

利用聚丙烯酰胺凝胶电泳研究硫酸软骨素酶的性质

王莹¹, 王凤舞¹, 赵雪²

(1. 青岛农业大学食品学院, 山东青岛 266109) (2. 中国海洋大学食品学院, 山东青岛 266003)

摘要: 本文运用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 研究了 RC3 菌株所产硫酸软骨素 A 酶 (CSAase) 的部分酶学性质。通过对菌株 RC3 进行菌种活化、扩大培养和发酵产酶培养, 再通过对微生物菌体进行超声波破碎获得胞内粗酶液, 将其与硫酸软骨素 A 等体积混合, 反应后通过 PAGE 研究各条件对酶活力的影响。结果表明, RC3 菌株所产硫酸软骨素 A 酶的最适反应温度为 20~40 °C, 最适 pH 值为 8.0, 镁离子是该酶的激活剂, 铜离子和锌离子是该酶的抑制剂, 钾离子、钙离子、钠离子、锰离子和钡离子对该酶活力没有显著影响; 当镁离子浓度为 10 mM 时对该酶表现出最强的激活作用; 当铜离子和锌离子的浓度为 5 mM 时对该酶活力表现出强烈的抑制作用; 在上述最优条件下, 该酶作用 4 h 后获得的低分子量产物比大分子 CSA 具有更好的抗氧化活性。上述研究结果对该 CSAase 的应用奠定基础。

关键词: 酶学性质; 硫酸软骨素酶; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2015)3-97-102

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.017

Properties of Chondroitinase Using Polyacrylamide Gel Electrophoresis

WANG Ying¹, WANG Feng-wu¹, ZHAO Xue²

(1. College of Food Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2. College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: In this study, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was used to explore the enzymatic properties of chondroitinase A (CSAase) produced by strain RC3. A crude solution of intracellular chondroitinase was obtained by ultrasonication of the microbial cells, which was then mixed with an equal volume of chondroitin sulfate A (CSA) and incubated. The effect of various culture conditions on enzyme activity was studied using PAGE. The results showed that the optimal temperature and pH value for fermentation of CSAase were 20 °C to 40 °C and 8.0, respectively. Magnesium ion was found to activate CSAase, while copper and zinc ions were strong inhibitors. Potassium, calcium, sodium, manganese, and barium ions did not significantly affect enzyme activity. Magnesium ions at a concentration of 10 mM showed the strongest activating effect on CSAase. Copper and zinc ions showed strong inhibitory effect on the enzyme activity at a concentration of 5 mM. Under the above optimal conditions, the low-molecular-weight products that were obtained after a 4-hour hydrolysis reaction using this enzyme, showed a higher antioxidant activity than that of CSA, which is a macromolecule. This study suggests the potential applicability of CSAase.

Key words: enzymatic property; chondroitinase; polyacrylamide gel electrophoresis; antioxidant activity

硫酸软骨素 (*Chondroitin sulfate*, CS) 是一种活性广泛的酸性黏多糖^[1], 在人和动物的多种组织中均有分布, 尤其以软骨组织含量最丰富。硫酸软骨素纯品状态为乳白色或白色粉末, 无味无臭, 易溶于水, 但不溶于丙酮、乙酸、乙醚等有机溶剂, 具有较强吸水性能。商品硫酸软骨素是由动物软骨分离纯化而得到的一类酸性黏多糖, 近年来鲨鱼软骨在硫酸软骨素的制备中得到重视和发展, 占据了一定的市场份额^[2~3]。硫酸软骨素是由 N-乙酰-D 氨基半乳糖和 D-葡萄糖醛酸组成的共聚物硫酸酯, 其相对分子质量大多

收稿日期: 2014-07-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31371759); 青岛农业大学高层次人才启动基金项目 (631347)

作者简介: 王莹 (1980-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 酶工程

在 10 kDa 至 50 kDa 的范围之间^[4]。因为硫酸基的位置不相同, 硫酸软骨素具有很多异构体, 如 A、B、C、D、E、F、H 等。

研究表明, 硫酸软骨素具有降血脂、抗氧化、抗凝血、抗辐射、抗菌消炎等多种生物学活性, 在研制功能性食品、药品方面有巨大应用价值^[5~6]。多糖相对分子质量的大小与其生物活性的高低有着紧密的联系, 一般地, 高分子量多糖经过降解, 其生物活性会有不同程度的提高。Alban 等^[7]研究了分子量对硫酸多糖抗凝血活性的影响, 结果发现, 多糖的抗凝血活性与分子量近似呈哑铃形曲线的关系。多糖分子量较大, 分子体积也较大, 严重影响其穿过细胞膜的速率, 进而降低了进入机体内并发挥生物活性的速率。分子量低的多糖溶解性较好, 同时黏度低, 生物利用率高。

张莲等^[8]研究发现,相对分子质量为65142 Da的硫酸软骨素降解为5020 Da的低聚糖后,其抗氧化活性有显著提高。还有研究发现,相对分子质量在5300~35000 Da时,硫酸软骨素具有最强的药理活性^[9]。目前,硫酸软骨素的降解方法主要有化学法、物理法和酶解法。酶解法克服了化学降解法反应时间长、产物分离困难、硫酸基脱落和物理降解法设备条件限制、能耗高、危险系数高等弊端,是最理想的降解方法。

另一方面,硫酸软骨素酶(CSAase)本身在临床医疗方面也具有重大的应用价值。徐云强等^[10]对急性脊髓损伤大鼠注射硫酸软骨素酶ABC进行治疗,结果表明,硫酸软骨素酶可以降解脊髓损伤瘢痕中的抑制分子,并且改善抑制局部轴突再生的微环境,从而通过再生神经细胞轴突而对脊髓损伤具有治疗效果。硫酸软骨素酶在大骨节病、腰椎间盘突出等疾病的治疗方面也有较好的疗效。

目前硫酸软骨素酶的价格较高,研究人员对其研究热情很高^[11~12],但是在酶学性质研究中都是应用常规的酶活力测定实现的,本文利用聚丙烯酰胺凝胶电泳研究CSAase的酶学性质,该方法更加灵敏、高效,为该酶的研究提供新的方法,并为其应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料与试剂

产酶菌RC3:由本实验团队在海水中筛选获得;

硫酸软骨素A(CSA),阿利新蓝,丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,AP,Tris,TEMED购于Sigma公司;

其它试剂均为国产分析纯;

海水为2014年1月份采集自青岛海域。

1.1.2 试剂配制方法

样品缓冲液:配制成50%的蔗糖溶液,按10 mg/mL加入酚红。

内室缓冲液:取93 g甘氨酸和24.2 g Tris,加超纯水定容至1 L。

外室缓冲液:取6.183 g硼酸,12.11 g Tris和0.372 g EDTA-Na,加超纯水定容至1 L。

染色剂:0.5%阿利新蓝。

脱色剂:2%乙酸。

1.1.3 仪器设备

YXQ-LS立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司;SW-CJ-1F超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;AR1140电子分析天平,美国奥豪斯国际贸易有限公司;QYC-200恒温培养摇床,上海福玛实验

设备有限公司;UH-1200B超声波细胞粉碎仪,天津奥特赛恩斯仪器有限公司;TGL-16M高速台式冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;BIO-RAD MINI电泳槽,美国伯乐生命医学产品有限公司;DYY-60电泳仪电源,北京市六一仪器厂;Agilent 1100高效液相色谱仪,美国安捷伦科技公司;Milli Q超纯水系统,Millipore;DU-800型紫外-可见分光光度计,美国贝克曼公司。

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备

将保藏的RC3菌种活化后,接入液体培养基(0.2% CSA和0.2%蛋白胨,用海水配制),并于转速为180 r/min,25℃的恒温摇床培养48 h,得到RC3发酵液。于4℃、10000 r/min冷冻离心10 min,取上清液,即得粗酶液。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法

配制分离胶浓度20%,浓缩胶浓度5%,上样量为15 μL,200 V恒压进行电泳。结束后分离胶置于摇床上染色20 min。再用清水漂洗2~3次,脱色30 min。

1.2.3 硫酸软骨素酶的酶学性质研究

1.2.3.1 温度对CSAase活力的影响

将适量的CSA加入到0.2 M、pH 8.0的Tris-HCl溶液中,配制成0.2%的CSA溶液。取5支试管,每支试管中加入0.2% CSA溶液100 μL和粗酶液100 μL,混合均匀后分别置于20℃、30℃、40℃、50℃和60℃摇床中反应。另取1支试管,加入0.2% CSA溶液100 μL和100 μL灭活粗酶液(粗酶液在100℃水浴保温10 min)作为对照,混合均匀后置于30℃摇床反应。6 h后取出试管在100℃水浴灭酶10 min。冷却后在5000 r/min离心10 min,取上清液按照1.2.2所述进行PAGE电泳实验。

1.2.3.2 pH对CSAase活力的影响

配制0.2 M的Tris-HCl溶液,分别调节pH至8.0、9.0、10.0。同时,配制0.2 M的磷酸缓冲液,调节pH分别为5.0、6.0、7.0。将适量的CSA分别加入到上述溶液中,配制成0.2% CSA溶液(pH5.0~10.0)。取6支试管,分别加入不同pH 0.2%的CSA溶液100 μL,再分别加入100 μL粗酶液,混合均匀后置于30℃摇床中反应,6 h后取出试管于100℃保温10 min。冷却后于5000 r/min离心10 min,取上清液按照1.2.2所述进行PAGE电泳实验。

1.2.3.3 时间对CSAase分解底物的影响

配制0.2%的CSA溶液(用0.2 M、pH 8.0的Tris-HCl配制)。取8支试管,向每支试管中加入0.2% CSA溶液100 μL和粗酶液100 μL,混匀后置于30℃

摇床反应。另取 1 支试管,加入 0.2% CSA 溶液 100 μ L 和灭活粗酶液 100 μ L (100 $^{\circ}$ C 水浴保温 10min) 作为对照,混合均匀后置于 30 $^{\circ}$ C 摇床反应。1 h 后取出第 1 支试管,100 $^{\circ}$ C 水浴灭酶 10min,然后分别在反应 2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、9 h、12 h 分别取出一支试管进行类似操作。其中对照管于反应 12 h 后取出。冷却至室温后,在 5000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液按照 1.2.2 所述进行 PAGE 电泳实验。

1.2.3.4 金属离子种类对 CSAase 活力的影响

将适量的氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化铜、氯化锰、氯化锌、氯化钡分别加入到 0.2 M、pH 8.0 的 Tris-HCl 溶液中,配制成 10mM 的金属离子溶液。将 CSA 分别加入到上述溶液中配制含不同金属离子的 0.2% 的 CSA 溶液。取 7 支试管,分别加入上述 CSA 溶液 100 μ L 和粗酶液 100 μ L,混合均匀后置于 30 $^{\circ}$ C 摇床反应。另取 1 支试管,加入 0.2% CSA 溶液 100 μ L (用 0.2 M, pH 8.0, Tris-HCl 配制) 和 100 μ L 粗酶液,混合均匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴中作为对照。反应 6 h 后取出 8 支试管,100 $^{\circ}$ C 水浴灭酶 10 min。冷却后在 5000 r/min 离心 10 min,取上清液按照 1.2.2 所述进行 PAGE 电泳实验。

1.2.3.5 不同浓度抑制剂和激活剂对 CSAase 活力的影响

将适量的氯化铜、氯化锌、氯化钡分别加入到 0.2 M、pH 8.0 的 Tris-HCl 溶液中,分别配制成 1 mM, 5 mM, 10 mM 和 20 mM 的金属离子溶液。将适量的 CSA 分别加入到上述金属离子溶液中,配制成 0.2% 的 CSA 溶液。取 12 支试管,分别加入上述 CSA 溶液 100 μ L 和粗酶液 100 μ L,混合均匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴中反应。另取 1 支试管,加入 0.2% 的 CSA 溶液 100 μ L (用 0.2 M, pH 8.0, Tris-HCl 配制) 和粗酶液 100 μ L,混合均匀后置于 30 $^{\circ}$ C 水浴中作为对照。反应 6 h 后取出所有试管,100 $^{\circ}$ C 水浴灭酶 10 min。冷却后在 5000 r/min 离心 10 min,取上清液按照 1.2.2 所述进行 PAGE 电泳实验。

1.2.4 CSA 及其酶解产物的抗氧化活性对比

1.2.4.1 低分子量 CSA 的酶解方法

取 CSA(用 20 mM pH 8.0 的 Tris-HCl 配制) 5 mL,在 30 $^{\circ}$ C 预热 10 min 后加入粗酶液 5 mL,在上述最佳反应条件下(即 30 $^{\circ}$ C、pH 8.0、加入 10 mM Mg^{2+}) 振荡反应 4 h。反应结束后,在 100 $^{\circ}$ C 保温 10 min 使酶失活,于 5000 r/min 离心 10 min,取上清液加入 3 倍体积 95%,静置取沉淀,进行真空干燥得低分子量的 CSA。

1.2.4.2 分子质量的测定

采用高效凝胶排阻色谱方法检测多糖分子量的变化。色谱仪为 Agilent 1100 高效液相色谱仪;选用 TSK-gel G4000PW \times 1 (7.5 mm \times 30 cm) 色谱柱;流动相为 0.2 mol/L NaCl,流速 0.5 mL/min;柱温设定 45 $^{\circ}$ C;选择示差折光检测器进行糖检测。

1.2.4.3 DPPH 自由基清除能力的测定

该方法参照金蓓等(2013)^[13],并作适当修改。取待测样品 0.5 mL,加入 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液 1.2 mL,

混匀,用去离子水补足至 4 mL,室温静置暗反应 30 min,测定 517 nm 的吸光度值,对照用蒸馏水代替样品,其它步骤完全相同。DPPH 清除率计算公式见式(1):

$$\text{DPPH清除率}/\% = (1 - A_1 / A_0) \times 100\% \quad (1)$$

注: A_1 : 样品的吸光度; A_0 : 对照的吸光度。

1.2.4.4 还原能力的测定

参考铁氰化钾还原法^[14]测定,并作适当修改。在试管中依次加入样品 1 mL、0.2 mol/L pH 6.6 磷酸缓冲液 0.2 mL、1% 铁氰化钾 0.5 mL,混匀后于 50 $^{\circ}$ C 水浴放置 20 min,迅速冷却,加入 10% 三氯乙酸 1 mL,混匀,于 5000 r/min 离心 10 min,取上清液 1.5 mL,加 1% $FeCl_3$ 0.2 mL 和蒸馏水 3 mL,摇匀后静置 5 min,以蒸馏水为参比测定 700 nm 吸光度,以 Vc 作为阳性对照。

1.2.5 数据处理方法

试验数据以平均值 \pm 标准差表示,采用 SPSS 软件进行统计学分析。分析方法为单因素方差分析和邓肯(Duncan)多重比较,显著性水平选择 0.05。

2 结果与讨论

2.1 温度对 CSAase 活力的影响

温度对酶活力的影响结果见图 1。

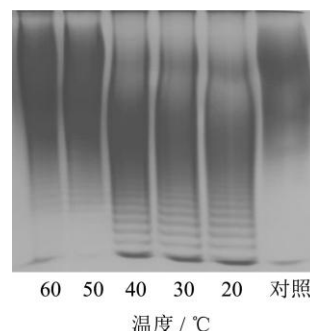


图 1 温度对酶活力的影响

Fig.1 Effect of temperature on CSAase activity

根据 PAGE 的原理,泳道中出现的深色条带是由于 CSA 及其降解产物导致的,其中分子量越大迁移距

离越短，分子量越小迁移距离越长，在胶片底部的为聚合度很低的 CSA 降解产物。图 1 结果可以看出，对照管的酶经过失活后与 CSA 反应，不会产生降解作用，但由于 CSA 样品本身分子量分布在一定范围，因此在泳道中形成一条深色条带；当反应温度为 20 °C、30 °C、40 °C 时，在胶片底部出现明显横向条带，证明有低聚合度的 CSA 产生，是 CSAase 对 CSA 降解的产物，同时，这三个温度下条带的清晰程度相当，证明 CSAase 在这三个温度下酶活能够充分发挥作用；但当温度升至 50 °C、60 °C 时，能够明显看到降解产物的条带模糊不清，同时大分子 CSA 的迁移不明显，说明在此温度下，CSAase 失活严重。因此证明 CSAase 在 20~40 °C 酶活稳定，50 °C 以后失活严重。

2.2 pH 对 CSAase 活力的影响

pH 值对酶活力的影响结果见图 2。

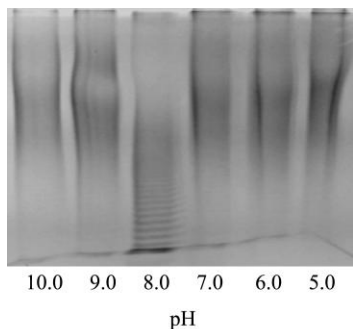


图 2 pH 对酶活力的影响

Fig.2 Effect of pH on CSAase activity

从图 2 可以看到，每一泳道的终点位置不同，主要是由于不同 pH 值下样品的电泳速度不同，随着 pH 的增大，电泳的速度逐渐加快，但不会影响定性分析 pH 值对电泳的影响。从图 2 可以看到，只有在 pH 值为 8.0 时，CSAase 才能够正常发挥作用，大分子量的 CSA 具有明显的迁移，并且产生分子量很低的横向条带即低分子量的酶解产物，而在其它 pH 值均未产生上述现象，说明 CSAase 酶活被抑制，证明该硫酸软骨素酶对 pH 值极其敏感，仅在 pH 8.0 时活性较高，pH 值过高或过低均会严重抑制其活性。

2.3 不同反应时间 CSAase 对底物的降解情况

CSAase 对底物的降解情况随时间的变化结果见图 3。

从图 3 结果可知，与对照相比，反应 3 h 时能够看到横向条带产生，反应 4 h 条带足够清晰。并且随着反应时间增加到 9、12 h 时，条带更加清晰，说明酶对 CSA 的降解越来越充分，产物越来越多。在上述体系下酶解 4 h 足够分析酶对底物的降解。

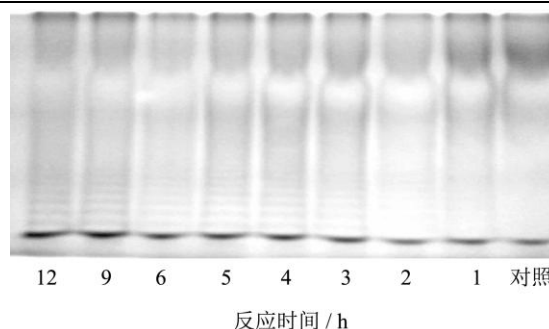


图 3 反应时间酶对底物的分解情况

Fig.3 Substrate decomposition by CSAase over time

2.4 金属离子种类对 CSAase 活力的影响

金属离子种类对 CSAase 活力的影响结果见图 4。

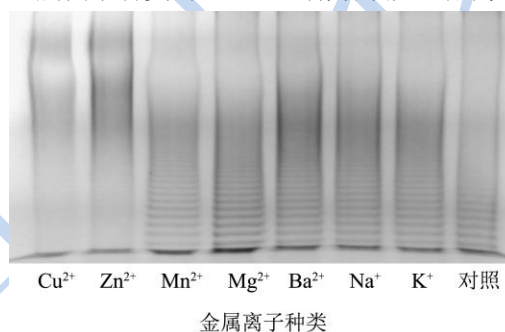


图 4 金属离子种类对酶活力的影响

Fig.4 Effect of mental ions on CSAase activity

从图 4 结果可知，与对照相比，有 Mg^{2+} 存在时，泳道底部产生的横向条带更加清晰，当 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 存在时，没有明显的横向条带产生，说明 CSAase 的活力受到 Mg^{2+} 的激活作用，以及 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的抑制作用。其它离子 K^+ 、 Na^+ 、 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 对 CSAase 的活力无明显影响。

2.5 不同浓度抑制剂和激活剂对 CSAase 活力的影响

激活剂与抑制剂浓度对 CSAase 酶活力的影响结果见图 5~7。

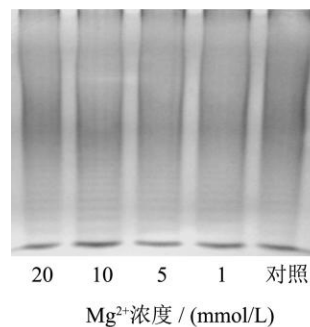
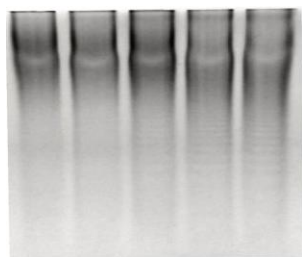


图 5 Mg^{2+} 浓度对酶活力的影响

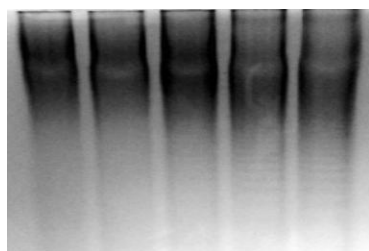
Fig.5 Effect of magnesium ion concentration on CSAase activity



20 10 5 1 对照
Zn²⁺浓度 / (mmol/L)

图 6 Zn²⁺浓度对酶活力的影响

Fig.6 Effect of zinc ion concentration on CSAase activity



20 10 5 1 对照
Cu²⁺浓度 / (mmol/L)

图 7 Cu²⁺浓度对酶活力的影响

Fig.7 Effect of copper ion concentration on CSAase activity

从图 5 结果可知, Mg²⁺浓度为 1 mM 和 5 mM 的浓度时对 CSAase 的活力没有显著影响, 当浓度达到 10 mM 时对 CSAase 的活力有明显的激活作用, 但是在增加浓度至 20 mM 时对 CSAase 活力的激活作用却减弱, 说明 Mg²⁺最佳激活浓度为 10 mM。

从图 6 结果可知, Zn²⁺浓度为 1 mM 时对 CSAase 的活力没有显著影响, 当浓度增加到 5 mM 时产生明显抑制作用, 浓度上升为 10 mM 以上时能够完全抑制该酶的活力。从图 7 结果可知, Cu²⁺的浓度为 1 mM 时, 对 CSAase 的活力没有显著影响, 在 5 mM 的浓度下对 CSAase 的酶活力呈现强烈抑制作用, 并随浓度增高抑制作用加强。

2.6 CSA 及其酶解产物的抗氧化活性与分子量对比

CSA 及其酶解产物的重均分子量及抗氧化活性见表 1 和图 8。按照 1.2.4.1 的方法, CSAase 能够在 4 h 的时间内将大分子硫酸软骨素 (分子量 67382 u) 降解为小分子产物 (分子量 4833 u), 证明该酶酶解效率很高。通过测定抗氧化活性, 证明小分子产物的 DPPH 自由基清除率与还原能力都显著高于大分子 CSA, 说明 CSA 的抗氧化能力与其分子量有密切关系, 适当分子量的低分子量产物比大分子 CSA 具有更好的抗氧化活性, 这与张莲^[8]等的报道相符合。

表 1 CSA 及其酶解产物的分子量及 DPPH 自由基清除率

Table 1 Molecular weight and DPPH scavenging rate of CSA and its enzymatic hydrolysate

项目	CSA	CSA 酶解产物	Vc
重均分子量/Da	67382	4833	-
DPPH 自由基清除率/%	26.32±1.50 ^b	58.41±2.05 ^a	55.43±3.28 ^a

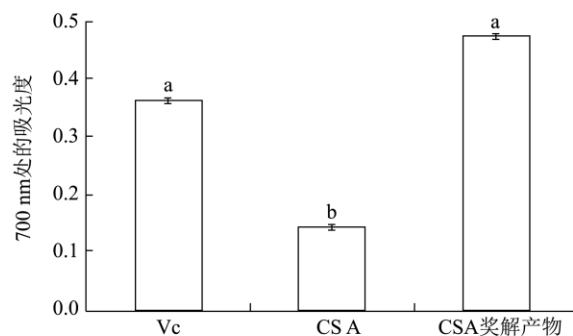


图 8 CSA 及其酶解产物的还原能力

Fig.8 Reducing capacity of CSA and its enzymatic hydrolysate

3 结论

本文通过单因素实验对 RC3 菌株所产 CSAase 的酶学性质进行了研究, 实验结果通过 PAGE 直观地表现出来。实验结果表明, CSAase 的最适反应温度为 20~40 °C; 该酶对 pH 要求很高, 仅在 pH 8.0 显示酶活力, 稍高或稍低的 pH 均会严重抑制其活力; 在最佳反应条件下, 反应 4 h 后对底物分解较为充分; Mg²⁺对该酶具有较强的激活作用, 10 mM 的浓度最佳; Zn²⁺和 Cu²⁺对该酶具有较强的抑制作用, 5 mM 的浓度即会产生强烈抑制作用。在上述最佳酶解条件下, 利用 CSAase 对 CSA 进行酶解 4 h, 获得的低分子量产物比大分子 CSA 具有更好的抗氧化活性, 本文的研究结果为 CSAase 的应用具有指导意义。

参考文献

[1] 马永华, 陈士恩, 臧荣鑫. 硫酸软骨素的研究概况[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(12): 138-140
MA Yong-hua, CHEN Shi-en, ZANG Rong-xin. The research situation of chondroitin sulfate [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2007, 34(12): 138-140

[2] Ahmad S, Gaucher I, Rousseau F, et al. Effects of acidification on physico-chemical characteristics of buffalo milk: A comparison with cow's milk [J]. Food Chemistry, 2008, 106(1): 11-17

[3] Murado M A, Fraguas J, Montemayor M I, et al. Preparation of highly purified chondroitin sulphate from skate (Raja

- clavate) cartilage by-products. Process optimization including a new procedure of alkaline hydroalcoholic hydrolysis [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 49(1): 126-132
- [4] Chiara Schiraldi, Donatella Cimini, Mario Rosa. Production of chondroitin sulfate and chondroitin [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(4): 1209-1220
- [5] 熊双丽,金征宇.不同分子量硫酸软骨素的制备和抗氧化活性探讨[J].*中成药*,2006,28(9):1343-1346
XIONG Shuang-li, JIN Zheng-yu. Preparation of chondroitin sulfate with different molecular weight and antioxidation capacity [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2006, 28(9): 1343-1346
- [6] Rober M Lauder. Chondroitin sulfate: a complex molecule with potential impact on a wide range of biological systems [J]. *Complementary Therapies in Medicine*, 2009, 17(1): 56-62
- [7] Alban S, Franz G. Characterization of the anticoagulant actions of a semisynthetic curdlan sulfate [J]. *Thrombosis Research*, 2000, 99(4): 377-388
- [8] 张莲,王金鹏,孔子青,等.硫酸软骨素的降解及其降解产物抗氧化活性的测定[J].*食品工业科技*,2011,32(12):180-205
ZHANG Lian, WANG Jin-peng, KONG Zi-qing, et al. Degradation of chondroitin sulfate and antioxidation of its degraded products [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011, 32(12): 180-205
- [9] 杨晓兵,由守谊,齐东绮,等.一种低分子量硫酸软骨素的制备方法:中国,200610146273.2 [P].2007.7.11.
YANG Xiao-bing, YOU Shou-yi, QI Dong-qi, et al. A preparation method of low-molecular-weight chondroitin sulfate: China, 200610146273.2 [P]. 2007.7.11.
- [10] 徐云强,冯世庆,王沛,等.硫酸软骨素酶促进大鼠脊髓损伤后轴突再生[J].*中国矫形外科杂志*,2010,18(7):573-578
XU Yun-qiang, FENG Shi-qing, WANG Pei, et al. Axonal regeneration promotion by chondroitinase abc after spinal cord injury in rats [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2010, 18(7): 573-578
- [11] 吴敬君,李晔,张翀,等.肝素黄杆菌硫酸软骨素酶 AC 的高效重组表达体系构建及其酶学性质研究[J].*食品科学*, 2013,34(9):127-134
WU Jing-jun, LI Ye, ZHANG Chong, et al. Gene cloning and recombinant expression of chondroitinase ac from pedobacter heparinus and characterization of recombinant fusion enzyme [J]. *Food Science*, 2013, 34(9): 127-124
- [12] 于淼.硫酸软骨素酶的发酵制备与分离纯化[D].青岛:中国海洋大学生物工程专业,2013
YU Miao. The fermentative preparation, separation and purification of chondroitinase [D]. Qingdao:Ocean University of China, Bioengineering, 2013
- [13] 金蓓,黄梅芳,何梓鹏,等.椰肉蛋白酶解及其产物的抗氧化活性研究[J].*现代食品科技*,2013,29(8):1826-1831
JIN Bei, HUANG Mei-fang, HE Zi-peng, et al. Enzymatic hydrolysis of coconut protein and antioxidant activity of the hydrolysates [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(8): 1826-1831
- [14] 张智,臧云,王群.酰基化蓝靛果花色苷的抗氧化性研究[J].*现代食品科技*,2013,29(3):534-538,486
ZHANG Zhi, ZANG Yun, WANG Qun. Study on antioxidation property of acylated anthocyanins from *Lonicera edulis turcz* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(3): 534-538, 486