

小分子 *Rhizobium* sp. N613 胞外多糖的 制备及其抗肿瘤活性

魏国琴 吕利华 陈艳丽 赵良启*

(山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室 山西 太原 030006)

摘要: 采用微波辐照氧化技术, 降解大分子 *Rhizobium* sp. N613 胞外多糖(REPS)为小分子多糖(LREPS), 以改善其理化及抗肿瘤活性, 提高应用价值和拓展应用范围。通过正交试验考察了底物浓度、 H_2O_2 浓度、微波辐照强度和辐照时间对降解产物分子量的影响并获得一系列 LREPS 产物。选取 4 组分子量段(10 以下、10、20 和 30 kD 左右)的 LREPS 代表性样品进行小鼠体内 S180 抑瘤效果检测, 其中分子量段为 10.352 kD 的 LREPS 效果最佳, 抑瘤率高达 52.8%, 确定为 LREPS 的最适分子量段。其制备工艺条件为: REPS 浓度为 2 g/L、 H_2O_2 浓度为 6%、微波辐照强度为 375 W、微波辐照时间为 2 min; 理化分析结果表明, LREPS 的红外图谱与 REPS 相似, 仍为 β -D-吡喃葡聚糖。其溶解度由原多糖的 8.00 g/L 增至 15.73 g/L, 特性粘度由原多糖的 527.64 mL/g 降至 351.67 mL/g。建立了 LREPS 制备工艺并获取了相关理化及抗肿瘤技术参数, 为该多糖制剂的生产应用奠定一定基础。

关键词: *Rhizobium* sp. N613 胞外多糖, 降解, 分子量, 抗肿瘤活性

Preparation and anti-tumor activity of low molecular weight exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613

WEI Guo-Qin LV Li-Hua CHEN Yan-Li ZHAO Liang-Qi*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering, Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China)

Abstract: Exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613 (REPS) was degraded by microwave irradiation with H_2O_2 to improve its physical, chemical and anti-tumor activity. Effects of REPS's concentration, H_2O_2 's concentration, intensity and time of microwave irradiation on the molecular weight of degraded products were investigated by orthogonal test. Then the antitumor activities of four different molecular weight of LREPS were evaluated in mice bearing sarcoma 180. The results indicated that inhibition rate

reached 52.8% when the molecular weight of LREPS reduced to 10.352 kD. LREPS(10.352 kD)'s preparation conditions were as follows: REPS's concentration was 2 g/L, H₂O₂'s concentration was 6%, radiation intensity was 375 W, and irradiation time was 2 min. The molecular structure of the LREPS was analyzed by IR. The result indicated that LREPS was a β -glucan. The solubility of LREPS was increased from 8 g/L to 15.73 g/L, and the intrinsic viscosity of LREPS was reduced from 527.64 mL/g to 351.67 mL/g. The technology of preparing LREPS was established. Moreover, relevant technical parameters were obtained. Results of these study lay a certain foundation for the production and application of the polysaccharide.

Keywords: Exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613, Degradation, Molecular weight, Antitumor activity

生物多糖是生物体的重要组分, 不仅参与结构组成和能量转运, 而且参与信号识别、发育分化、免疫调节等一系列生理过程, 是生命活动不可缺少的一类生物高分子物质。如今多糖生物学的研究不断深入, 已成为继核酸、蛋白质生物学研究之后的又一大学科分支, 必将对揭示生命奥秘做出重要贡献^[1]。生物多糖的应用研究已取得较大进展, 越来越多的多糖从动物、植物和微生物中被开发出来。研究表明, 一些多糖具有抗肿瘤、抗氧化、抗辐射、抗衰老和提高免疫力等功能, 可用于生物医药; 而另一些多糖具有增稠、润滑、附着、吸水等理化特性, 可用于食品、化工、环保等领域^[2]。来自自然界的生物活性多糖作为生物医药, 尽管已显示出确切功效和应用价值, 但是由于生物活性多糖具有分子量和水溶性差的特性, 影响了某些药物制剂(如针剂)的制备, 限制了活性多糖的应用技术范围。因此, 建立大分子多糖降解技术, 研发小分子活性多糖产品, 对于促进多糖药品的临床应用具有重要意义^[3]。

我们实验室已开发出一种抗肿瘤活性多糖——*Rhizobium* sp. N613 根瘤菌胞外多糖(REPS), 该多糖不仅具有发酵周期短, 产量高, 成本低^[3]等优良的生产性状, 而且具有良好的免疫和抗肿瘤活性^[4-5], 有着诱人的应用前景。然而, 与其它天然多糖一样, REPS 也存在分子量大和溶解度低, 难以满足针剂制备要求的问题。为了解决这一问题, 本文采用微波辐照氧化技术降解大分子 REPS 多糖, 通过正交试验找出降解条件与小分子 REPS (LREPS) 分子量的对应关系。选用不同分子量段具有代表性

的 LREPS 进行抗肿瘤活性测定, 根据抗肿瘤活性确定 LREPS 制备的最佳工艺条件。与此同时, 还将测试最佳分子量 LREPS 的溶解度、特性黏度等技术参数, 为 LREPS 的开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

REPS, 由本实验室发酵纯化制得, 纯度达 99% 以上, 分子量为 39.702 kD。过氧化氢、无水乙醇、硫酸、苯酚(Solarbio)、葡聚糖凝胶材料 Sephadex G-100 (Solarbio)、T 系列葡聚糖标准品(Solarbio)、蓝色葡聚糖(Solarbio)、溴化钾。以上试剂均为分析纯, 除明确标出生产厂家外, 其它均购自天津化学试剂三厂。

1.2 主要仪器

PJ17F-B 型微波炉(中国美的微波炉制造有限公司), CR22G 高速冷冻离心机(日本日立公司), Heto-PL3000-冷冻干燥机(捷克热力电器公司), U-2010 紫外分光光度计(日本日立公司), 傅立叶变换红外光谱仪(美国 Mattson 公司)。

1.3 试验动物与肿瘤细胞株

健康昆明种小鼠, 3-4 周龄, 购于山西省肿瘤医院实验动物中心。小鼠肉瘤 S180 细胞株, 购于山西省肿瘤医院实验动物中心。

1.4 试验方法

1.4.1 LREPS 制备及工艺条件优化: (1) 不同分子量段 LREPS 的制备: 采用微波辐照氧化技术降解 REPS^[4-5], 称取 REPS 分别溶解于 H₂O₂ 溶液中, 置

于微波炉中进行辐照氧化降解。待反应结束后, 迅速冷却, 加入 3 倍体积乙醇沉淀, 离心弃上清, 冷冻干燥法获得一系列 LREPS 产物。选取 REPS 用量、过氧化氢浓度、微波辐照强度和辐照时间为因素, 采用 $L_{18}(3^7)$ 表进行正交试验, 因素水平表头设计见表 1。

表 1 微波辐照氧化降解 REPS 因素水平表
Table 1 List of factors's levels

水平 Levels	因素 Factors			
	REPS 用量 REPS's con- centration (g/L)	H ₂ O ₂ 浓度 H ₂ O ₂ 's con- centration (%)	辐照强度 Radiation intensity (W)	辐照时间 Irradiation time (min)
1	2	2	225	1
2	3	4	375	2
3	4	6	525	3

(2) LREPS 分子量的测定: 葡聚糖凝胶过滤法^[6-7]测定 LREPS 分子量范围。以蓝色葡聚糖上样到已平衡好的 Sephadex G-100 柱, 用 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液洗脱测定外水体积 V_0 。同条件上样葡聚糖标准品 T-5、T-10、T-40、T-70, 苯酚-硫酸法跟踪检测, 得标品洗脱体积 V_c 。以 V_c/V_0 对 $\lg M_w$ 绘制分子量测定标准曲线。同条件上样 LREPS 样品, 根据分子量测定标准曲线计算各样品的分子量范围。

(3) 不同分子量段 LREPS 的抗肿瘤及免疫活性测定^[8-9]: 供试昆明种小鼠随机分组, 雌雄各半, 每组 10 只。抽取接种 1 w 左右肉瘤 S180 的肿瘤鼠的腹水, 以生理盐水配制成 10^6 个/mL 的肿瘤细胞悬液, 在每只小鼠左腋皮下接种 0.25 mL, 建立荷瘤小鼠模型。

接种 24 h 后, 每日 1 次腹腔注射 0.25 mL 试样溶液, 不同分子量的 LREPS 剂量为 5 $\mu\text{g/g}$ 体重, 阳性对照组环磷酰胺(Cy)的剂量为 20 $\mu\text{g/g}$ 体重, 阴性对照组注射生理盐水, 连续给药 10 d, 每日定时称重小鼠体重并记录。

连续给药 10 d 停药, 次日称量小鼠体重, 断颈处死, 摘取小鼠脾脏及胸腺, 剥取小鼠左腋下瘤块, 分别称量脾脏、胸腺和瘤块重量并计算平均值。

(4) 最适分子量段 LREPS 的制备工艺条件确定:

根据不同分子量段 LREPS 的抑瘤率及脏器指数, 确定 LREPS 的最适分子量段及其制备工艺条件。

1.4.2 最适分子量段 LREPS 溶解度、特性粘数及分子结构测定: (1) LREPS (10.352 kD) 与 REPS 的结构比较^[10]: 采用溴化钾压片法, 分别称取 5 mg REPS 和 LREPS, 与 400 mg KBr 粉末混合研磨、压片, 采用红外光谱仪扫描分析, 扫描范围为 4 000-400 cm^{-1} 。

(2) LREPS (10.352 kD) 溶解度的测定^[11]: 准确称取 LREPS 样品 3 g, 用去离子水 100 mL 配制溶液; 高速搅拌 20 min, 恒温 25 $^{\circ}\text{C}$, 溶解 1 h 后于 4 000 r/min 下离心 20 min, 将上层清液倒入已称重的蒸发盘中, 90 $^{\circ}\text{C}$ 下将水分蒸发干, 120 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒重。溶解度计算公式如下: 溶解度=上清液中固体质量 $\times 10$ (g/L)。

(3) LREPS (10.352 kD) 特性粘数测定^[11]: 准确称取 50 mg 经冷冻干燥的 REPS 和 LREPS, 充分溶解后用蒸馏水定容至 25 mL, 用玻璃砂芯漏斗过滤后, 用硫酸-苯酚法精确测定其浓度。取 10 mL LREPS 及 LREPS 水溶液加入乌氏粘度计, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水槽中测定多糖溶液的流出时间, 采用逐步稀释法求出样品的特性粘数。

1.4.3 最适分子量段 LREPS 的使用剂量与抗肿瘤疗效相关性试验: 采用体内试验方式, 具体方法同上。LREPS 试验组的日使用剂量分别为 5、10、20、40 $\mu\text{g/g}$ 体重。根据抑瘤率及脏器指数确定 LREPS 的用药剂量及其范围。

2 结果与分析

2.1 LREPS 制备及工艺条件优化

2.1.1 不同分子量的 LREPS 的制备: 微波辐照氧化降解 REPS 的正交试验结果及方差分析分别见表 2 和表 3。可以看出, 影响 REPS 降解的因素顺序是 H₂O₂ 浓度>辐照强度>REPS 用量>辐照时间。显然, 通过调节氧化剂 H₂O₂ 浓度和微波辐照强度能够有效降低 LREPS 的分子量。

2.1.2 LREPS 分子量的测定: Sephadex G-100 凝胶过滤法测定多糖分子量的标准曲线见图 1。其回归方程为 $y = -0.0199x + 5.5904$, 相关系数 $R^2 = 0.9902$ 。

表 2 微波辐照氧化降解 REPS 正交实验结果
Table 2 Results of orthogonal test of microwave irradiation-oxidative degradation of REPS

因素 Factors	LREPS 浓度 Concentrations of REPS (g/L)	H ₂ O ₂ 浓度 Concentrations of H ₂ O ₂ (%)	辐照强度 Intensity (W)	辐照时间 Time (min)	LREPS 分子量段 Molecular weight (kD)
Test 1	2	2	225	1	32.859
Test 2	2	4	375	2	26.347
Test 3	2	6	525	3	7.216
Test 4	3	2	225	2	33.540
Test 5	3	4	375	3	20.920
Test 6	3	6	525	1	12.370
Test 7	4	2	375	1	28.652
Test 8	4	4	525	2	24.520
Test 9	4	6	225	3	16.987
Test 10	2	2	525	3	32.521
Test 11	2	4	225	1	30.641
Test 12	2	6	375	2	10.352
Test 13	3	2	375	3	28.675
Test 14	3	4	525	1	27.954
Test 15	3	6	225	2	14.358
Test 16	4	2	525	2	32.580
Test 17	4	4	225	3	31.615
Test 18	4	6	375	1	13.876

表 3 微波辐照氧化降解 REPS 正交方差分析表
Table 3 Analysis of variance for microwave irradiation-oxidative degradation of REPS

因素 Factors	偏差平方和 Squared deviations	自由度 Degrees of freedom	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significant
REPS 用量 REPS's concentration	10 095 064.778	2	0.824	5.140	
H ₂ O ₂ 浓度 H ₂ O ₂ 's concentration	1 176 727 853.778	2	95.997	5.140	**
辐照强度 Radiation intensity	86 845 918.111	2	7.085	5.140	*
辐照时间 Irradiation time	5 927 328.778	2	0.484	5.140	
误差 Error	36 773 993.33	6			

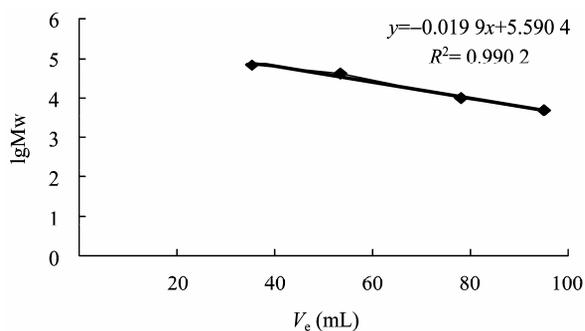


图 1 多糖分子量测定的标准曲线

Fig. 1 Calibration curve of standard dextrans for determining molecular weight of LREPS

LREPS 分子量测定结果见表 2, 可将 18 种 LREPS 分为 4 个分子量段, 即 10 以下、10、20、30 kD 左右, 取各分子量段的代表性样品进行抗肿瘤及免疫活性测定。

2.1.3 不同分子量段 LREPS 对 S180 荷瘤小鼠的瘤体生长及脏器指数的影响: 以 REPS 和不同分子量段 LREPS (7.216、10.352、20.920、30.641 kD) 进行 S180 荷瘤小鼠的体内抗肿瘤和免疫活性试验, 结果见表 4。

表4 不同分子量 LREPS 对 S180 荷瘤小鼠瘤重及脏器指数的影响

Table 4 Antitumor activities, thymus index and spleen index of different molecular weight of LREPS against S180

分组 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g/g}$)	体重增加值 Gain of body weight (g)	胸腺指数 Thymus index (mg/g)	脾指数 Spleen index (mg/g)	瘤重 Tumor weight (g)	抑瘤率 Inhibition rate (%)
阴性对照 Negative control		6.89 \pm 0.80	1.34 \pm 0.16	6.72 \pm 0.31	1.27 \pm 0.06	0
阳性对照(Cy)	20	5.02 \pm 0.46**	0.60 \pm 0.07**	4.25 \pm 0.27**	0.46 \pm 0.02**	63.8
REPS (39.702 kD)	5	7.00 \pm 0.87	1.81 \pm 0.12*	7.79 \pm 0.32*	0.70 \pm 0.18*	44.3
LREPS (30.641 kD)	5	7.08 \pm 1.11	1.80 \pm 0.06*	7.82 \pm 0.22*	0.67 \pm 0.03*	47.2
LREPS (20.920 kD)	5	6.96 \pm 0.80	1.89 \pm 0.08*	7.96 \pm 0.18**	0.64 \pm 0.23*	49.7
LREPS (10.352 kD)	5	7.00 \pm 0.90	2.01 \pm 0.09*	8.05 \pm 0.12**	0.60 \pm 0.02**	52.8
LREPS (7.216 kD)	5	6.92 \pm 0.84	1.74 \pm 0.26*	7.78 \pm 0.09*	0.72 \pm 0.06*	43.4

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; Compared with model control.

从表4的抑瘤率可以看出,与阴性对照组相比,阳性对照组(即环磷酰胺组)、REPS组及各个分子量段的LREPS组均对小鼠肉瘤S180有不同程度的抑制作用。还可以看出LREPS组的抑瘤率高于REPS,其中分子量段为10.352 kD的LREPS的抑瘤率最高,达到52.8%。从表3的胸腺和脾脏指数可以看出,多糖处理组可显著增加小鼠胸腺、脾脏的重量,提高小鼠的免疫功能,而阳性对照组降低了小鼠的胸腺与脾脏指数,有着明显的毒副作用。综合考察不同分子量段的LREPS对小鼠S180抑瘤率及脏器指数的影响,分子量段为10.352 kD的LREPS疗效最好,确定为最适分子量段的LREPS。

2.1.4 确定最适分子量段 LREPS 的制备工艺条件: 根据正交试验结果, LREPS 各分子量段样品的制备条件见表2, 其中抗肿瘤和免疫活性最高的10.352 kD分子量段的LREPS制备工艺条件为: REPS浓度为2 g/L、 H_2O_2 浓度为6%、微波辐照强度为375 W、微波辐照时间为2 min。

2.2 最适分子量段 LREPS 的溶解度、特性粘数及分子结构

2.2.1 最适分子量段 LREPS 的溶解度与特性粘数: 测定 REPS 和 LREPS 的溶解度及特性粘数, 结果见表5。

从表5可以看出, LREPS 的溶解度较原多糖 REPS 增加了近1倍, 其特性粘数仅为原多糖 REPS 的2/3左右。由此可见, LREPS 较 REPS 的溶解特

表5 REPS 和 LREPS 的溶解度与特性粘数

Table 5 REPS and LREPS's solubility and intrinsic viscosity

分组 Group	分子量 Molecular weight (kD)	溶解度 Solubility (g/L)	特性粘数 Intrinsic viscosity (mL/g)
REPS	39.702	8	531.43
LREPS	10.352	15.73	351.67

性有了极大改善, 更加有利于该多糖针剂的制备与应用。

2.2.2 最适分子量段 LREPS 的分子结构: 对 LREPS 与 REPS 的结构进行红外分析, 结果见图2。

对比 LREPS 与 REPS 的红外图谱, 其指纹区结构基本没变, 仍为 β -D-葡萄糖吡喃糖。然而, LREPS 各基团的吸收峰均比 REPS 弱, 说明降解后的 LREPS 中各基团的含量都要比 REPS 少; 但醇羟

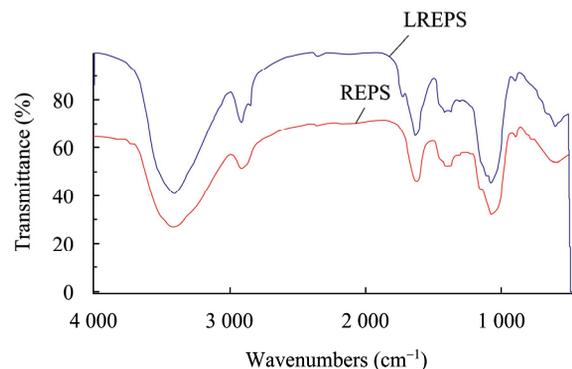


图2 LREPS 与 REPS 红外图谱比较

Fig. 2 Comparison of infrared spectra with LREPS and REPS

基相对含量增大, $2\ 855\ \text{cm}^{-1}$ 出现 $-\text{CH}_2-$ 伸缩振动, $1\ 730\ \text{cm}^{-1}$ 处出现羧基, 在 $1\ 300-1\ 050\ \text{cm}^{-1}$ 为强吸收并呈现出 2 条谱带, 说明出现酯基。这些结果说明 REPS 分子的支链被降解。

2.3 最适分子量段 LREPS 的使用剂量与抗肿瘤疗效相关性试验

以不同剂量的 LREPS (10.352 kD) 进行 S180 荷

瘤小鼠的体内抗肿瘤和免疫活性试验, 结果见表 6。

从表 6 中可以看出, 各剂量组 LREPS 对小鼠 S180 肉瘤均有一定的抑制作用, 尤其是 $10\ \mu\text{g/g}$ 组的抑瘤率达到了 55.6%。与对照组相比, 差异显著。LREPS 各剂量组均能显著增加小鼠胸腺、脾脏的重量, 且组别之间无明显差异。从而确定 LREPS 最佳剂量为 $10\ \mu\text{g/g}$ 。

表 6 不同剂量 LREPS (10.352 kD) 对 S180 荷瘤小鼠瘤重及脏器指数的影响
Table 6 Antitumor activities, thymus index and spleen index of different doses of LREPS against S180

分组 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g/g}$)	体重增加值 Gain of body weight (g)	胸腺指数 Thymus index (mg/g)	脾指数 Spleen index (mg/g)	瘤重 Tumor weight (g)	抑瘤率 Inhibition rate (%)
阴性对照组 Negative control		7.97 ± 0.89	1.56 ± 0.17	6.80 ± 0.32	1.32 ± 0.03	0
阳性对照(Cy) Positive control	20	$6.20\pm 0.31^{**}$	$0.98\pm 0.04^*$	$4.76\pm 0.19^*$	$0.45\pm 0.06^{**}$	66.4
LREPS (10.352 kD)	5	7.97 ± 0.81	$1.98\pm 0.08^*$	$8.03\pm 0.12^*$	$0.63\pm 0.02^{**}$	52.3
	10	7.93 ± 0.92	$2.01\pm 0.18^*$	$8.09\pm 0.11^*$	$0.60\pm 0.13^{**}$	55.6
	20	8.00 ± 1.02	$1.95\pm 0.12^*$	$7.96\pm 0.09^*$	$0.62\pm 0.07^{**}$	53.0
	40	8.01 ± 0.96	1.72 ± 0.09	$8.01\pm 0.13^*$	$0.67\pm 0.14^*$	49.3

Note: *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; Compared with model control.

3 讨论

本文应用正交试验方法优化了微波辐照氧化条件, 成功降解了大分子 *Rhizobium* sp. N613 胞外多糖(REPS)并制备出了一系列小分子 REPS (LREPS), 根据抗肿瘤活性确定了 LREPS 的最适分子量段及其工艺技术参数。理化特性检测, LREPS 的分子结构与 REPS 基本相似, 但其溶解度和特性粘数较 REPS 大有改善。这一结果证明微波辐照氧化技术适用于小分子活性多糖的加工制备。

在选择与优化微波辐照氧化降解 REPS 研究中, 我们先后以分子量和抗肿瘤活性为筛选 LREPS 的技术指标。在进行微波辐照氧化反应条件正交试验时, 以分子量为指标, 获得一系列不同分子量段、不同溶解特性的 LREPS 产物及其制备条件。多糖的生物活性主要取决于分子结构, 尤其是活性基因的空间构型。倘若不当降解或过度降解破坏了多糖活性基因的空间构型就会使之降低或失去生物活性^[12-13]。因此, 必需再以抗肿瘤活性为技术指标进行复筛, 选出抗肿瘤活性高、分子量适当小、溶解

特性比较好的 LREPS, 以此作为 LREPS 候选产物工艺条件。依照上述原则和试验结果, 我们确定 10 kD 为 LREPS 的最适分子量段, 其微波辐照氧化条件为最佳技术参数。

从 LREPS 分子结构图谱分析和生物活性检测结果可以看出, 微波辐照氧化降解多糖条件较为温和, 仅改变分子大小, 而不改变其结构, 因而对多糖活性并无不良影响。这可能与选择的氧化剂种类及浓度有关, 更与微波辐照技术的特点有关。在微波辐照氧化降解 REPS 的研究中, 我们选择过氧化氢作为氧化剂。所以选择过氧化氢, 首先是因为它的氧化能力适中, 只要浓度适当不会发生剧烈氧化反应而彻底破坏多糖结构; 其次是因为它是绿色氧化剂, 反应之后没有其它副产物生成, 不会影响 LREPS 的质量和用途^[14]。微波辐照技术是使反应分子在微波场中随电场方向改变发生旋转、振动, 分子运动加剧增加了反应分子间的碰撞次数, 致使反应迅速完成。微波功率越大, 反应时间越短, 而反应时间越短, 对大分子的破坏性越小^[15]。这一技术特点更适用于由大分子活性多糖制备小分子活性多

糖的工艺流程。仔细分析 LREPS 制备的技术参数, 这一小分子活性多糖加工工艺显示出经济、高效、快速的技术优势。

综上所述, 无论 LREPS 多糖新产品, 还是该多糖生产新工艺, 均有着良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Leung MYK, Liu C, Koon JCM, et al. Polysaccharide biological response modifiers[J]. Immunology Letters, 2006, 105(2): 101-114.
- [2] Wang CY, Guan HS. Advances of researches on antiviral activities of polysaccharide I. Antiviral activities of polysaccharides[J]. Advance Bioengineer, 2000, 20(1): 17-21.
- [3] 李玉华, 王凤山, 贺艳丽. 多糖化学修饰方法研究概况[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(1): 62-65.
- [4] 周学英, 陈亮, 陈东辉. 微波辐射法氧化制备低分子量壳聚糖的实验研究[J]. 中国生物医学工程学报, 2006, 25(4): 488-491.
- [5] Li J, Du YM, Liang HB. Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme[J]. Polymer Degradation and Stability, 2007, 92(3): 515-524.
- [6] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 第2版. 浙江: 浙江大学出版社, 2003: 11.
- [7] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 第2版. 武汉: 武汉大学出版社, 1994: 113-145.
- [8] 黄晓波, 张建国, 韩勇, 等. 一种根瘤菌胞外多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 免疫学杂志, 2006, (S1): 149-150, 154.
- [9] 韩勇, 黄晓波, 董岳峰, 等. 根瘤菌 N613 胞外多糖发酵条件及抗肿瘤作用研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 909-913.
- [10] Zhao LQ, Chen YL, Ren S, et al. Studies on the chemical structure and antitumor activity of an exopolysaccharide from *Rhizobium* sp. N613[J]. Carbohydrate research, 2010, 345(5): 637-643.
- [11] 任盛, 程红兵, 陈艳丽, 等. *Rhizobium* sp. N613 胞外多糖流变性及毒性研究[J]. 食品工业科技, 2009, (5): 116-119, 123.
- [12] 高小荣, 刘培勋. 多糖构效关系研究进展[J]. 中草药, 2004, 35(2): 229-231.
- [13] 聂凌鸿, 宁正祥. 活性多糖的构效关系[J]. 林产化学与工业, 2003, 23(4): 89-93.
- [14] 楼陈钰, 刘羿君, 封云芳, 等. 过氧化氢制备壳低聚糖及分子量和其分布的研究[N]. 浙江理工大学学报, 2006, 23(1): 5-7.
- [15] Choi JA, Kim JK, Kim JH, et al. Degradation of hyaluronic acid powder by electron beam irradiation, gamma ray irradiation, microwave irradiation and thermal treatment: a comparative study[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(4): 1080-1085.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前3个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用3个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。