây, việc kết hợp đồng thời phương pháp chiếu xạ và xử lý hóa học (hiệu ứng đồng vận - synergic) đã được

chứng minh là phương pháp có tác dụng nâng cao hiệu suất cắt mạch trên alginate (Luan, *et al.*, 2012) và chitosan (Duy, *et al.*, 2011) một cách rất hiệu quả. Phương pháp này có thể làm giảm đáng kể liều chiếu xạ nhưng lại không làm thay đổi cấu trúc phân tử cũng như hoạt tính sinh học của sản phẩm. Công trình này tiến hành chiếu xạ β-glucan kết hợp xử lý đồng thời với H₂O₂ với mục đích gia tăng hiệu suất cắt mạch trong sản xuất chế phẩm tăng trưởng thực vật oligo-β-glucan nhằm giảm giá thành sản phẩm và nâng cao khả năng ứng dụng trong sản xuất rau quả và nông phẩm sạch.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Cận nấm men bia sử dụng để tách chiết β-glucan được cung cấp bởi Nhà máy bia Sài Gòn Bình Dương. Hạt giống xà lách (*Lactuca sativa*) dùng trong nghiên cứu do Công ty TNHH Trang Nông cung cấp. Dung dịch thủy canh do Công ty Cổ phần Sài Gòn thủy canh cung cấp. Nguồn Gamma Co-60 sử dụng thuộc Viện Nghiên cứu Hạt nhân Đà Lạt.

Chuẩn bị mẫu chiếu xạ

β-glucan được tách chiết theo quy trình của William, *et al.* (1991). Sản phẩm β-glucan thu được không tan trong nước, có hàm lượng β-glucan 92% được phân tích bằng bộ kit K-YBGL của Hãng Megazyme International Ireland Ltd. Bột β-glucan sau khi thu nhận được ngâm trương trong dung dịch H₂O₂ có nồng độ từ 0 đến 2%. Hàm lượng β-glucan trong hỗn hợp được điều chỉnh sao cho đạt nồng độ 15% (w/v). Các hỗn hợp nêu trên được cho vào chai thủy tinh và chiếu xạ ở liều xạ từ 50 đến 250 kGy với suất liều 3 Gy/s.

Xác định hàm lượng chất tan

Mẫu β-glucan sau khi chiếu xạ được tiến hành ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút trong thời gian 20 phút, sau đó thu phần dịch nổi. Cận β-glucan được tiếp tục rửa thêm 2 lần với nước khử ion và tiến hành ly tâm để thu dịch nổi. Tất cả phần dịch nổi sau đó được kết tủa trong cồn tuyệt đối (với tỷ lệ 1 thể tích dịch nổi/9 thể tích cồn), tiếp đó tiến hành ly tâm ở 6.500 vòng phút, thu kết tủa và sấy khô ở 100°C trong 2 giờ. Hàm lượng chất tan được tính như sau: $Độ\ tan\ (\%) = 100 \times (khối\ lượng\ khô\ của\ dịch\ nổi) / (khối\ lượng\ khô\ ban\ đầu)$.

Xác định Mw

β-glucan tan sau khi chiếu xạ được đo Mw theo phương pháp GPC sử dụng hệ GPC (Simadzu, Nhật Bản) với đầu đọc RID-10A và hệ bơm Waters 515. Cột Ultrahydrogel 250 và 500 được cung cấp bởi

Hãng Waters (Mỹ) được sử dụng ở nhiệt độ 40°C và dung môi sử dụng là nước cất được bơm với tốc độ 1,0 ml/phút. Nồng độ β-glucan tan nước sử dụng để đo là 0,1% (w/v) và chất chuẩn sử dụng là pullulan (Wako, Nhật Bản).

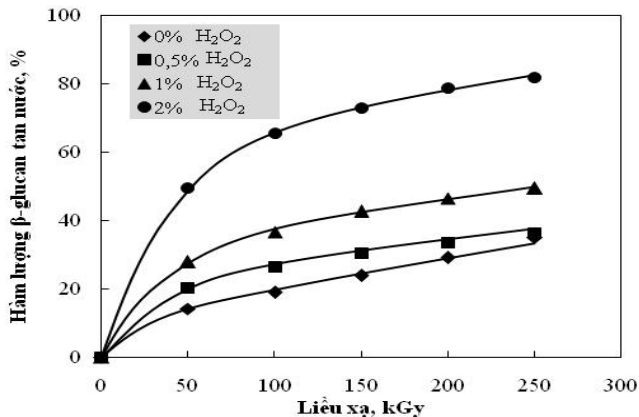
Xác định hiệu ứng tăng trưởng

Hiệu ứng của mẫu β-glucan sau khi cắt mạch ở liều xạ 50-250 kGy kết hợp xử lý đồng thời với 2% H₂O₂ được tiến hành bằng cách bổ sung 50 ppm β-glucan chiếu xạ vào dung dịch thủy canh. Sau đó oligo β-glucan có Mw tối ưu được lựa chọn để bổ sung vào môi trường thủy canh ở nồng độ 0-200 ppm. Các kết quả về chiều cao cây, chiều dài rễ, sinh khối tươi và khô của cây xà lách sau 21 và 28 ngày trồng trong nhà kính tại Công ty Cổ phần Sài Gòn thủy canh được thu hoạch và tiến hành xác định để đánh giá hiệu quả của chế phẩm. Số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm MSTATC. Tỷ lệ % về sự chênh lệch giữa các nghiệm thức xử lý β-glucan chiếu xạ được so với đối chứng (%SVĐC) như sau: %SVĐC = 100 x (giá trị của nghiệm thức xử lý)/(giá trị của nghiệm thức đối chứng).

Kết quả và thảo luận

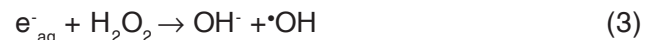
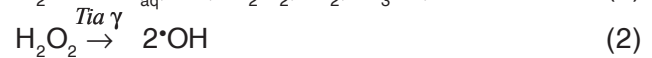
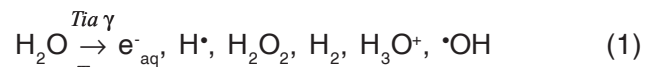
Hàm lượng β-glucan tan nước

β-glucan là polysaccharide được chiết xuất từ thành tế bào nấm men có đặc tính tương nhưng không hòa tan trong nước. Khả năng tan của β-glucan thường được nâng cao bằng các phương pháp như methyl hóa, phosphate hóa, hoặc cắt mạch tạo các phân tử có mạch ngắn hơn (Wu, *et al.*, 2012; Qian, *et al.*, 2012). Trong thí nghiệm này, khả năng tan trong nước của β-glucan được gia tăng bằng phương pháp cắt mạch sử dụng bức xạ gamma ở dải liều 50-250 kGy kết hợp xử lý đồng thời với H₂O₂ trong khoảng nồng độ 0.5-2%.



Hình 1: hàm lượng β-glucan tan nước sản xuất bằng phương pháp chiếu xạ kết hợp xử lý H₂O₂

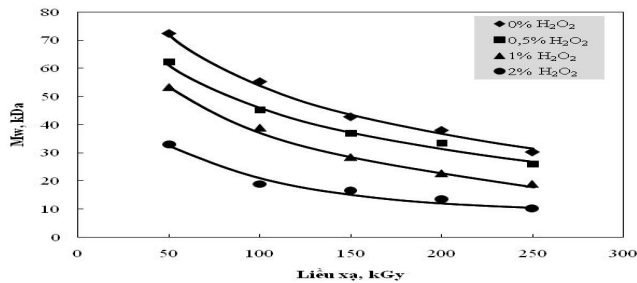
Kết quả nhận được ở hình 1 cho thấy khả năng tan trong nước của β-glucan tăng lên theo sự gia tăng của liều xạ và nồng độ H₂O₂. Hàm lượng chất tan thu được tăng nhanh tại liều xạ 50 kGy và sau đó tiếp tục tăng chậm dần ở các liều xạ cao hơn. Sự bổ sung H₂O₂ trong quá trình chiếu xạ đã có tác dụng làm gia tăng đáng kể hàm lượng chất tan. Cụ thể là trong dải liều từ 50 đến 250 kGy khi không bổ sung H₂O₂ thì hàm lượng chất tan thu được chỉ là 14-35%, trong khi đó nếu bổ sung H₂O₂ với nồng độ 0,5; 1; 2% thì hàm lượng β-glucan tan nước thu được lần lượt là 20-36, 28-49 và 49-82%. Điều này có thể là do sự hiện diện của H₂O₂ trong dung dịch chiếu xạ làm gia tăng hiệu quả cắt mạch bởi hiệu ứng đồng vận (synergic) theo các phương trình sau:



Các phản ứng (2), (3) và (4) đã làm gia tăng số lượng các gốc ·OH vốn là tác nhân tham gia cắt mạch β-glucan trong dung dịch (Duy, *et al.*, 2011).

Sự suy giảm Mw

Khả năng hòa tan của β-glucan trong nước phụ thuộc vào Mw, thông thường β-glucan sau khi cắt mạch có Mw thấp mới có khả năng hòa tan trong nước. Thí nghiệm này tiến hành nhằm xác định Mw của những chế phẩm β-glucan tan nước và kết quả nhận được biểu thị trên hình 2. Kết quả từ hình 2 cho thấy rằng, với liều xạ và nồng độ H₂O₂ càng cao thì Mw của β-glucan tan nước càng thấp. Đặc biệt là Mw giảm nhanh ở khoảng liều xạ 50-150 kGy và giảm chậm hơn ở các liều xạ tiếp theo. Điều thú vị ở đây là sự suy giảm Mw của β-glucan tan nước cũng tỷ lệ nghịch với sự gia tăng nồng độ H₂O₂. Kết quả này một lần nữa cho thấy hiệu quả của hiệu ứng đồng vận và kết quả này cũng giống như đối với alginate và chitosan (Luan, *et al.*, 2012; Duy, *et al.*, 2011). Có thể thấy Mw của β-glucan chiếu xạ 50-250 kGy trong nước giảm từ 72,5 đến 30,4 kDa, trong khi đó sự có mặt của H₂O₂ ở nồng độ 0,5; 1 và 2% đã làm cho Mw giảm tương ứng từ 62,4 đến 26,0; 53,3 đến 18,9 và 33,1 đến 10,2 kDa.



Hình 2: Mw của β -glucan chiếu xạ kết hợp xử lý với H_2O_2 ở các nồng độ khác nhau

Hiệu ứng tăng trưởng của β -glucan chiếu xạ

Ảnh hưởng của β -glucan chiếu xạ liều khác nhau lên sự sinh trưởng rau xà lách:

Nhiều oligosaccharide như oligochitosan, oligopectin và oligoalginate đã được chứng minh là có hiệu ứng tăng trưởng đối với thực vật (Luan, et al., 2005 & 2012; Luân và ctv, 2011). Trong thí nghiệm này, các mẫu β -glucan sau khi chiếu xạ với dải liều 50-250 kGy kết hợp xử lý với 2% H_2O_2 được sử dụng để đánh giá hiệu ứng tăng trưởng đối với cây rau xà lách và kết quả được thể hiện ở bảng 1 và hình 3.

Bảng 1: ảnh hưởng của β -glucan chiếu xạ ở các liều khác nhau đối với sự sinh trưởng của rau xà lách

Liều xạ (kGy)	Mw (kDa)	Chiều cao cây		Chiều dài rễ		Sinh khối tươi		Hàm lượng chất khô	
		cm	%SVĐC	cm	%SVĐC	g/cây	%SVĐC	%	%SVĐC
-	ĐC	21,0 ^c	100,0	15,2 ^a	100,0	41,54 ^d	100,0	4,81 ^b	100,0
0	-	22,7 ^{bc}	104,8	16,7 ^{ab}	109,9	46,03 ^{cd}	110,8	4,81 ^b	100,6
50	33,1	22,7 ^b	108,0	17,7 ^{cd}	116,5	49,22 ^{bc}	118,5	4,98 ^{ab}	106,0
100	18,9	24,8 ^a	118,2	21,5 ^a	141,7	56,58 ^a	136,2	5,11 ^a	106,0
150	16,6	23,5 ^{ab}	111,9	19,8 ^{bc}	130,7	51,04 ^b	122,9	5,10 ^a	106,2
200	13,5	23,2 ^b	110,3	18,8 ^{bc}	124,1	51,31 ^b	123,5	5,10 ^a	103,5
250	10,2	22,8 ^b	108,7	18,2 ^{bcd}	119,8	49,37 ^{bc}	118,8	4,84 ^b	100,0

ĐC: đối chứng không có bổ sung β -glucan, CV: hệ số biến thiên. Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có ký tự theo sau không giống nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$)



Hình 3: cây xà lách sau 28 ngày trồng trong dung dịch thủy canh (a); trong dung dịch thủy canh bổ sung 50 ppm β -glucan chiếu xạ liều 100 kGy (b) và trong dung dịch thủy canh bổ sung β -glucan không chiếu xạ (c)

Kết quả nhận được ở bảng 1 và hình 3 cho thấy, khi bổ sung β -glucan chiếu xạ liều 50-250 kGy ($M_w \sim 10,2-33,1$ kDa) đã có tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng của cây xà lách so với nghiệm thức đối chứng, trong khi ở nghiệm thức bổ sung β -glucan không chiếu xạ là hoàn toàn không khác biệt. Các chỉ tiêu khảo sát đều có xu hướng gia tăng khi bổ sung β -glucan chiếu xạ trong khoảng liều từ 100 ($M_w \sim 18,9$ kDa) đến 250 kGy ($M_w \sim 10,2$ kDa). Đặc biệt, hiệu ứng tăng trưởng đạt cao nhất có ý nghĩa thống kê ở nghiệm thức bổ sung β -glucan chiếu xạ liều 100 kGy ($M_w \sim 18,9$ kDa), cụ thể là chiều cao cây, chiều dài rễ, sinh khối tươi và hàm lượng chất khô của cây rau xà lách đã gia tăng tương ứng là 18,2; 41,7; 36,2 và 6,2% so với lô đối chứng không xử lý.

Từ kết quả nêu trên có thể kết luận, β -glucan xử lý với H_2O_2 ở nồng độ 2% và chiếu xạ ở liều 100 kGy ($M_w \sim 18,9$ kDa) đã tạo ra những oligo- β -glucan có khối lượng phân tử phù hợp cho mục đích thúc đẩy quá trình hấp thu và chuyển hóa chất dinh dưỡng trong cây, giúp cây tăng trưởng tốt. Do đó sản phẩm oligo- β -glucan có $M_w \sim 18,9$ kDa được chọn để tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của nồng độ lên sự sinh trưởng và phát triển của rau xà lách.

Ảnh hưởng nồng độ oligo- β -glucan lên sự sinh trưởng rau xà lách:

Bảng 2: hiệu ứng của oligo- β -glucan ($M_w \sim 18,9$ kDa) lên rau xà lách ở các nồng độ bổ sung khác nhau

Nồng độ (ppm)	Chiều cao cây		Chiều dài rễ		Sinh khối tươi		Hàm lượng chất khô	
	cm	%SVĐC	cm	%SVĐC	g/cây	%SVĐC	%	%SVĐC
0	17,83 ^d	100,0	13,57 ^a	100,0	27,82 ^c	100,0	5,23 ^d	100,0
25	18,73 ^{cd}	105,0	14,83 ^{cd}	109,3	31,27 ^{bc}	112,4	5,49 ^{cd}	105,0
50	19,70 ^{bc}	110,5	16,83 ^{bc}	124,0	38,90 ^{ab}	139,8	5,83 ^{bcd}	111,5
75	20,83 ^{ab}	116,8	18,40 ^{ab}	135,6	42,39 ^a	152,4	6,37 ^{ab}	121,8
100	22,17 ^a	124,3	20,60 ^a	151,8	45,44 ^a	163,3	6,69 ^a	127,9
150	20,50 ^{ab}	115,0	18,00 ^{ab}	132,6	37,98 ^{ab}	136,5	5,95 ^{abcd}	113,8
200	20,00 ^{bc}	112,2	17,33 ^{bc}	127,7	33,95 ^{bc}	122,0	6,03 ^{abc}	115,3

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có ký tự theo sau không giống nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,01$)

Kết quả theo dõi các chỉ tiêu của cây rau xà lách sau 21 ngày trồng bằng phương pháp thủy canh được ghi nhận ở bảng 2 và hình 4 cho thấy, khi bổ sung chế phẩm oligo- β -glucan có khối lượng phân tử tối ưu ($M_w \sim 18,9$ kDa) vào dung dịch dinh dưỡng thủy canh đã có tác dụng thúc đẩy quá trình tăng trưởng của cây. Ở liều bổ sung 25 ppm, sự tăng trưởng của rau xà lách hầu như không khác biệt so với lô đối chứng. Trong khi đó, các nghiệm thức bổ sung oligo- β -glucan từ 50 đến 100 ppm đã có



Hình 4: rau xà lách sau 21 ngày trồng trong dung dịch thủy canh không bổ sung oligo-β-glucan (a) và có bổ sung 100 ppm oligo-β-glucan có Mw ~ 18,9 kDa (b)

tác dụng gia tăng mạnh quá trình sinh trưởng và hiệu quả này giảm dần khi tăng nồng độ xử lý trong khoảng 150-200 ppm. Nghiệm thức bổ sung oligo-β-glucan với nồng độ 100 ppm đã thể hiện hiệu ứng tăng trưởng tốt nhất và đã làm gia tăng chiều cao cây, chiều dài rễ và sinh khối tươi lên tương ứng là 24,3; 51,8 và 63,3%. Điều thú vị ở đây là hàm lượng chất khô của cây rau xử lý 100 ppm oligo-β-glucan cũng đã tăng lên 27,9% so với cây rau không bổ sung oligo-β-glucan.

Như vậy có thể thấy rằng việc ứng dụng hiệu ứng đồng vận (chiếu xạ hết hợp xử lý H₂O₂) là rất hiệu quả trong cắt mạch β-glucan để sản xuất oligo-β-glucan. Chế phẩm sản xuất được ở liều 100 kGy có Mw ~ 18,9 kDa với nồng độ bổ sung là 100 ppm đã có hiệu ứng tăng trưởng mạnh đối với sự phát triển chiều cao cây, chiều dài rễ và sinh khối tươi của cây rau xà lách.

Kết luận

Phương pháp cắt mạch β-glucan bằng bức xạ gamma Co-60 kết hợp xử lý H₂O₂ đã làm gia tăng đáng kể hiệu suất cắt mạch β-glucan tạo ra oligo-β-glucan tan được trong nước. Chế phẩm oligo-β-glucan tan trong nước được sản xuất từ hỗn hợp 15% β-glucan trong dung dịch 2% H₂O₂ ở liều xạ 100 kGy có Mw ~ 18,9 kDa thể hiện hiệu ứng tăng trưởng tối ưu trên cây rau xà lách. Tại nồng độ bổ sung là 100 ppm đã có sự gia tăng chiều cao cây, chiều dài rễ, sinh khối tươi và khô của cây xà lách lên tương ứng là 24,3; 51,8; 63,3 và 27,9%. Chế phẩm oligo-β-glucan sản xuất được là sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên, an toàn và hiệu quả cao, đồng

thời hứa hẹn là một sản phẩm có tiềm năng và triển vọng ứng dụng rộng rãi trong sản xuất nông phẩm sạch chất lượng cao ■

Tài liệu tham khảo

1. Bohn J.A., BeMiller J.N., 1995. (1→3)-β-d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.*, 28: 3-14.
2. Chae B.J., Lohakare J.D., Moon W.K., Lee S.L., Park Y.H., Hahn T.W., 2006. Effects of supplementation of β-glucan on the growth performance and immunity in broilers. *Res. Vet. Sci.* 80: 291-298.
3. Darvill A.G., 1992. Oligosaccharins-Oligosaccharides that regulate growth, development and defence responses in plants. *Glycobiol.*, 2: 181-198.
4. Driscoll M., Hansen R., Ding C., Cramer D.E., Yan J., 2009. Therapeutic potential of various β-glucan sources in conjunction with anti-tumor monoclonal antibody in cancer therapy. *Cancer Biol. Therapy*, 8: 218-225.
5. Duy N.N., Phu D.V., Anh N.T., Hien N.Q., 2011. Synergistic degradation to prepare oligochitosan by γ-irradiation of chitosan solution in the presence of hydrogen peroxide. *Radiat. Phys. Chem.*, 80: 848-853.
6. Grandpierre C., Janssen H.G., Laroche C., Michaud P., Warrand J., 2008. Enzymatic and chemical degradation of curdlan targeting the production of β-(1→3) oligoglucans. *Carbohydr. Polym.*, 71: 277-286.
7. Lee J.N., Lee D.Y., Ji I.H., Kim G.E., Kim H.N., Sohn J., Kim S., Kim C.W., 2001. Purification of soluble β-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65: 837-841.
8. Lee D.Y., Ji I.H., Chang H.I., Kim C.W., 2002. High-level TNF-α Secretion and Macrophage Activity with Soluble β-glucans from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 233-238.
9. Lehmann J., Kunze R., 2000. Water-soluble low molecular weight β-glucans for modulating immunological responses in mammalian system. *United States Patent.*, 2000.
10. Luan L.Q., Ha V.T.T., Uyen N.H.P., Trang T.T.L., Hien Q.N., 2012. Preparation of oligoalginate plant growth promoter by γ irradiation of alginate solution containing hydrogen peroxide. *J. Agric. Food chem.*, 60: 1737-1741.
11. Qian Z., Wu S., Pan S., Xia Z., 2012. Preparation of (1→3)-β-d-glucan oligosaccharides by hydrolysis of curdlan with commercial α-amylase. *Carbohydr. Polym.*, 87: 2362-2364.
12. Robertsen B., Rorstad G., Engstad R., Raa J., 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Disease.*, 13: 391-400.
13. Stokes C.R., Miller B.G., Bailey M., Wilson A.D., Bourne F.J., 1987. The immune response to dietary antigens and its influence on disease susceptibility in farm animals. *Veter. Immun. Immunopathol.*, 17: 413.
14. Suphantharika M., Khunrae P., Thanardkit P., Verduyn C., 2003. Preparation of spent brewer's yeast β-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Biores. Technol.*, 88 (1): 55-60.
15. Wu S., Cai R., Sun Y., 2012. Degradation of curdlan using hydrogen peroxide. *Food Chem.*, 135: 2436-2438.
16. Williams D.L., McNamee R.B., Jones E.L., Pretus H.A., Enslay H.E., Browder I.W., Luzio N.R.D., 1991. A method for the solubilization of a (1→3)-β-d-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr. Res.*, 219: 203-213.