

超声波预处理对固定化纤维素酶活性的影响^{*}

王振斌¹ 张杰^{1,2} 王世清² 马海乐¹ 王倩倩² 陈晓寅¹

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 青岛 266109)

【摘要】 采用超声波预处理固定化纤维素酶, 通过单因素试验和响应面法探讨了超声波预处理条件(超声时间、超声频率、超声功率)以及预处理后的酶解温度和 CMC-Na 缓冲液 pH 值对固定化纤维素酶活性的影响, 建立并分析了各因子与酶活相对关系的数学模型, 优化得到的最佳条件为: 酶解温度 58.73℃、CMC-Na 缓冲液 pH 值 3.0、超声时间 16.88 min、超声频率 22.33 kHz、超声功率 26.77 W, 在此条件下, 固定化纤维素酶活性与未加超声波预处理相比较提高了 9.75%。

关键词: 纤维素酶 酶固定化 超声波 响应面法

中图分类号: S216.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2011)03-0150-06

Effect on Activity of Immobilized Cellulase by Ultrasound Assisted Pretreatment

Wang Zhenbin¹ Zhang Jie^{1,2} Wang Shiqing² Ma Haile¹ Wang Qianqian² Chen Xiaoyin¹

(1. College of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract

Immobilized cellulase was pretreated by ultrasound. Based on the single factor and response surface methodology, the effects of ultrasonic parameters, such as ultrasonic time, ultrasonic frequency and ultrasonic power, as well as enzymolytic temperature and pH value of CMC-Na buffer solution after pretreated were investigated. A mathematical model was established and analyzed to describe the relationships between the studied factors and enzyme activity. The optimum treatment parameters were as follows: enzymolytic temperature of 58.73℃, pH value of CMC-Na buffer solution of 3.0, ultrasonic time of 16.88 min, ultrasonic frequency of 22.33 kHz and ultrasonic power of 26.77 W. Under the optimum conditions, enzyme activity of immobilized cellulose increased by 9.75%.

Key words Cellulase, Immobilization of enzymes, Ultrasound, Response surface methodology

引言

纤维素是由 β -1,4-D-吡喃葡萄糖残基组成的纤维状、不可溶的晶体多糖^[1~2], 是组成植物细胞壁的主要结构物质和地球上最丰富的多聚物^[3]。在纤维素酶的作用下, 纤维素可以分解成小分子纤维素、纤维寡糖、纤维二糖和葡萄糖^[4]。

目前纤维素酶解技术已基本成熟。但是在生产过程中, 纤维素酶价格高、用量大, 导致生产成本低,

阻碍了该技术的转化, 因此降低纤维素酶的生产和使用成本成为纤维素酶解技术产业化的关键。目前针对这个问题已有很多研究, 一是采用分子生物学技术选育纤维素酶的高产菌株^[5], 二是通过酶固定化技术提高酶的利用率^[6]。

虽然固定化酶可以重复利用, 但是由于部分酶分子被载体包埋, 使得固定化酶活性降低, 所以提高固定化酶活性的研究是当今研究的一个热点。生物工程中, 超声波提高生物产量和活性的应用研究开

收稿日期: 2010-05-24 修回日期: 2010-08-11

^{*} 江苏省自然科学基金资助项目(BK2008241)、江苏大学高级专业人才培养基金资助项目(08JG003)、中国博士后科学基金资助项目(20090461072)和江苏省博士后科学基金资助项目(0902108C)

作者简介: 王振斌, 副教授, 主要从事生物质能源技术研究, E-mail: wzbb@ujs.edu.cn

始于 20 世纪 80 年代,近年来已开始应用于酶的研究,并取得了一些研究成果^[7]。目前国内外关于超声波对固定化纤维素酶预处理的研究还未见报道。本文以壳聚糖为载体、戊二醛为交联剂的方法来固定化纤维素酶^[8],分别研究超声时间、超声频率、超声功率对固定化酶活性的影响,并用响应面法优化超声波对固定化纤维素酶预处理条件和预处理后固定化纤维素酶的酶解条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

纤维素酶(诺维信生物技术有限公司),壳聚糖(脱乙酰度大于 95%,南通兴成生物制品厂)。

1.1.2 分析纯试剂

羧甲基纤维素钠(CMC-Na),柠檬酸,3,5-2 硝基水杨酸(DNS),苯酚,氢氧化钠,无水亚硫酸钠,酒石酸钾钠,戊二醛,醋酸。

1.2 仪器

CY-5D 型超声波生物促进生长仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;FD-1A-50 型多岐管冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;UY-1601 型紫外/可见分光光度计,北京瑞利分析仪器公司;HH 型恒温水浴锅,江苏金坛市中大仪器厂;HH-A 型恒温水浴搅拌器,江苏金坛市中大仪器厂;LD5-2A 型冷冻离心机,北京医用离心机厂。

1.3 标准方程的建立

取 8 支洗净干燥后的 25 mL 具塞刻度试管,加入标准葡萄糖溶液和蒸馏水,使 1、2、3、4、5、6、7 和 8 号试管中葡萄糖质量浓度依次为 0、0.008、0.016、0.024、0.032、0.04、0.048 和 0.056 mg/mL。充分摇匀后,向各试管中加入 3 mL 0.53% DNS 溶液,摇匀后沸水浴 5 min,取出冷却后用蒸馏水定容至 25 mL,充分混匀。在 540 nm 波长下,以 1 号试管溶液作为空白对照,测定其他各管溶液的吸光度 y ,得到标准方程为

$$y = 17.008x - 0.116 \quad (R^2 = 0.9987) \quad (1)$$

式中 x ——葡萄糖质量浓度,mg/mL

1.4 固定化纤维素酶的制备

参照陈盛等^[9]的方法进行优化,准确称取壳聚糖 5 g,加 2% 醋酸 500 mL,用玻璃棒不断搅拌,最后溶解成透明胶体。取 100 mL 2% 醋酸配制的壳聚糖胶体溶液,加 5% NaOH 75 mL 得絮凝状物质,离心得沉淀,水洗沉淀至中性,然后,加入 5% 的戊二醛 50 mL,室温下用恒温水浴搅拌器搅拌 2 h,静置 12 h,离心弃去上清液,水洗 3~4 次,除去残余戊二

醛。向交联后的壳聚糖中加入 50 mL 稀释 100 倍的纤维素酶,每隔一定时间搅拌一次,放入冰箱中于 4℃ 静置 12 h,第 2 天水洗 3~4 次,除去游离酶,速冻 2 h 后冻干 36 h(真空度小于 304.3 Pa,干燥温度 -35℃),得固定化酶。

1.5 固定化纤维素酶活性的测定方法

将 20 mg 固定化酶加入 3 mL 0.51% CMC-Na 柠檬酸缓冲液中,60℃ 反应 20 min,离心 5 min,取上清液 1 mL,加入 0.2 mL 2 mol/L 的 NaOH 溶液,再加入 0.6 mL 0.53% 的 DNS 溶液,沸水浴 5 min,流水冷却,定容到 5 mL,在 540 nm 波长下测定吸光度,通过标准曲线计算酶活。一个酶活单位 U 定义为 1 g 固定化酶在 1 min 内转化底物产生 1 μmol 还原糖(按葡萄糖计)所相当的酶量^[10]。

1.6 单因素设计

研究超声波预处理条件(超声时间、超声频率、超声功率)以及预处理后的酶解温度和 CMC-Na 缓冲液 pH 值对固定化纤维素酶活性的影响。各单因素的取值分别为:超声时间 5、10、15、20、25、30 min,超声频率 18、20、24、26、29 kHz,超声功率 5、10、15、20、25、30、35、40 W,酶解温度 20、30、40、50、60、70、80、90℃,pH 值 2.0、3.0、4.0、4.8、6.0、7.0。

1.7 优化设计

根据单因素试验结果,确定 CMC-Na 缓冲液的 pH 值为 3.0,选取酶解温度、超声时间、超声频率、超声功率为响应面分析试验的因素,采用 Box-Behnken 方法,进行四因素三水平设计。通过 Design Expert 软件对试验结果进行回归分析,预测最优参数。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 超声时间

在超声频率为 24 kHz、超声功率为 15 W、pH 值为 3.0、酶解温度为 60℃ 条件下,分别研究超声时间 5、10、15、20、25 和 30 min,对固定化纤维素酶活性的影响。

由图 1 可以看出,随着超声时间的提高,酶的

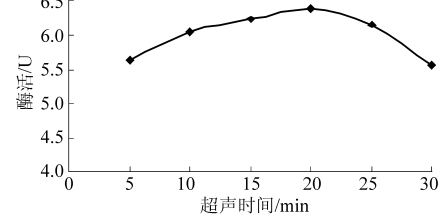


图 1 超声时间对固定化酶活性的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic time on the activity of immobilized cellulase

活性呈现先增加后降低的趋势,在 20 min 之前增加的原因可能是超声波可以使固定化酶的活性中心发生移动,使疏水性增强,在酶解反应时能更好地同底物结合^[11]。在 20 min 时的酶活达到最大,20 min 以后酶的活性降低的原因可能是因为长时间的超声会破坏酶的活性中心。

2.1.2 超声频率

在超声时间为 10 min、超声功率为 15 W、pH 值为 3.0、酶解温度为 60℃ 条件下,分别研究超声频率 18、20、24、26 和 29 kHz,对固定化纤维素酶活性的影响。

由图 2 可以看出,随着超声频率的增大,酶的活性先升高后降低。可能是由于在当达到一定频率时,超声波频率与纤维素酶分子中分子键的固有振动频率相近,形成共振吸收,酶的活性达到最大。

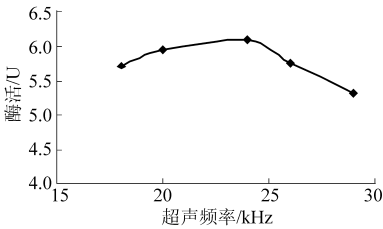


图 2 超声频率对固定化酶活性的影响
Fig.2 Effect of ultrasonic frequency on the activity of immobilized cellulase

2.1.3 超声功率

在超声时间为 10 min、超声频率为 24 kHz、pH 值为 3.0、酶解温度为 60℃ 条件下,分别研究超声功率 5、10、15、20、25、30、35 和 40 W,对固定化纤维素酶活性的影响。

由图 3 可以看出,随着超声功率的增大,酶活先升高后降低,在低功率条件下,超声使酶活增大可能是由于酶的构象发生改变,活性中心发生改变,疏水性增强。而在功率较高时酶活下降的原因可能是高功率超声将固定化载体破坏,使其中的一部分酶脱落,也有可能是破坏了酶的活性中心。

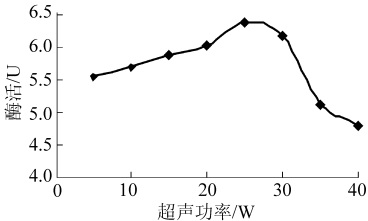


图 3 超声功率对固定化酶酶活的影响
Fig.3 Effect of ultrasonic power on the activity of immobilized cellulase

2.1.4 pH 值

在超声时间为 10 min、超声频率为 24 kHz、超声功率为 15 W、酶解温度为 60℃ 条件下,分别研究 pH

值为 2.0、3.0、4.0、4.8、6.0 和 7.0 时对预处理后固定化纤维素酶活性的影响。

由图 4 可以看出,随着 pH 值的增大,酶活先增加后逐渐降低,在 pH 值为 3.0 时酶活达到最大。由于固定化载体壳聚糖是阳离子载体,所以与游离酶的最适 pH 值(4.8)^[12]相比更偏酸性。

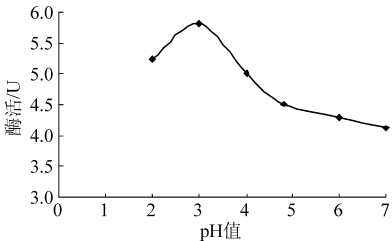


图 4 pH 值对预处理后固定化纤维素酶活性的影响
Fig.4 Effect of pH value on the activity of pretreated immobilized cellulase

2.1.5 温度

在超声时间为 10 min、超声频率为 24 kHz、超声功率为 15 W、pH 值为 3.0 条件下,分别研究酶解温度为 20、30、40、50、60、70、80 和 90℃ 时对预处理后固定化纤维素酶活性的影响。

由图 5 可以看出,在温度较低时,固定化酶的活性随温度的升高逐渐降低,在 50 ~ 60℃ 时活性达到最高,随着温度的继续上升,虽然酶活逐渐降低,但是在 90℃ 时仍然能保持较高的活性,而游离酶在 70℃ 以上活性下降很快,在 90℃ 时活性基本丧失。

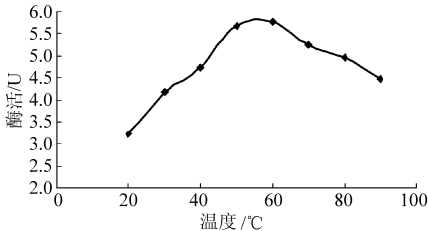


图 5 温度对预处理后固定化纤维素酶活性的影响
Fig.5 Effect of temperature on the activity of pretreated immobilized cellulase

2.2 响应面法优化超声波辅助酶解条件

根据单因素试验结果,设计四因素三水平响应面试验,因素水平如表 1 所示,试验安排与结果如表 2 所示。

表 1 响应面试验因素水平

Tab.1 Factors and levels of response surface experiment

编码	因素			
	酶解温度	超声时间	超声频率	超声功率
	$x_1/^\circ\text{C}$	x_2/min	x_3/kHz	x_4/W
-1	50	15	20	20
0	60	20	23	25
1	70	25	26	30

表 2 Box – Behnken 设计和试验结果

Tab. 2 Box – Behnken design and experimental results					
试验序号	X_1	X_2	X_3	X_4	Y/U
1	-1	0	0	1	5.573 52
2	-1	-1	0	0	4.838 55
3	0	0	1	-1	6.198 25
4	0	-1	-1	0	6.014 50
5	0	1	0	1	5.389 78
6	1	0	1	0	4.912 05
7	-1	0	-1	0	5.941 01
8	1	0	0	-1	4.471 07
9	0	0	0	0	6.423 89
10	0	1	0	-1	5.242 79
11	0	0	0	0	6.381 99
12	0	-1	0	-1	5.610 27
13	0	0	-1	1	5.426 53
14	0	-1	0	1	6.602 48
15	1	-1	0	0	5.242 79
16	0	0	1	1	5.757 26
17	0	1	-1	0	4.838 55
18	0	0	0	0	6.367 12
19	1	0	-1	0	5.022 29
20	1	0	0	1	4.801 80
21	0	0	0	0	6.402 33
22	-1	0	1	0	5.279 53
23	0	0	-1	-1	5.169 29
24	0	1	1	0	6.051 25
25	-1	1	0	0	5.683 77
26	0	-1	1	0	5.867 51
27	-1	0	0	-1	5.169 29
28	1	1	0	0	5.610 27
29	0	0	0	0	6.356 66

根据软件 Design Expert 7.0 所作的分析,得出二次拟合回归方程为

$$Y = 6.38 - 0.24X_1 - 0.19X_2 + 0.14X_3 + 0.16X_4 - 0.12X_1X_2 + 0.17X_1X_3 - 0.018X_1X_4 + 0.36X_2X_3 - 0.21X_2X_4 - 0.10X_3X_4 - 0.82X_1^2 - 0.27X_2^2 - 0.32X_3^2 - 0.46X_4^2 \quad (2)$$

由表 3 回归方程系数显著性检验结果可知:模型一次项 X_1 显著, X_2 、 X_3 、 X_4 不显著;二次项 X_1^2 极显著, X_4^2 均处于显著水平;交互项 X_2X_3 显著,其余项均不显著。

由表 4 可知,回归模型方差分析结果显著 ($P = 0.030\ 2 < 0.1$),回归模型的决定系数为 $R^2 = 0.990\ 4$,决定系数越接近 1,说明回归方程的拟合度越好。模型的校正决定系数为 0.955 1,可以较好地解释模型的变化。噪音信号比率为 5.534,它的值通常应大于 4,说明这个模型能合适地反映试验结果,因此可用此模型进行分析。

表 3 回归方程系数显著性检验

Tab. 3 Significance test of regression coefficients						
参数	系数估计值	自由度	标准误差	95% 信	95% 置	P 值
				度区间	信度区	
				低端值	间高端值	
常数项	6.38	1	0.21	5.93	6.82	
X_1	-0.24	1	0.13	-0.52	0.042	0.089 7
X_2	-0.19	1	0.13	-0.47	0.088	0.163 0
X_3	0.14	1	0.12	-0.13	0.40	0.280 7
X_4	0.16	1	0.13	-0.12	0.45	0.230 9
X_1X_2	-0.12	1	0.21	-0.58	0.34	0.583 4
X_1X_3	0.17	1	0.21	-0.27	0.61	0.433 9
X_1X_4	-0.018	1	0.21	-0.47	0.44	0.932 4
X_2X_3	0.36	1	0.21	-0.082	0.80	0.102 8
X_2X_4	-0.21	1	0.21	-0.67	0.24	0.337 4
X_3X_4	-0.10	1	0.21	-0.54	0.34	0.618 5
X_1^2	-0.82	1	0.17	-1.18	-0.46	0.000 2
X_2^2	-0.27	1	0.17	-0.62	0.093	0.134 2
X_3^2	-0.32	1	0.19	-0.73	0.096	0.121 0
X_4^2	-0.46	1	0.17	-0.82	-0.10	0.015 0

表 4 回归方程的方差分析

Tab. 4 Variance analysis of regression equation					
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	7.20	14	0.51	2.84	0.030 2
残差	2.53	14	0.18		
失拟项	2.53	10	0.25		<0.000 1
纯误差	2.935×10^{-3}	4	7.33×10^{-4}		
总差	9.73	28			
相关系数	0.990 4				
校正决定系数	0.955 1				

利用 Design Expert 软件对表 2 数据进行二次多元回归拟合,所得到的二次回归方程的响应面见图 6。

由图 6 可知,当超声频率为 23 kHz,超声功率为 25 W,酶解温度不变时,随着超声时间的增加,酶活先增后降;超声时间不变时,随着酶解温度的增大,酶活也是先增后降。由初步回归方程和响应面可以看出,变化速率显示温度的主效应大于超声时间,且呈现二次曲线关系。

当超声时间为 20 min,超声功率为 25 W,酶解温度不变时,随着超声频率的增加,酶活先增后降;超声频率不变时,随着酶解温度的增大,酶活也是先增后降。由响应面可以看出,温度的主效应大于超声频率,且呈现二次曲线关系。

当超声时间为 20 min,超声频率为 23 kHz,酶解温度不变时,随着超声功率的增加,酶活先增后降;超声功率不变时,随着酶解温度的增大,酶活也是先增后降。由响应面可以看出,温度的主效应大于超

声功率,且呈现二次曲线关系。

当酶解温度为 60°C , 超声功率为 25 W , 超声时间不变时, 随着超声频率的增加, 酶活先增后降;

超声频率不变时, 随着超声时间的增大, 酶活也是先增后降。由响应面可以看出, 超声时间的主效应大于超声频率, 且呈现二次曲线关系。

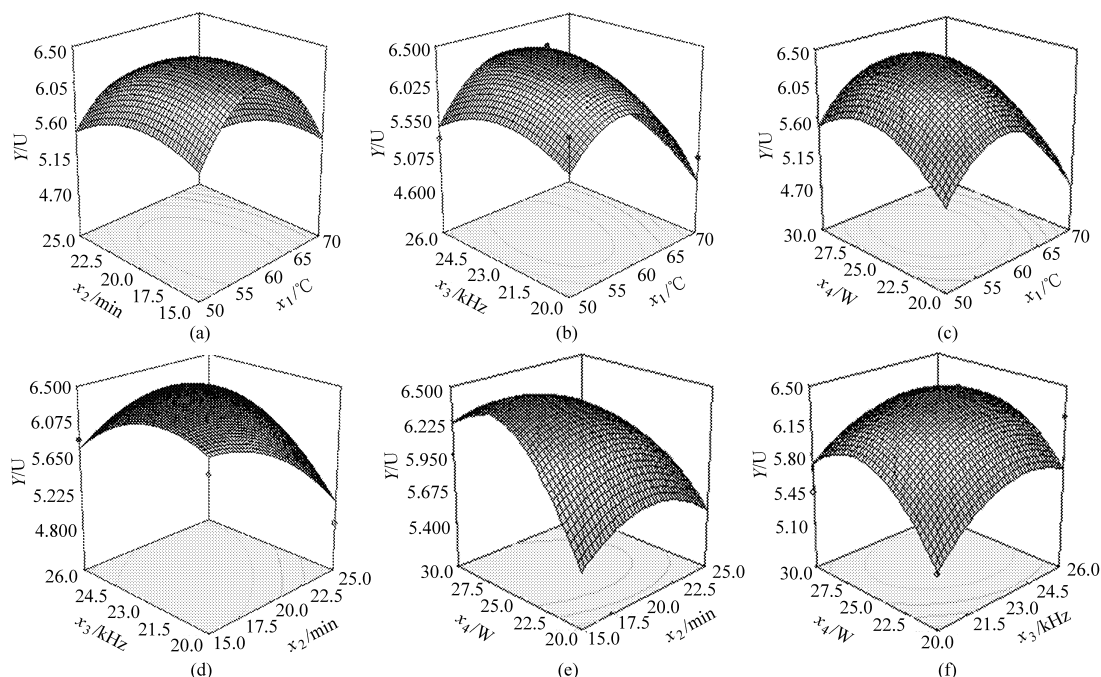


图6 交互项对固定化酶活性影响的响应面

Fig. 6 Response surface of the effect of interaction term on the activity of immobilized cellulase

当酶解温度为 60°C , 超声频率为 23 kHz , 超声时间不变时, 随着超声功率的增加, 酶活先增后降; 超声功率不变时, 随着超声时间的增大, 酶活也是先增后降。由响应面可以看出, 超声功率的主效应大于超声时间, 且呈现二次曲线关系。

当酶解温度为 60°C , 超声时间为 20 min , 超声频率不变时, 随着超声功率的增加, 酶活先增后降; 超声功率不变时, 随着超声频率的增大, 酶活也是先增后降。由响应面可以看出, 超声功率的主效应大于超声频率, 且呈现二次曲线关系。

2.3 结果与讨论

通过响应面回归方程, 经 Design Expert 软件分析, 可以得出模型最佳条件参数: 温度 58.73°C , 超声时间 16.88 min , 超声频率 22.33 kHz , 超声功率 26.77 W , 在此参数下酶活为 6.46 U , 比不加超声时的酶活 (5.83 U) 提高了 9.75% 。

经试验证明, 在最佳条件下处理的固定化纤维素酶经过 5 次重复利用后, 酶的活性降低为 4.24 U ,

酶活保存率为 65.63% ; 而不加任何处理的固定化纤维素酶经过 5 次重复利用后, 酶的活性下降为 2.96 U , 酶活保存率为 50.77% 。由上述数据说明超声预处理固定化纤维素酶后, 不但酶活有所提高, 多次利用后的酶活保存率也显著提高。这可能是由于超声波改变了固定化纤维素酶的空间结构, 增大了表面积, 使反应时与底物的接触面积增大。

3 结论

(1) 通过单因素试验研究了超声波预处理条件 (超声时间、超声频率、超声功率) 以及预处理后的酶解温度和 $\text{CMC}-\text{Na}$ 缓冲液 pH 值对固定化纤维素酶活性的影响。

(2) 对单因素试验结果进行优化, 通过软件 Design Expert 7.0 分析, 得出模型最佳条件: 温度 58.73°C , 超声时间 16.88 min , 超声频率 22.33 kHz , 超声功率 26.77 W , 在此参数下酶活为 6.46 U , 比不加超声时的酶活 (5.83 U) 提高了 9.75% 。

参考文献

- 杨淑惠. 植物纤维化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 80 ~ 130.
- 詹怀宇. 纤维化学与物理[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 172 ~ 279.
- Masahisa Wada, Masakazu Ike, Ken Tokuyasu. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form [J]. Polymer Degradation and Stability, 2010, 95(4): 543 ~ 548.
- Kuo Chia-Hung, Lee Cheng-Kang. Enhancement of enzymatic saccharification of cellulose by cellulose dissolution

- pretreatments [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 77(1):41 ~ 46.
- 5 王伟东,崔宗均,牛俊玲,等. 一组木质纤维素分解菌复合系的筛选及培养条件对分解活性的影响[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(5): 7 ~ 11.
Wang Weidong, Cui Zongjun, Niu Junling, et al. Construction of a composite microbial system of lignocellulose degrading and effect of cultural condition on the system capability [J]. Journal of China Agricultural University, 2004, 9(5): 7 ~ 11. (in Chinese)
- 6 刘海洲,张媛媛,张广柱,等. 固定化酶制备技术的研究进展[J]. 化学工业与工程技术,2009,30(1):21 ~ 23.
Liu Haizhou, Zhang Yuanyuan, Zhang Guangzhu, et al. Research progress on preparative technique of immobilized enzyme [J]. Journal of Chemical Industry & Engineering, 2009, 30(1): 21 ~ 23. (in Chinese)
- 7 肖琼,姚春才,勇强,等. 玉米秸秆超声辅助酶水解[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2007,31(4):85 ~ 88.
Xiao Qiong, Yao Chuncai, Yong Qiang, et al. Study on ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of corn stover [J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2007,31(4): 85 ~ 88. (in Chinese)
- 8 杨国营,郝振芳,秦玫,等. 天然高分子材料壳聚糖固定化纤维素酶的研究[J]. 河北师范大学学报:自然科学版,2004, 28(4):386 ~ 389.
Yang Guoying, Hao Zhenfang, Qin Mei, et al. Studies on cellulases enzyme fixed on chitosan of natural polymer [J]. Journal of Hebei Normal University: Natural Sciences Edition, 2004, 28(4): 386 ~ 389. (in Chinese)
- 9 陈盛,黄智跃,刘艳如. 壳聚糖固定化纤维素酶的研究[J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(3):250 ~ 254.
Chen Sheng, Huang Zhiyue, Liu Yanru. Study on chitosan-immobilized cellulose [J]. Prog. Biochem. Biophys., 1996, 23(3): 250 ~ 254. (in Chinese)
- 10 Ayse Dincer, Azmi Telefoncu. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,2007, 45(1 ~ 2):10 ~ 14.
- 11 贾俊强,马海乐,赵伟瑞,等. 超声波处理对小麦胚芽球蛋白理化和功能性质的影响[J]. 农业机械学报,2009,40(8): 55 ~ 59.
Jia Junqiang, Ma Haile, Zhao Weirui, et al. Effect of ultrasound treatment on physicochemical and functional properties of wheat germ globulin [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(8): 55 ~ 59. (in Chinese)
- 12 Rajesh Singh, Rajender Kumar, Kiran Bishnoi. Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of aspergillus heteromorphus using response surface methodology [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 48(1):28 ~ 35.
- 13 马海乐,耿静静,骆琳,等. 超声波预处理对燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽的影响[J]. 农业机械学报,2010,41(9):133 ~ 137.
Ma Haile, Geng Jingjing, Luo Lin, et al. Effect of oat-seed protein pretreatment by ultrasonic on preparation of ACE inhibitory peptides[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(9): 133 ~ 137. (in Chinese)

(上接第 130 页)

- 18 李文华. 缓冲包装的振动传递率[J]. 包装工程, 1992, 13(1): 12 ~ 15.
Li Wenhua. Vibration transmissibility of cushioning packaging [J]. Packaging Engineering, 1992, 13(1): 12 ~ 15. (in Chinese)
- 19 GB/T 4857.5—1992 包装 运输包装件基本试验 跌落试验方法[S].
GB/T 4857.5—1992 Packaging-tests for transport package, vertical impact test method by dropping [S]. (in Chinese)