

琼胶酶的研究进展

李能章, 邱荣蓉, 彭远义

(西南大学 动物科技学院, 中国重庆 400716)

摘要: 琼胶酶是一类能降解琼胶多糖的酶总称, 其降解产物具有多种生理活性功能. 从琼胶酶的分布来源、应用研究、酶学性质及分子生物学研究现状等方面综述了近年来国内外琼胶酶的最新研究进展.

关键词: 琼胶酶; 应用研究; 酶学性质; 克隆表达

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2006)S0-0062-05

Advances in Agarase

LI Neng-zhang, QIU Rong-rong, PENG Yuan-yi

(College of Animal Science & Technology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Agarase, the name for a set of enzymes which can degrade agar, has been used in many aspects. The products of agar enzymatic hydrolysis display many functional activities. Progresses on agarase in sources, applications, enzymology properties, molecular biology and several other aspects are reviewed.

Key words: agarase; application; enzymology properties; gene clone and expression

(Life Science Research, 2006, 10(2): 062 ~ 066)

琼胶是一种从江篱、石花菜等红藻中提取出来的水溶性多糖, 主要由琼胶糖和硫酸琼胶两部分组成, 广泛应用于生化、临床、医药、食品等领域, 由于琼胶不易被绝大多数微生物所降解的特性, 也被广泛用作实验室培养基支持载体. 琼胶酶能够水解琼胶多糖, 其降解产物在很多方面具有重要作用, 同时, 在海藻的单细胞分离、制备原生质体以及分子生物学方面也多有应用, 因此, 对琼胶酶的研究就具有重要的理论意义和经济价值.

1 琼胶酶的分布来源

在自然环境中, 琼胶酶的分布较广, 很多微生物和一些海洋软体动物都能产生琼胶酶, 但还没

发现有植物产生琼胶酶的报道.

1.1 微生物来源

现阶段, 绝大多数所分离研究的琼胶酶都是来自微生物, 而海洋细菌又是产琼胶酶最多的一个类群, 这类微生物分布较广. 在海洋生态系统中, 海洋植物、动物、海水及海洋沉积物中都存在有产琼胶酶的细菌. 2005年, 汤海青^[1]等从红藻 (*Gelidium amansii*) 中分离到多株产琼胶酶细菌; 在一种海洋无脊椎动物中, 也分离到两株类别单孢菌 (*Alteromonas*-like KMM 241^T、KMM 642) 产生琼胶酶^[2]; Jam M^[3]等人从海水中分离得到的一株细菌 (*Zobellia galactanivorans*) 能产生两种 β -琼胶酶; 2005年, Ohta Y^[4]等人从日本的 Noma Point

收稿日期: 2006-03-10; 修回日期: 2006-05-19

作者简介: 李能章 (1975-) 男, 四川宣汉人, 硕士, 主要从事微生物资源及代谢方面研究; 彭远义 (1965-) 男, 四川乐山人, 西南大学教授, 博士, 通讯作者, 主要从事微生物与免疫方面研究; Tel: 023-68250641; E-mail: pyy2002@sina.com.cn.

230 m 深的海底沉积物中,分离到一种产 α -琼胶酶的细菌(*Thalassomonas* JAMB-A33)。除海洋生态系统外,在陆地生态系统中,也存在有琼胶降解菌,不过存在的种类较海洋少。Suzuki H^[5]等就在日本岐阜地区的土壤中分离到一株芽孢杆菌(*Bacillus* sp. MK03)能产生 α -新琼寡糖水解酶;2003年,Hosoda A^[6]等报道了从菠菜根际土壤中分离到4株琼胶降解细菌。从近年的研究发现,几乎所有的从微生物来源的琼胶酶都是细菌产生的,对于真菌产生琼胶酶还没有相关的报道。

1.2 动物来源

琼胶酶除了能从微生物中获得,还可以从一些软体动物中分离得到,如绣凹螺、九孔鲍、冠海詹等的组织体中分离到琼胶酶。

2 琼胶酶作用的底物及产物

琼胶酶是一类能够降解琼胶的酶系,所作用的底物有琼胶、琼胶寡糖。琼胶降解的中间产物为多种不同聚合度的寡糖混合物,而这些不同聚合度的寡糖混合物可以通过控制琼胶酶的反应条件来获得。终产物主要有琼寡糖和新琼寡糖。琼寡糖如琼四糖、琼三糖、琼五糖^[4,5];新琼寡糖如新琼二糖、新琼四糖、新琼六糖^[7,8]。

3 琼胶酶的应用研究

3.1 制备琼胶低聚糖

琼胶酶降解产生琼胶低聚糖,具有高度专一、高效的特点,降解条件温和,产物不易被破坏,利于产物分析和回收。琼胶被降解成一定聚合度(DP)低聚糖后,具有多种生理活性功能。2004年,张红艳等人研究表明,琼胶糖酶解产物浓度达3.11%时,就具有较强的抑菌作用,能有效减少菌落产生;薛长湖等^[9]采用体外鲁米诺发光和DPPH体系对琼胶低聚糖清除氧自由基活性研究结果表明,琼胶低聚糖ML对水溶性的-OH和O₂有很好的清除作用,效果与自由基清除剂肌肽相近,其中含硫量高、分子质量大的低聚糖在清除自由基过程中发挥主要作用。除此之外,琼胶低聚糖还具有抗病毒、抗肿瘤、增强免疫等作用^[10]。

3.2 在分子生物学研究中的应用

琼胶酶在分子生物学研究方面的应用主要是利用其降解琼脂糖凝胶,回收胶体中的DNA或RNA。现在,已经有成熟的方法对DNA进行回收。另外,在进行大分子质量线型或开环DNA凝胶电

泳时,采用琼胶酶处理琼胶糖,能提高DNA在琼胶糖凝胶中的分离浓缩效果^[11]。

3.3 在多糖结构研究中的应用

用琼胶酶水解某些海藻的多糖,测定其水解产物的结构,进而推测多糖的结构,是行之有效的方法。高洪峰等利用 β -琼胶酶降解多管藻多糖,然后利用NMR光谱法对其降解产物的结构进行分析,从而推知多管藻多糖的结构。

3.4 作为海藻遗传工程的工具酶

由于琼胶是某些红藻细胞壁的重要组成部分,因此琼胶酶可用作大型海藻酶解的工具酶来获得单细胞或原生质体,海藻原生质体可用于海藻细胞生理生化的研究,也可以进行细胞间的融合以及进行目的基因的导入。Araki T等利用海洋弧菌(*Vibro* sp. PO-303)产生的琼胶酶,配合纤维素酶等,降解红藻获得大量海藻单细胞,海藻单细胞可以作为替代饵料用于海水动物的养殖。

3.5 在藻类致病中的作用

琼胶酶除了其有利之外,在红藻的某些致病微生物的致病机制中起到了比较重要的作用,琼胶酶这时作为降解红藻细胞壁的酶,致使红藻细胞壁变薄。Schroeder DC^[12]等人研究了交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas gracilis* B9)其所产生的 β -琼胶酶在红藻(*Gracilaria gracilis*)致病中的作用,通过扫描电子显微镜和免疫学检测方法观察到红藻变薄细胞壁位置有琼胶酶的存在。因此,在人工培养红藻时应避免感染琼胶降解菌。

4 琼胶酶的酶系及酶学性质研究

琼胶酶根据其裂解糖苷键的不同,主要分为 α -琼胶酶和 β -琼胶酶两大类。 α -琼胶酶裂解琼胶糖的 α -1,3糖苷键, β -琼胶酶裂解琼胶糖的 β -1,4糖苷键。近年来,分离纯化出了多种琼胶酶,并对这些酶的酶学性质及相关功能结构进行了研究。

4.1 天然琼胶酶

天然琼胶酶的构成有多种,有单体、二聚体及多聚体酶形式,这些酶从分子质量大小到酶的最适性,从底物降解到终产物,都有很大不同。

1993年,P Potin等^[13]对别单胞菌(*Alteromonas agarlyticus* (Cataldi) comb. nov. GJ1B)产生的 α -琼胶酶进行分离纯化,SDS-PAGE电泳显示一条带,分子质量大小为180 kDa,而通过亲和色谱法测定出原酶的分子质量大小大约为360 kDa,由

此推断,该酶为二聚体.在无 Ca^{2+} 条件下,当 pH 值低于 6.5,温度高于 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,该酶很快失活. Suzuki H 等^[5]报道了芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. MK03) 产生的 α - 新琼寡糖水解酶. 纯化该酶后, PAGE 和 SDS-PAGE 电泳为单一条带,而通过凝胶分子筛和 SDS-PAGE 电泳测定其分子质量大小分别为 320 kDa 和 42 kDa, 推断该酶为一个多聚体酶. Suzuki H^[14] 等对 *Bacillus* sp. MK03 产生的一种 β - 琼胶酶进行了分离纯化, SDS-PAGE 电泳只有一条带,分子质量大小为 92 kDa, 凝胶色谱测定分子质量大小为 113 kDa, 比较二者,该酶为单体酶,其最适 pH 7.6,最适温度为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,降解的主要产物为新琼四糖,还可以降解新琼六糖为新琼四糖和新琼二糖,但不能降解新琼四糖和新琼二糖. Wang J^[15] 等对中国南海分离到的一株交替单孢菌 (*Alteromonas*) 产生的 β - 琼胶酶进行了分离纯化研究, SDS-PAGE 电泳一条带,分子质量大小为 39.5 kDa,最适 pH 7.0,最适温度 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$,有一个比较窄的酶活温度 ($30\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) 适应范围. 主要降解产物为新琼四糖和新琼六糖. Ohta Y^[14] 等对海洋细菌 *Thalassomonas* JAMB-A33 产生的一种新的 α - 琼胶酶 AgaA33 进行了分离纯化,凝胶色谱和 SDS-PAGE 电泳测定其分子质量大小都为 85 kDa,表明该酶为单体酶,该酶的最适 pH 8.5,最适温度 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$,酶活达 40.7 U/mg . 终降解产物为琼四糖,可降解琼胶、琼六糖、新琼六糖.

4.2 重组琼胶酶

迄今为止,已有多个琼胶酶基因被克隆表达,并对这些重组酶性质进行了相关的研究. 在应用酶的研究中,耐热、较强抗性的酶一直受到青睐,通过不同的方式获得这类酶是应用酶学研究的一个重点,作为琼胶酶的应用研究也是同样. Ohta Y^[16] 等就对海洋细菌 JAMB-A94 的 β - 琼胶酶基因 *agaA* 进行了基因重组表达. 结果表明,该重组酶在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 具有很好的热稳定性,最适 pH 7.0,最适温度为 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$,在 100 mmol/L 的 EDTA 和 30 mmol/L 的十二烷基磺酸钠处理条件下酶的活力不变. 同一年,他们^[17] 利用枯草芽孢杆菌作为表达宿主又对海洋细菌 (*Microbulbifer* JAMB-A7) 的琼胶酶基因进行了重组表达,其重组酶被分泌到胞外,纯化后的酶在 pH 7.0, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下酶活为 398 U/mg ,其最适 pH 7.0,最适温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时其酶活半衰期到 502 min. 在较高的 NaCl, EDTA 和多种表面活性剂浓度条件下酶活不受影响,特别是十二烷基磺酸

钠浓度达到 2% 时都对其酶活没有影响. 另外,在研究的重组酶中,绝大多数重组酶的 pH 适性中性稍微偏碱,但也有报道,重组酶的最适 pH 值达到了 9.0^[18].

4.3 琼胶酶的结构研究

2003 年 Julie Allouch^[19] 等首次报道了两种 β - 琼胶酶的晶体结构. 他们利用大肠杆菌对细菌 *Zobellia galactanivorans* Dsjj 中的两种 β - 琼胶酶基因重组表达,并对这两种重组蛋白 β - 琼胶酶 A 和 B 进行结晶. 晶体大小分别为 1.48 和 2.3A, β - 琼胶酶 A 采用多重不规则衍射的方法对其结构进行了确定,而 β - 琼胶酶 B 则以 β - 琼胶酶 A 为参照进行分子取代的方法确定了其晶体三维结构. 结果表明,它们结构都采用一个 jelly 卷曲折叠,具有一个深沟催化活性中心. 在催化中心分别含有亲核 (亲质子) 残基 Glu-47 和 Glu-184,酸性残基 Glu-152 和 Glu-189. 最后,通过不同寡糖的降解产物研究分析了这两种琼胶酶的结构与酶活性的关系.

4.4 琼胶酶降解作用新机制

Allouch J^[20] 在研究 *Zobellia galactanivorans* 所分泌的 β - 琼胶酶降解琼胶糖的琼胶酶- 琼胶寡糖复合物晶体结构时发现,在琼胶酶蛋白质体上结合了两条寡糖链,一条在其催化活性部位处,蛋白体结合了寡糖链上四个糖单体,另一条接合在与催化活性部位相对应平行的部位上,蛋白体上结合另一条寡糖链上的 8 个糖单体. 由此推断,这种含有两个平行的糖链接合位点的琼胶酶意味着该酶可能在催化降解琼胶糖之前能解开琼胶糖的双螺旋结构.

5 琼胶酶的分子生物学研究

5.1 琼胶酶基因克隆测序及高效表达

现阶段,已有多种琼胶酶的基因被克隆测序,部分琼胶酶的基因 (或结构基因) 被重组表达^[16,17]. 1993 年, Y Sugano 等^[21] 对一种海洋弧菌 (*Vibrio* sp. JT0107) 琼胶酶基因 *agaA* 进行了测序,该基因由 2985 对碱基对构成,编码 975 个氨基酸的蛋白酶,该酶理论分子质量为 105271 Da,在 N 端含有 20 个氨基酸大小的信号肽. Kang NY^[18] 等报道了海洋假单孢菌 (*Pseudomonas* sp. SK38) β - 琼胶酶基因 (*pagA*) 序列,结构基因由 1011 bp 构成,编码 337 个氨基酸,末端含有一个 18 个氨基酸的信号肽序列. 2004 年, Ohta Y 等^[22] 对海洋细菌 *Microbulbifer-like* isolate 的 β - 的琼胶酶基因进行了克隆

测序,该基因编码的成熟蛋白分子质量为126 921 Da,由1 146个氨基酸构成,含有两个碳水化合物结合位序列和一个催化活性位序列. Jam M^[3] 等对细菌 *Zobellia galactanivorans* 的两种 β -琼胶酶基因 *agaA* 和 *agaB* 进行了克隆测序,它们分别编码539和353个氨基酸的蛋白酶,蛋白酶理论分子质量分别为60 kDa和40 kDa, *AgaA* 由催化活性中心结构域 (*AgaAC*) 和两个C-末端结构域构成,这两个C-末端结构域具体的功能还不清楚,在酶分泌的时候要被加工去掉. *AgaB* 由一个催化活性中心结构域和信号肽组成,该信号肽与原核生物的膜脂蛋白N-末端信号序列相似,可能与其细胞膜的锚定有关. *AgaAC* 和 *AgaB* 在大肠杆菌中得到了高效表达,并对其进行了分离纯化,通过凝胶分子筛和电泳实验表明, *AgaAC* 是一个单链蛋白,主要是在琼胶固体阶段起作用,而 *AgaB* 是一个二聚体,主要降解被 *AgaAC* 降解后的琼胶片断,它们都是随机切断 β -1,4糖苷键,但 *AgaAC* 的活性较 *AgaB* 强得多.

2005年, Ohta Y^[7]等利用枯草芽孢杆菌对细菌 *Agarivorans* sp. JAMB-A11的 β -琼胶酶结构基因进行了高效表达. 工程菌发酵液的酶活达到 1.9×10^4 U/L,是原始菌株的30倍,重组酶 (*RagaA11*) 分子质量为105 kDa,其酶活达到371 U/mg,最适pH 7.5~8.0,最适温度为40℃,水解琼胶和新琼四糖,降解终产物主要为新琼二糖,占总产物量的近90%.

5.2 质粒中的琼胶酶基因

就微生物来源的琼胶酶基因,大部分分布在核基因组中^[3, 18, 21],但在细菌质粒中也发现分布有琼胶酶基因. 曾平忠^[20]等就从海蓬子属植物 (*Salicornia virginica*) 根际沉淀物中分离到的一株细菌 (*Microcilla* sp. PRE1) 具有降解琼胶的能力,但研究发现,该菌在固体培养基中培养长出的很多菌落失去降解琼胶的能力,通过形态学观察和16sRNA分析它们却为同一种菌,进一步研究发现,能降解琼胶的菌中含有一个101 kb大小的质粒 (*pSD15*),而不能降解琼胶的菌没有质粒 *pSD15*,对该质粒稳定性的实验得出,在每一阶段培养中,该菌就有2%的细胞失去这个质粒,通过质粒的序列推测,该质粒上具有5个不同的琼胶酶基因.

6 环境条件对琼胶酶分泌的影响

分解琼胶的微生物产生琼胶酶与外界的条件

有很大的关系,外界营养条件的变化就会影响到琼胶酶的产生与分泌,特别是碳水化合物的影响,当外界环境中还有其他碳源存在时,就会严重影响到琼胶酶的产生^[1]. 1992年, Oscar Leonl 等在研究一株从 San Vicente 海湾分离到的交替单胞菌 (*Altermonas* sp. C-1) 时发现,在底物琼胶的诱导下,该菌能产生高水平的琼胶酶,但如果以葡萄糖或半乳糖作为唯一碳源时,琼胶酶的产量则急剧下降. Whitehead LA^[8] 等报道了一株海洋细菌 2-40 能够利用多种复杂的碳水化合物,能优先利用比较简单的碳源,但同时会影响琼胶酶的分泌.

7 结语

琼胶降解菌分布较广,但主要存在于海洋中,在土壤、淡水中较少. 由于海洋环境的特殊性,我们对海洋细菌的了解和研究还很不够. 迄今为止,已有几十种不同的琼胶酶得到了分离纯化,并对部分琼胶酶基因进行了克隆表达,但实现了产业化生产的却只有从大西洋假单胞菌 (*Pseudomonas atlantica*) 中分离的 β -琼胶酶,并且价格昂贵,应用范围也仅限于科研工作中,大大阻碍了琼胶酶及琼胶低聚糖的开发应用. 随着新的琼胶降解菌的不断发现和高活性、高表达的琼胶酶研究不断深入,利用琼胶酶降解得到大量低分子质量的具有活性功能的琼寡糖,将具有更广阔的应用前景.

参考文献(References):

- [1] 汤海青,管斌,王雪鹏 等. 琼胶降解菌 AT222 的筛选和产酶性质[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 216-219.
- [2] LYUDMILA A R, NATALIA V Z, MANFRED R, et al. *Glaciecola mesophila* sp. nov., a novel marine agar-digesting bacterium[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53: 647-651.
- [3] JAM M, FLAMENT D, ALLOUCH J, et al. The endo-beta-agarases *AgaA* and *AgaB* from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans*: two paralogue enzymes with different molecular organizations and catalytic behaviours[J]. Biochem J, 2005, 385(Pt 3): 703-13.
- [4] OHTA Y, HATADA Y, MIYAZAKI M, et al. Purification and characterization of a novel alpha-agarase from a *Thalassomonas* sp[J]. Cur Microbiol, 2005, 50(4): 212-216.
- [5] SUZUKI H, SAWAI Y, SUZUKI T, et al. Purification and characterization of an extracellular alpha-neoagarooligosaccharide hydrolase from *Bacillus* sp. MK03[J]. J Biosci Bioeng, 2002, 93(5): 456-463.
- [6] HOSODA A, SAKAI M, KANAZAWA S. Isolation and characterization of agar-degrading *Paenibacillus* spp. associated with the rhizosphere of spinach[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, 67(5): 1048-1055.

- [7] OHTA Y, HATADA Y, ITO S, *et al.* High-level expression of a neoagarbiose-producing beta-agarase gene from *Agarivorans* sp. JAMB-A11 in *Bacillus subtilis* and enzymic properties of the recombinant enzyme[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2005, 41 (Pt 2): 183-191.
- [8] WHITEHEAD L A, STOSZ S K, WEINER R M. Characterization of the agarase system of a multiple carbohydrate degrading marine bacterium[J]. *Cytobios*, 2001, 106(Suppl 1): 99-117.
- [9] 薛长湖, 徐强, 赵雪, 等. 琼胶低聚糖清除自由基的活性[J]. *水产学报*, 2003, 27(3): 283-288.
- [10] 陈海敏, 严小军, 郑立, 等. 琼胶的降解及其产物的分析[J]. *郑州工程学院学报*, 2003, 24(3): 41-44.
- [11] COLE K D, AKERMAN B. Enhanced capacity for electrophoretic capture of plasmid DNA by agarase treatment of agarose gels[J]. *Biomacromolecules* 2000, 1(4): 771-781.
- [12] SCHROEDER D C, JAFFER M A, COYNE V E. Investigation of the role of a beta(1-4) agarase produced by *Pseudoalteromonas gracilis* B9 in eliciting disease symptoms in the red alga *Gracilaria gracilis*[J]. *Microbiology*, 2003, 149(Pt 10): 2919-2929.
- [13] POTIN P, RICHARD C, ROCHAS C, *et al.* Purification and characterization of the alpha-agarase from *Alteromonas agaralyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 214: 599-607.
- [14] SUZUKI H, SAWAI Y, SUZUKI T, *et al.* Purification and characterization of an extracellular beta-agarase from *Bacillus* sp. MK03[J]. *J Biosci Bioeng*, 2003, 95(4): 328-334.
- [15] WANG J, MOU H, JIANG X, *et al.* Characterization of a novel beta-agarase from marine *Alteromonas* sp. SY37-12 and its degrading products[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 24: 1-7.
- [16] OHTA Y, NOGI Y, MIYAZAKI M, *et al.* Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable beta-agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(5): 1073-1081.
- [17] OHTA Y, HATADA Y, NOGI Y, *et al.* Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable beta-agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(4): 505-514.
- [18] KANG N Y, CHOI Y L, CHO Y S, *et al.* Cloning, expression and characterization of a beta-agarase gene from a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. SK38[J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(14): 1165-1170.
- [19] JULIE Allouch, MURIELLE Jam, WILLIAM Helbert, *et al.* The three-dimensional structures of two-agarases[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(47): 47171-47180.
- [20] ALLOUCH J, HELBERT W, HENRISSAT B, *et al.* Parallel substrate binding sites in a beta-agarase suggest a novel mode of action on double-helical agarose[J]. *Structure*, 2004, 12(4): 623-632.
- [21] SUGANO Y, MATSUMOTO Y, KODAMA H, *et al.* Cloning and sequencing of agaA, a unique agarase 0107 gene from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(11): 3750-3756.
- [22] OHTA Y, HATADA Y, NOGI Y, *et al.* Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 86 beta-agarase from a deep-sea *Microbulbifer*-like isolate[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 66(3): 266-275.
- [23] ZHEN Ping-zhong, ARESA Toukdarian, DONALD Helinski. Sequence analysis of a 101-kilobase plasmid required for agar degradation by a *Microcilla* Isolate[J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5771-5779.

(上接第 41 页)

- [14] ALA-KOKKO L, BALDWIN C T, MOSKOWITZ R W, *et al.* Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(17): 6565-6568.
- [15] D'AMBROSIO E, CASA B, BOMPANI R, *et al.* Glucosamine sulfate: a controlled clinical investigation in arthrosis[J]. *Pharmacotherapeutica*, 1981, 2: 504-508.
- [16] HOUP T J B, WEIN C, PAGET-DELLIO S D. Effect of glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee[J]. *J Rheumatol*, 1999, 26: 2423-2430.
- [17] TOWHEED T E. Current status of glucosamine therapy in osteoarthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 15, 49(4): 601-604.
- [18] BRUYERE O, PAVELKA K, ROVATI L C, *et al.* Glucosamine sulfate reduces osteoarthritis progression in post-menopausal women with knee osteoarthritis: evidence from two 3-year studies[J]. *Menopause*, 2004, 11(2): 138-143.
- [19] POOLSUP N, SUTHISANG C, CHANNARK P, *et al.* Glucosamine long-term treatment and the progression of knee osteoarthritis: systematic review of randomized controlled trials[J]. *Ann Pharmacother*, 2005, 39(6): 1080-1087.
- [20] ANDERSON J W, NICOLosi R J, BORZELLCA J F. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy[J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43(2): 187-201.
- [21] BYUN H G, KIM Y T, PARK P J, *et al.* Chitooligosaccharides as a novel β -secretase inhibitor[J]. *Carbohydr Polym*, 2005, 61: 198-202.
- [22] 印大中. 破解衰老之谜[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [23] YIN D, BRUNK U T. Carbonyl toxication hypothesis of biological aging[C]//MACIERA-COELHO A. *Molecular Basis of Aging*. London: CRC Press, 1995. 421-436.
- [24] PARK P J, JE J Y, KIM S K. Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry[J]. *J Agr Food Chem*, 2003, 51: 4624-4627.
- [25] JE J Y, PARK P J, KIM S K. Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy[J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42: 381-387.
- [26] YIN X Q, LIN Q, ZHANG Q, *et al.* $O_2^{\cdot -}$ scavenging activity of chitosan and its metal complexes[J]. *Chi J Appl Chem*, 2002, 19: 325-328.
- [27] SUN T, XIE W, XU P. Antioxidant activity of graft chitosan derivatives[J]. *Macromol Biosci*, 2003, 3: 320-323.
- [28] INAL M E, KANBAK G, SUNAL E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging[J]. *Clin Chim Acta*, 2001, 305(1-2): 75.
- [29] ROGINA B, HELFAND S L. Cu, Zn-superoxide dismutase deficiency accelerate the time course of an age-related marker in *Drosophila melanogaster*[J]. *Biogerontology*, 2000, 1(2): 163.