

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.07.020

# 化学酶法对硫酸软骨素类多糖的定量分析

陈婷婷, 李文静, 杨桂霞, 周贤轩, 石春红

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘要:**硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)类多糖是一类具有多种临床治疗作用的糖胺聚糖。在硫酸软骨素裂解酶作用下,软骨素中葡糖醛酸和 N-乙酰半乳糖胺之间的糖苷键发生断裂,可生成不饱和二糖。微生物发酵生产软骨素过程中,多糖定量往往需经过多次纯化以及使用昂贵的仪器进行检测,过程繁琐。文章研究偶联了专一性的酶解法与蒽酮-硫酸法,快速测定复杂培养液中的软骨素类多糖质量浓度。该方法通过超滤去除单糖等小分子杂质后,将多糖用专一性硫酸软骨素裂解酶分解为寡糖,再通过超滤去除大分子杂质,得到的寡糖过滤液使用蒽酮-硫酸法快速测定多糖质量浓度。该多糖定量方法可以选择不同特异性的裂解酶,适用于复杂培养液中其他多糖的快速定量分析。

**关键词:**硫酸软骨素(CS);软骨素;定量;酶解;蒽酮-硫酸法;超滤

**中图分类号:**Q943.2

**文献标志码:**A

**文章编号:**1003-5060(2023)07-0991-06

## Chemoenzymatic quantification of chondroitin sulfate polysaccharides

CHEN Tingting, LI Wenjing, YANG Guixia, ZHOU Xianxuan, SHI Chunhong

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

**Abstract:** Chondroitin sulfate(CS) and its derivatives are a kind of glycosaminoglycan with various clinical therapeutic effects. CS lyase can act on the glycosidic bond between glucuronic acid and N-acetylgalactosamine in CS to generate unsaturated disaccharides. The concentration determination of chondroitin produced from microbial fermentation requires several steps of purification and the employment of expensive equipment, which is very cumbersome. In this study, the coupling of specific enzymatic hydrolysis and anthrone-sulfuric acid method was carried out to determine the chondroitin concentration in the complex culture medium conveniently. The small molecular impurities, including monosaccharides, were removed by ultrafiltration. Then, the polysaccharide was enzymatically lyzed into oligosaccharides, followed by removing macromolecular impurities via ultrafiltration again. The concentration of obtained oligosaccharide filtrate was then quickly determined by the anthrone-sulfuric acid method. According to the specificity of the lyase action, this method can also be applied to the quantification of other polysaccharides in a complex culture medium.

**Key words:** chondroitin sulfate(CS); chondroitin; quantification; enzymatic hydrolysis; anthrone-sulfuric acid method; ultrafiltration

硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)是一类广泛存在于动物结缔组织中的酸性糖胺聚糖类大分子多糖,在生物体内多以蛋白聚糖侧链形式存

在<sup>[1-2]</sup>。硫酸软骨素及软骨素的碳链骨架由葡糖醛酸(GlcA)和 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)以  $\beta$ 1, 3 和  $\beta$ -1, 4 糖苷键(4-GlcA- $\beta$ 1, 3-GalNAc- $\beta$ 1)交

收稿日期:2022-02-11;修回日期:2022-04-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31670120)

作者简介:陈婷婷(1997—),女,安徽蚌埠人,合肥工业大学硕士生;

周贤轩(1977—),男,湖南湘西人,博士,合肥工业大学教授,硕士生导师;

石春红(1979—),女,安徽合肥人,博士,合肥工业大学助理研究员,通信作者,E-mail:2014800078@hfut.edu.cn.

替连接而成的重复二糖单元组成,一般有二糖单元 20~100 个<sup>[3-4]</sup>。软骨素经硫酸化后得到硫酸软骨素,根据其硫酸化位点的不同,可以将硫酸软骨素分为以下不同类型<sup>[5]</sup>;硫酸化发生在GalNAc 的 C-4 位、GalNAc 的 C-6 位羟基上的分别是硫酸软骨素 A、硫酸软骨素 C;硫酸软骨素 E 的 GalNAc 的 C-4 位和 C-6 位羟基均发生硫酸化;硫酸软骨素 B 一般称为硫酸皮肤素(DS),其结构是硫酸软骨素 A 中 GlcA 被艾杜糖醛酸取代<sup>[6]</sup>。硫酸软骨素因其结构多样性而具有各种不同功能<sup>[7]</sup>,硫酸软骨素及其低分子量衍生物在治疗风湿病、骨质疏松症、关节炎、腰间盘突出等方面具有重要作用<sup>[8-10]</sup>。

硫酸软骨素裂解酶(ChSase)可以将硫酸软骨素、透明质酸等糖胺聚糖裂解为不饱和二糖及寡糖<sup>[11]</sup>,主要存在于微生物中。根据其作用底物的不同可以分为 ChSase ABC、ChSase AC、ChSase B、ChSase C 等类型。其中:ChSase ABC 可以降解硫酸软骨素 A、硫酸软骨素 B、硫酸软骨素 C 及透明质酸;ChSase AC 可将软骨素、硫酸软骨素 A、硫酸软骨素 C 及透明质酸降解为不饱和二糖和寡糖<sup>[12]</sup>;ChSase B 可以降解硫酸软骨素 B 和透明质酸;ChSase C 严格作用于硫酸软骨素 C 和透明质酸。本研究使用的裂解酶 AsChnAC 酶解机制同 ChSase AC,是一种硫酸软骨素 AC 外切酶<sup>[13]</sup>。

本研究提供了一种复杂培养液中软骨素类多糖质量浓度的定量检测方法,通过多糖酶解与蒽酮-硫酸法相结合,测定软骨素类多糖质量<sup>[14]</sup>,测定过程如图 1 所示。

首先通过超滤去除培养基中小分子杂质,再用相应的裂解酶将多糖分解为不饱和二糖或寡糖,这些低分子量糖可经超滤截留住大分子杂质,最后结合蒽酮-硫酸法测定糖质量浓度。

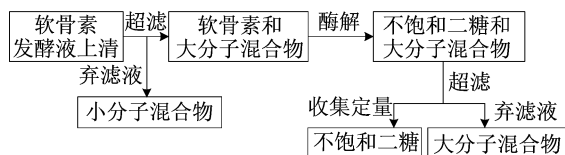


图 1 化学酶法定量示意图

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株

大肠杆菌 BL21、大肠杆菌 K4 $\Delta$ kfoE、大肠杆

菌 EcN $\Delta$ kfiA::Kan、大肠杆菌 EcN、大肠杆菌 BL21/pET28a(+)-AsChnAC,均由本实验室保存。

#### 1.1.2 材料与试剂

硫酸软骨素 C、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、氯化钠、咪唑、苯甲基磺酰氟(PMSF)、蒽酮、浓硫酸、重水(D<sub>2</sub>O)、Bradford 试剂、40%丙酰胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵(APS)、TEMED、超滤管、透析袋等。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 诱导纯化硫酸软骨素裂解酶 AsChnAC

将携带表达硫酸软骨素裂解酶 AsChnAC 质粒的大肠杆菌 BL21/pET28a(+)-AsChnAC 单克隆过夜培养并转移到 2 L 新鲜 LB 培养液中,37 °C 振荡培养至 A<sub>600</sub>>0.6。加 400  $\mu$ L 1 mol/L IPTG 于 22 °C 过夜诱导。诱导后的菌液在转速 6 000 r/min 下 4 °C 离心 20 min,收集菌体。用 BufferA (25 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑)重悬菌体。向上述溶液加 100 mmol/L PMSF 后超声破碎,破碎的细胞液于 12 000 r/min、4 °C 离心 20 min,收集上清液。上清液以 1 mL/min 的流速通过 Ni-NTA 柱,用 BufferA (25 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑)洗杂,BufferB (25 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑)洗脱。在 25 mmol/L Tris、500 mmol/L NaCl 溶液中透析,收集蛋白组分。纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,并使用 Bradford 法测其蛋白质量浓度<sup>[15]</sup>。

### 1.2.2 蒽酮-硫酸法

样品与蒽酮反应试剂(含 0.1%蒽酮和 80%浓硫酸)以体积比 1:3 混匀,每种样品设置 3 个平行组,将混合液于 100 °C 水浴 15 min、冰浴 15 min,测定 620 nm 处吸光度值。

### 1.2.3 硫酸软骨素 C 标准曲线的绘制

称取硫酸软骨素 C 溶于 ddH<sub>2</sub>O,配制成 20 mg/mL 的母液,将硫酸软骨素 C 稀释至 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、2.0 mg/mL,每个质量浓度梯度设置 3 个平行组,蒽酮-硫酸法测 620 nm 处吸光度值,OriginPro 绘制标准曲线,计算线性回归方程。

### 1.2.4 AsChnAC 裂解硫酸软骨素 C 定量分析

将 30 mg/ml 硫酸软骨素 C(溶于 20 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 7.0)与 0.2 mg/mL As-

ChnAC 等体积混合,在 37 °C 下分别水浴反应 10、30、50、90、720、960 min,100 °C 煮沸 3 min,13 000g 离心 2 min,收集上清液。取 400  $\mu$ L 上清液加入 0.5 mL 10 kDa 超滤管,14 000g 离心 30 min,收集过滤液。倒置超滤管,1 000g 离心 2 min,收集浓缩液。蒽酮-硫酸法测硫酸软骨素 C 质量。

### 1.2.5 核磁共振氢谱分析

称取 20 mg 硫酸软骨素 C 溶于 500  $\mu$ L D<sub>2</sub>O,将待测样品装入 0.5 mm 核磁管进行核磁共振氢谱 (proton nuclear magnetic resonance, <sup>1</sup>H NMR) 检测。分别称取 20 mg 硫酸软骨素 C 溶于 1 mL LB 培养液和 1 mL BL21 菌液上清,干燥完全后,溶于 500  $\mu$ L D<sub>2</sub>O,将待测样品装入 0.5 mm 核磁管进行 <sup>1</sup>H NMR 检测。

### 1.2.6 质谱分析

将 20 mg/mL 硫酸软骨素 C 与 0.2 mg/mL AsChnAC 等体积混合,37 °C 水浴反应 16 h。反应液于 100 °C 煮沸 3 min,13 000g 离心 2 min,收集上清。上清用透析膜 (MWCO 1 kDa) 在去离子水中透析 4 h。将上述样品进行质谱分析。

### 1.2.7 硫酸软骨素 C 和软骨素质量浓度测定

分别挑取大肠杆菌 K4 $\Delta$ kfoE、大肠杆菌 EcN、大肠杆菌 EcN $\Delta$ kfiA :: Kan 单克隆于 3 mL M9C 中,37 °C 振荡过夜。分别将上述菌液按 1% 的量转接至 50 mL M9C 中,37 °C 振荡培养约 20 h。菌液于 12 000 r/min 离心 10 min 收集上清。称取硫酸软骨素 C 溶于 EcN $\Delta$ kfiA :: Kan 菌液上清中配制成 1 mg/mL 的溶液。分别取 3 mL 上述硫酸软骨素 C 溶液、K4 $\Delta$ kfoE 菌液上清、EcN 菌液上清、EcN $\Delta$ kfiA :: Kan 菌液上清与 300  $\mu$ L 200 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 7.0) 溶液混匀。混匀后分别用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤,以去除残余菌体。取上述过滤后的溶液加入 10 kDa 0.5 mL 超滤管,一次 400  $\mu$ L,14 000g 离心 30 min 后弃滤液,重复此过程直至 3 mL 溶液加完。加 400  $\mu$ L 20 mmol/L Tris-HCl,14 000g 离心 20 min,重复 2 次,去除培养液中分子杂质。向超滤管加 150  $\mu$ L 20 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 7.0),冲洗膜两侧,倒置超滤管,1 000g 离心 2 min,再加 20 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 7.0) 定容至 200  $\mu$ L。加 300  $\mu$ L 2 mg/mL As-ChnAC 于定容后的溶液中,37 °C 水浴反应 16 h 后,100 °C 煮 3 min,13 000g 离心 2 min,收集上清。将上清加入 10 kDa 0.5 mL 超滤管,14 000g 离心 30 min,得到过滤液。过滤液干燥完全,加

100  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 重悬,重悬液用蒽酮-硫酸法测其多糖质量浓度。

### 1.2.8 样品损失率及软骨素质量浓度的计算

以硫酸软骨素 C 溶液计算样品损失率,公式如下:

$$\text{损失率} = \left[ \left( 3\ 000 - \frac{A_{620} + 0.005\ 42}{0.004\ 07} \right) / 3\ 000 \right] \times 100\%。$$

软骨素质量浓度计算公式为:

$$\rho_{\text{软骨素}} = \frac{A_{620} + 0.005\ 42}{0.004\ 07 \times 3\ 000 (1 - \text{损失率})}。$$

## 2 结果与分析

### 2.1 <sup>1</sup>H NMR 结果分析

将硫酸软骨素 C 进行 <sup>1</sup>H NMR 检测,结果如图 2 所示。

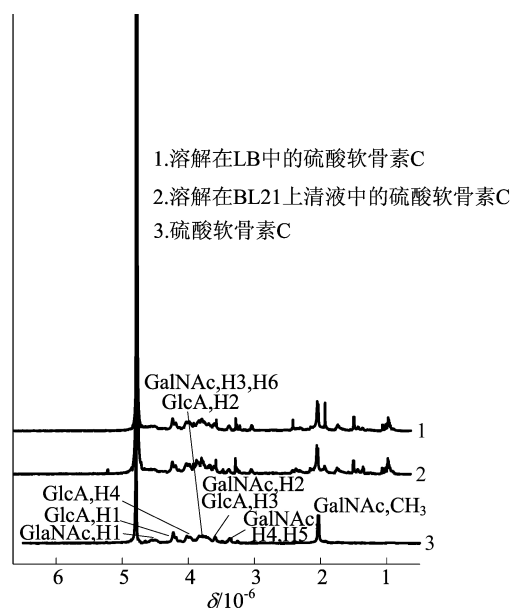


图 2 硫酸软骨素 C 的 <sup>1</sup>H NMR 分析

从图 2 可以看出,图谱无杂峰,且 CS—C 共有 7 个特征峰,其中化学位移在  $1.99 \times 10^{-6}$  处是硫酸软骨素 C 中 N-乙酰基甲基的特征峰,通常可以用来粗略定量该糖质量。LB 培养液中硫酸软骨素 C 的核磁共振图谱和大肠杆菌 BL21 培养液中硫酸软骨素 C 的核磁共振图谱与硫酸软骨素 C 标准品的图谱对比,发现复杂培养基中的硫酸软骨素 C 的核磁共振图谱有较多杂峰,特别是 N-乙酰基甲基的特征峰信号受到严重干扰,说明其中复杂成分干扰了 NMR 对硫酸软骨素 C 的定量分析。因此,<sup>1</sup>H NMR 法不能用于测定复杂培养基

LB 培养液中的硫酸软骨素 C 质量浓度。

## 2.2 硫酸软骨素裂解酶的诱导表达与纯化

将表达得到的蛋白收集纯化,进行 SDS-PAGE 电泳,AsChnAC 酶蛋白 SDS-PAGE 分析结果如图 3 所示,图 3 中:泳道 1 为 Protein Marker;泳道 2 为 AsChnAC 蛋白。

由图 3 可知,纯化后得到较单一的目的蛋白,纯化后收集的 AsChnAC 蛋白用 Bradford 法测得,其质量浓度为 2 mg/mL。

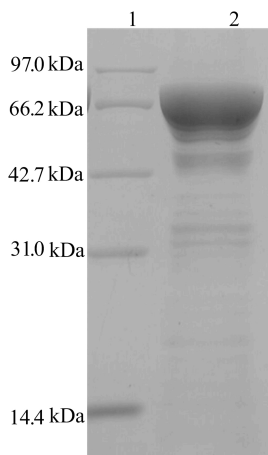


图 3 AsChnAC 酶蛋白 SDS-PAGE 电泳图

## 2.3 硫酸软骨素 C 标准曲线绘制

浓硫酸将多糖水解为单糖,与蒽酮反应生成深绿色复合物,在 620 nm 处有最大吸光度值,吸光度值与糖质量存在明显线性关系。以硫酸软骨素 C 质量为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。硫酸软骨素 C 的标准曲线如图 4 所示。

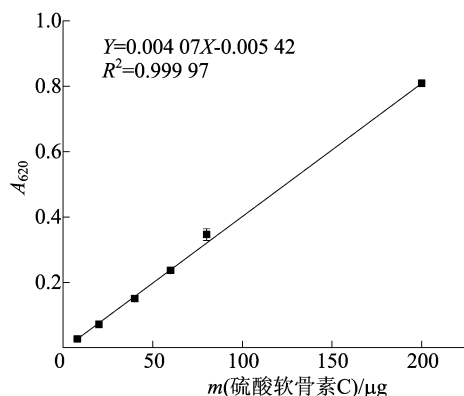


图 4 硫酸软骨素 C 标准曲线

由图 4 可知,在所测质量浓度范围内,硫酸软骨素 C 质量与吸光度值呈正相关。

## 2.4 硫酸软骨素 C 裂解的定量分析

硫酸软骨素 C 在不同消化时间点超滤收集

的寡糖质量如图 5a 所示。由图 5a 可知,硫酸软骨素 C 与 AsChnAC 裂解酶等体积混合,于 37 °C 水浴反应不同时间,酶解液上清经超滤得到的过滤液用蒽酮-硫酸法定量。硫酸软骨素 C 在被 AsChnAC 分解 90 min 后寡糖质量不再明显增加。

倒置超滤管得到未被分解的硫酸软骨素 C,未分解的硫酸软骨素 C 质量占总硫酸软骨素 C 质量的比例与时间呈负相关,如图 5b 所示。由图 5b 可知,随着时间的增加,未分解的硫酸软骨素 C 质量占总硫酸软骨素 C 质量的比例逐渐下降,表明硫酸软骨素 C 被 AsChnAC 裂解为寡糖。在酶解 960 min 后,酶解率可达 96.5%。

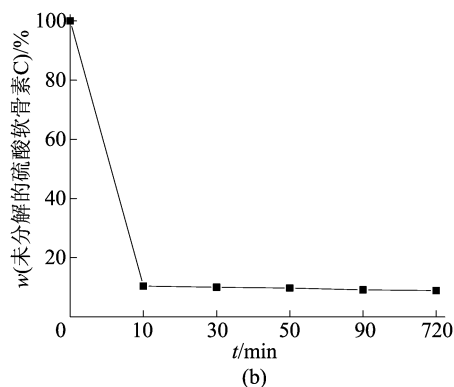
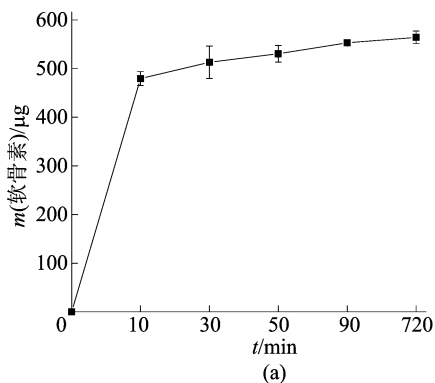


图 5 不同消化时间硫酸软骨素 C 定量分析

## 2.5 硫酸软骨素 C 和软骨素质量浓度分析

硫酸软骨素 C 经 AsChnAC 酶解后的质谱分析如图 6 所示。由图 6 可知,所得实测二糖的  $m/z$  值为 457.7、480.1,符合预期二糖的  $m/z$  值 (458.07 和 480.04)。质谱分析结果显示,高分子硫酸软骨素被酶切成了二糖,其他寡糖成分极少,在质谱分析中没有明显信号。

通过 AsChnAC 酶解法和蒽酮-硫酸法,测定了复杂培养基中的硫酸软骨素 C 质量浓度以及 EcN、K4ΔkfoE 菌株上清液中未纯化的软骨素质

量浓度。大肠杆菌 *EcNΔkfiA* :: Kan 为敲除了 *kfiA* 基因的 *EcN* 菌株,为本实验室保存。由于 *kfiA* 基因的敲除,该菌株无法合成荚膜多糖,因此可以作为阴性对照。以硫酸软骨素 C 标准品溶液作为外标,反映了待测样品的损失率,根据损失率算出软骨素类多糖的质量浓度如图 7 所示。

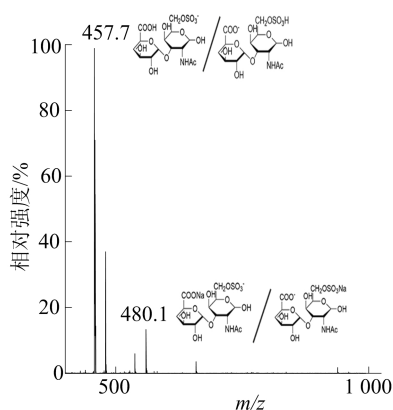


图 6 硫酸软骨素 C 酶解后质谱分析

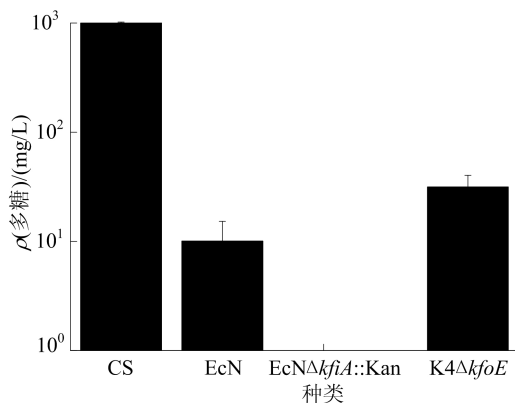


图 7 培养液中软骨素类多糖的质量浓度

将硫酸软骨素 C 溶液的  $A_{620}$  代入损失率计算公式,得到损失率为 23.1%。将 *EcN*、*K4ΔkfoE* 上清的  $A_{620}$  代入软骨素质量浓度计算公式,得到 *EcN* 上清中软骨素类多糖质量浓度为 10.1 mg/L, *K4ΔkfoE* 上清中软骨素的质量浓度为 31.5 mg/L。

### 3 讨 论

硫酸软骨素的传统制备方法主要是从动物的软骨组织中提取<sup>[16]</sup>,存在结构不均匀、动物源致病菌等问题<sup>[17]</sup>。软骨素与大肠杆菌 K4 的荚膜多糖结构类似<sup>[18]</sup>。近年来,通过微生物发酵生产软骨素,并进一步制备出硫酸软骨素,逐渐成为研究热点<sup>[19]</sup>。该方案具有潜在的显著降低成本、低污染、工艺简单、产品质量稳定等优点。大肠杆菌 K4 是软骨素类似物的主要生产菌株,其产物是

果糖软骨素。本研究使用敲除了 *kfoE* 基因的 *K4ΔkfoE* 菌株,其产物去除了该菌荚膜多糖中的果糖基团,是制备硫酸软骨素的重要原材料<sup>[20]</sup>。但是在测定该菌产生的软骨素质量时,微生物培养液中的复杂成分(如培养基单糖成分、代谢产物、肽聚糖成份等)会干扰软骨素多糖的定量分析。因此,有必要开发一种方法快速定量检测发酵液中硫酸软骨素类多糖质量浓度。

硫酸软骨素的分子量范围为 20~80 kDa, AsChnAC 酶蛋白属于硫酸软骨素裂解酶 AC,在葡糖醛酸 C4 位断裂  $\beta$ -1,4 糖苷键,生成不饱和双键<sup>[13,21]</sup>。本文使用专一性的酶解方法去除杂质的干扰,结合蒽酮-硫酸法可以简便准确地测定复杂培养液中的多糖质量浓度。使用截留分子量为 10 kDa 的超滤管先将培养液中的小分子干扰物去除,再用裂解酶 AsChnAC 将硫酸软骨素类多糖降解为不饱和寡糖。通过超滤得到寡糖过滤液,进一步排除了大分子杂质的干扰,最后使用蒽酮-硫酸法可以方便地测出软骨素类多糖质量浓度。

该方法提供了一种发酵液中软骨素类多糖质量浓度的定量检测方法。该方法偶联了酶专一性分解软骨素与化学分析方法,只需通过 2 个步骤,即可将复杂成分中造成定量干扰的小分子、大分子杂质去除,可以快速地测定复杂培养液中的软骨素类多糖质量浓度。该方法具有普适性,利用不同专一性的多糖裂解酶,该方法也可以扩展使用于其他多糖的定量分析。

### [参 考 文 献]

- [1] VARKI A, CUMMINGS R D, AEBI M, et al. Symbol nomenclature for graphical representations of glycans[J]. *Glycobiology*, 2015(12):1323-1324.
- [2] RESTAINO O F, FINAMORE R, DIANA P, et al. A multi-analytical approach to better assess the keratan sulfate contamination in animal origin chondroitin sulfate[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 958:59-70.
- [3] CIMINI D, DE-ROSA M, VIGGIANI A, et al. Improved fructosylated chondroitin production by *kfoC* overexpression in *E. coli* K4 [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150(3):324-331.
- [4] DEANGELIS P L, PADGETT-MCCUE A J. Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(31):24124-24129.
- [5] SUGAHARA K, MIKAMI T, UYAMA T, et al. Recent ad-

- vances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2003, 13(5):612-620.
- [6] TROWBRIDGE J M, GALLO R L. Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan[J]. *Glycobiology*, 2002, 12(9):117-125.
- [7] HAN W, WANG W, ZHAO M, et al. A novel eliminase from a marine bacterium that degrades hyaluronan and chondroitin sulfate [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(40):27886-27898.
- [8] LI L, LI Y, IJAZ M, et al. Review on complement analysis method and the roles of glycosaminoglycans in the complement system [J]. *Carbohydrate Polymers: Scientific and Technological Aspects of Industrially Important Polysaccharides*, 2015, 134:590-597.
- [9] LIU J, PEDERSEN L C. Anticoagulant heparan sulfate: structural specificity and biosynthesis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(2):263-272.
- [10] ZHANG Q, LI J, LIU C, et al. Protective effects of low molecular weight chondroitin sulfate on amyloid beta (A $\beta$ )-induced damage in *vitro* and in  *vivo* [J]. *Neuroscience*, 2015, 305:169-182.
- [11] LI Y, CHEN Z Y, ZHOU Z, et al. Expression, purification and characterization of GAPDH-ChSase ABC I from *Proteus vulgaris* in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2016, 128:36-41.
- [12] YIN F X, WANG F S, SHENG J Z. Uncovering the catalytic direction of chondroitin AC exolyase: from the reducing end towards the non-reducing end[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(9):4399-4406.
- [13] CHEN L, SHI C Q, YIN F X, et al. Cloning and characterization of a chondroitin AC exolyase from *Arthrobacter* sp. SD-04 [J]. *Molecular Biotechnology*, 2019, 61(10):791-800.
- [14] YU Y Y, YE H F, WU D D, et al. Chemoenzymatic quantification for monitoring unpurified polysaccharide in rich medium [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(18):7635-7645.
- [15] KIELKOPF C L, BAUER W, URBATSCH I L. Bradford assay for determining protein concentration [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020, 2020(4):102-269.
- [16] LAMARI F N, KARAMANOS N K. Structure of chondroitin sulfate[J]. *Advances in Pharmacology*, 2006, 53:33-48.
- [17] RAINSFORD K D. Importance of pharmaceutical composition and evidence from clinical trials and pharmacological studies in determining effectiveness of chondroitin sulphate and other glycosaminoglycans; a critique[J]. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2009, 61(10):1263-1270.
- [18] RODRIGUEZ M L, JANN B, JANN K. Structure and serological characteristics of the capsular K4 antigen of *Escherichia coli* O5:K4:H4, a fructose-containing polysaccharide with a chondroitin backbone[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1988, 177(1):117-124.
- [19] SCHIRALDI C, CIMINI D, ROSA M D. Production of chondroitin sulfate and chondroitin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4):1209-1220.
- [20] LIU J, YANG A H, LIU J, et al. KfoE encodes a fructosyltransferase involved in capsular polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* K4 [J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(7):1469-1477.
- [21] LINHARDT R J, AVCI F Y, TOIDA T, et al. CS lyases: structure, activity, and applications in analysis and the treatment of diseases [J]. *Advances in Pharmacology*, 2006, 53:187-215.

(责任编辑 闫杏丽)

## (上接第 977 页)

- [11] 阮永芬, 刘岳东. 昆明盆地粉土的特性研究与利用[J]. *岩土力学*, 2003, 24(增刊 1):199-202.
- [12] 肖军华, 刘建坤, 彭丽云, 等. 黄河冲积粉土的密实度及含水率对力学性质影响 [J]. *岩土力学*, 2008, 29(2):409-414.
- [13] HOLMSGAAARD R, NIELSEN B N, IBSEN L B. Interpretation of cone penetration testing in silty soils conducted under partially drained conditions[J]. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2016, 142(1):1-10.
- [14] KRAGE C P, DEJONG J T. Influence of drainage conditions during cone penetration on the estimation of engineering properties and liquefaction potential of silty and sandy soils[J]. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 2016, 142(11):1-10.
- [15] 段海澎, 余飞, 戴张俊, 等. 淮北平原浅表层沉积土承载力特征及其螺旋板检测评定方法研究[J]. *工程地质学报*, 2013, 21(1):158-165.
- [16] 余亚男, 余飞, 戴张俊, 等. 淮北平原典型地质体成因规律及工程影响分析[J]. *科学技术与工程*, 2012, 12(5):1001-1006.
- [17] 金权. 安徽淮北平原第四系[M]. 北京:地质出版社, 1990:9-12.
- [18] 吴磊磊, 吴道祥, 叶磊, 等. 静力触探估算安徽省沿江平原黏性土物理力学性质指标方法研究[J]. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2020, 43(11):1521-1528.
- [19] 赵华宏, 吴道祥, 叶磊, 等. 利用 CPT 确定安徽省沿江丘陵平原黏性土地基承载力的方法研究[J]. *合肥工业大学学报(自然科学版)*, 2020, 43(10):1362-1369.
- [20] 凌能祥, 李声闻, 宁荣健. 数理统计[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社, 2014:176-180.

(责任编辑 张淑艳)