

文章编号 :1009-038X(2003)03-0026-06

Rhizopus chinensis 12[#] 发酵产生纤溶酶的分离提纯

刘晓兰^{1,2}, 杜连祥¹, 路福平¹, 凌洪博²

(1. 天津科技大学 天津 300222 ; 2. 齐齐哈尔大学 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要 :分离自南方小酒药的华根霉 12[#](*Rhizopus chinensis* 12[#])以豆粕和麸皮为原料固体发酵可产生多种纤溶活性组分. 采用饱和度 40%~70% 的硫酸铵溶液分步盐析、Octyl Sepharose Fast Flow 疏水层析、Q-Sepharose High Performance 离子交换层析和 Sephacryl S-100 凝胶层析方法对活性组分进行分离提纯,得到电泳纯的纤溶酶. SDS-PAGE 方法测定该酶相对分子质量为 18 000,凝胶过滤方法测定相对分子质量为 16 600,表明该酶由单亚基组成.

关键词 :根霉 ; 发酵 ; 纤溶酶 ; 分离提纯

中图分类号 :O 652.63

文献标识码 :A

Purification and Partial Characteristics of Fibrinolytic Enzyme I Produced from *Rhizopus chinensis* 12[#]

LIU Xiao-lan^{1,2}, DU Lian-xiang¹, LU Fu-ping¹, LING Hong-bo²

(1. Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China; 2. Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract : As a therapeutic agent in thrombosis, the fibrinolytic enzymes are of interest and the works searching for new enzymes have been continuing. Several fibrinolytic components were produced by solid state cultivation on wheat bran and bean residues of *Rhizopus chinensis* 12[#], which was screened from the yeast for brewing rice wine of China south. Fibrinolytic enzyme was purified from solid state culture by extracted with water, concentrated with 40%~70% saturation ammonium sulphate, Octyl Sepharose Fast Flow hydrophobic interaction, Q-Sepharose High Performance ion exchange and Sephacryl S-100 gel filtration chromatographies. The molecular weight was determined as 18 000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and as 16 600 by gel filtration chromatography, which revealed the monomeric form of the enzyme.

Key words : *Rhizopus chinensis*; fermentation; fibrinolytic enzyme; purification

纤溶酶中血纤维蛋白是溶解血栓的主要成分,是纤溶酶研究开发,一方面,对组织型纤溶酶原激活剂类进行改造,以提高其特异性和溶栓效果;另一方面,从不同生物体中寻找新型溶栓剂.微生物是获得溶栓剂的一个重要来源,除早期发现的溶血

链球菌产链激酶和金黄色葡萄球菌产葡激酶外,又从枯草杆菌^[1,2]、链霉菌^[3,4]、白色假丝酵母^[5]、镰孢菌^[6]发酵物中分离出纤溶酶.华根霉 12[#](*Rhizopus chinensis*)是从南方小酒药中分离的,研究发现该菌株以豆类和麸皮为原料发酵可产生多

收稿日期 2003-02-20; 修回日期 2003-03-18.

基金项目 天津市自然科学基金项目(No023803411)资助课题;黑龙江省自然科学基金项目(No D0228)资助课题.

作者简介 刘晓兰(1962-),女,辽宁昌图人,教授,工学博士.

种纤溶酶。粗酶在体外可以将兔的人工血栓溶解,粗酶肠溶剂毒理实验经天津医科大学证明为无毒物质,口服安全,溶栓效果良好,有望开发为新型溶栓剂。作者首次对华根霉产生的纤溶活性组分进行了分离提纯。

生物产物的分离和纯化是生物技术中最重要、核心内容。由于生物活性物质性质和用途的特殊性,增加了分离提取的难度和复杂性,使分离在生物技术中的地位愈显重要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基 华根霉 12[#](*Rhizopus chinensis*)由天津科技大学应用微生物教研室分离自南方小酒药。保存于斜面培养基^[7]。固体发酵培养基为麸皮 6.5 g,豆粕 13.5 g,水 15 mL(含 0.21 g (NH₄)₂SO₄ 和 0.04 g MnSO₄) ,pH 自然。

1.1.2 试剂和色谱预装柱 牛血纤维蛋白原:Sigma 公司产品;凝血酶:中国医学科学院天津血液研究所产品;尿激酶:南京大学制药厂产品;HIC Test kit、Octyl Sepharose Fast Flow、Q-Sepharose High Performance 16/10 预装柱、Sephacryl S-100 16/60 预装柱均为 Pharmacia 产品;其他试剂均为进口或国产生化或分析纯试剂。

1.1.3 仪器 离子交换和凝胶层析色谱分析用 Spectra P2000 HPLC 系统。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 斜面培养方法:保存菌种接入斜面培养基,28℃恒温培养 5 d。

固体发酵方法 将斜面上的孢子洗入装有玻璃珠的无菌生理盐水中,震荡,计数。按一定的接种量将孢子悬液接入灭菌的固体发酵培养基中,震荡,28℃恒温培养,定时震荡。

1.2.2 纤溶酶活力的测定 参考 Astrup 和 Mullertz 方法^[8],用尿激酶标准品作纤溶酶活性标准曲线,37℃保温时间为 6 h,标准曲线采用指数回归,回归方程为 $Y=0.1052e^{4.013X}$, $R^2=0.9965$ 。式中 Y 为酶活力(U/mL), X 为溶圈直径(cm)。

1.2.3 纤溶酶的分离纯化 酶的浸提和盐析:根霉固体曲每克加无菌生理盐水 5 mL 浸提 4 h,4 500 r/min 离心 20 min。取上清液 9 份加硫酸铵分别至 20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,100% 饱和度,4℃静置过夜,6 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,沉淀用一定量生理盐水溶解,立刻测定各管溶液纤溶活性和蛋白质质量浓度,绘制硫

酸铵盐析曲线。根据盐析曲线进行 40%~70% 饱和度和硫酸铵分步盐析制得粗酶沉淀。

疏水层析: HIC Test kit 和 Octyl Sepharose 4 F. (3.5 cm×10 cm) 凝胶先用含 30% 饱和度硫酸铵的 0.02 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.6) 缓冲溶液平衡,将纤溶酶粗酶液调整为 30% 硫酸铵饱和度,经 10 000 g 离心 10 min 后上样,用含 30%~0% 硫酸铵饱和度的 0.02 mol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲溶液梯度洗脱,体积流量为 2 mL/min,逐管收集,每管 10 mL,检测 A_{280nm} 和纤溶酶活力,收集活性峰,透析脱盐或用 Sephadex G-25(2.5 cm×30 cm) 凝胶过滤脱盐,冻干备用。

离子交换层析: Q-Sepharose High Performance 16/10 预装柱(Spectra System P2000 HPLC)和疏水层析得到的活性组分用 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液平衡,样品 10 000 g 离心 10 min,上样后用相同的缓冲液先洗脱未吸附的蛋白质,再用含 0~1 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液梯度洗脱,体积流量 1 mL/min,紫外检测器在线检测 A_{280nm},自动部份收集器定时收集 1 mL/min,测定各管纤溶活性并收集活性组分,PEG10 000 浓缩备用。

凝胶层析: Sephacryl S-100HR(16/60) 预装柱(Spectra System P2000 HPLC)和离子交换得到的活性组分先用 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.6) (含 0.15 mol/L NaCl) 缓冲液平衡,样品 10 000 g 离心 10 min,上样后用相同的缓冲液以 0.5 mL/min 的速度洗脱,紫外检测器在线检测 A_{280nm},收集活性峰。

1.2.4 纤溶酶纯度的检验 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(12 g/dL)。

1.2.5 纤溶酶相对分子质量测定 SDS-PAGE 法^[9,10],用紫外凝胶成相系统分析。

凝胶层析法^[11]:色谱柱为 Sephacryl S-100 16/60 预装柱;标准蛋白质相对分子质量为兔磷酸化酶 B(97 400),牛血清白蛋白(67 000),卵清蛋白(43 000),胰凝乳蛋白酶原 A(25 000),核糖核酸酶 A(13 000)。用蓝色葡聚糖 2 000 测定色谱柱外水体积 V₀。

1.2.6 蛋白质质量浓度测定 紫外分光光度法,用快速核酸蛋白分析仪 Gene Spec I 测定计算^[10]。

2 结果与讨论

2.1 粗酶浸提液的性质

华根霉 12[#] 固体发酵采用豆粕为主要原料,加适量麸皮作碳源并起到疏松物料以利通风的作用。

固体发酵结束后进行酶液的浸提,在浸提过程中,产生的纤溶酶和其他酶类以及多种可溶性物质一同进入浸提液中.通过浸提液的多种聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,发现浸提液中有几十种蛋白质,且酸性蛋白质居多.进一步对酶浸提液进行加底物血纤维蛋白的聚丙烯酰胺凝胶活性电泳,结果表明,华根霉 12[#]以豆粕为原料的固体发酵产生至少两种纤溶活性组分.此外固体发酵浸提液含有大量的色素物质.这些因素给纤溶酶的分离提纯增加了难度.

2.2 硫酸铵分级盐析

华根霉固体发酵浸提液的盐析曲线见图 1.当硫酸铵饱和度小于 40% 时,纤溶酶不形成沉淀;40%~70% 饱和度范围时,纤溶酶的沉淀量随硫酸铵饱和度增加而增加;当硫酸铵饱和度达到 70% 时,纤溶酶沉淀量不再增加.考虑用 40% 饱和度硫酸铵沉淀去除杂蛋白,再用 70% 以上饱和度硫酸铵对上清盐析沉淀纤溶酶.由于高质量浓度样品盐析存在共沉淀的问题,因此,需考虑用 40% 饱和度硫酸铵去杂蛋白后,再用分级盐析试验来确定最适的硫酸铵分级盐析饱和度.硫酸铵分级盐析结果见表 1.

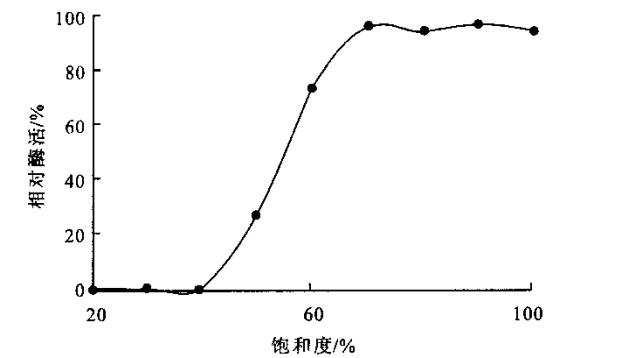


图 1 硫酸铵盐析曲线

Fig.1 Curve of ammonium sulfate salting-out

表 1 发酵浸提液的硫酸铵分级盐析结果

Tab.1 Results of ammonium sulfate treatment

硫酸铵处理	蛋白质质量浓度/(mg/mL)	酶活/(U/mL)	比活力/(U/mg)	收率/%	倍数
粗提	66.30	160.0	2.4	—	—
40%~70% (NH ₄) ₂ SO ₄	12.00	158.0	13.2	98.8	5.5
40%~80% (NH ₄) ₂ SO ₄	13.50	156.0	11.6	97.8	4.8
40%~90% (NH ₄) ₂ SO ₄	10.68	149.0	10.8	93.4	4.5
40%~100% (NH ₄) ₂ SO ₄	12.65	147.0	9.1	91.9	3.7

万方数据

由表 1 知,发酵浸提液用 40%~70% 饱和度硫酸铵盐析时效果最好,此时活力回收率达到 98.8%.增大硫酸铵后其活力回收率反而减小,可能是沉淀中高硫酸铵盐质量浓度对纤溶酶活性有抑制作用,从而使沉淀的表观纤溶活性变小.硫酸铵饱和度增大后,沉淀的杂蛋白相对增加,反而不利于后面阶段的纤溶酶的纯化.因此选用 40%~70% 饱和度硫酸铵对发酵浸提液进行盐析.

2.3 疏水性层析

2.3.1 疏水层析固定相的选择 亲水性蛋白质总有一些疏水性基团或极性基团的疏水部位暴露在蛋白质表面.这部分疏水基团可与亲水性固定相表面偶联的弱疏水基发生弱疏水性相互作用,被疏水性吸附剂所吸附,蛋白质在疏水吸附剂上的分配系数随流动相离子强度的提高而增大,据此可进行蛋白质的分离.蛋白质的疏水性与其电荷性质相比复杂得多,与吸附剂的配基结构和修饰密度以及流动相的组成等因素有关.采用疏水相互作用层析试剂盒的 1 mL 小柱进行试验,小柱的疏水配基分别为高取代度和低取代度的苯基、正丁烷基和正辛烷基.结果表明,采用正辛烷基为配基时,纤溶酶分离效果最好.

2.3.2 Octyl-Sepharose FF 疏水性层析 经分步盐析得到的粗酶液进行疏水相互作用层析,层析曲线见图 2.结果表明,华根霉固体发酵产生至少两个纤溶活性组分,先洗脱组分的纤溶活性大,第二个组分的纤溶活性稍小.对第一个活性组分进一步进行分离提纯.

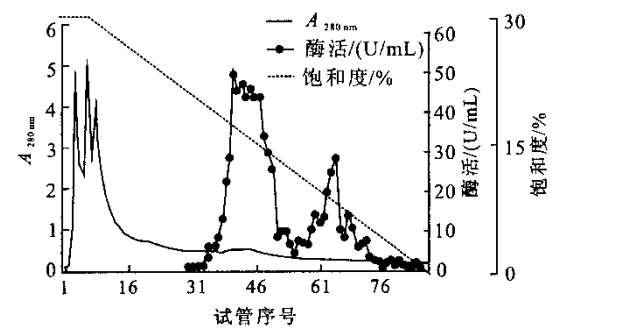


图 2 Octyl-Sepharose FF 疏水层析洗脱曲线

Fig.2 HIC on Octyl-sepharose FF chromatograpy

从疏水作用色谱分离纤溶酶的作用结果来看(见表 2),华根霉纤溶酶活性回收率较高,酶比活力提高较大.而且值得提出的是,酶浸提液中的绝大部分色素物质具有较强的疏水性,上样后与疏水层析介质较牢固的吸附,在进行 30%~0% 饱和度的梯度洗脱时不随洗脱液流出,而在用无盐的去离子

水清洗层析柱时又基本能全部洗出,这就首先解决了色素与酶的分​​离这一难题,又保证了疏水层析柱的易再生性,同时避免了色素物质污染下一步的离子交换层析介质.分级盐析后样品直接进行疏水层析,样品处理量大,还省去了脱盐的步骤,简化了操作程序,提高了纯化工作效率,操作容易放大.因此,选择 Octyl-Sepharose FF 疏水层析进行华根霉产生纤溶酶提纯的第一步操作比较合适.

表 2 华根霉纤溶酶纯化结果

Tab.2 Purification table for fibrinolytic enzyme of *Rhizopus chinensis*

提取过程	总蛋白质质量/(mg)	总活力/U	收率/%	相对酶活/(U/mg)	纯化倍数
粗提	66 300	160 000	100	2.4	1
40%~70% (NH ₄) ₂ SO ₄	12 000	158 080	98.8	13.2	5.5
Octyl-Sepharose FF	1 810	100 480	62.8	55.5	23.1
Q-Sepharose HP	182	75 840	47.4	416.7	173.6
Sephacryl S-100	31.8	68 160	42.6	2143.4	893.1

2.4 离子交换层析

经疏水层析得到的活性组分,首先用 DEAE-Sepharose FF 小柱(1.0 cm×10 cm,初始洗脱液为 pH 7.6 Tris-HCl,梯度洗脱用 pH 7.6 Tris-HCl 含 0~1 mol/L NaCl)进行实验,发现样品中的纤溶活性组分没被吸附或吸附很弱,提示目标纤溶酶可能是碱性蛋白质,同时发现较多的杂蛋白能被吸附.再选用 Q-Sepharose High Performance 离子交换预装柱进行层析,提高操作时缓冲液的 pH 值到 8.2,层析结果见图 3.

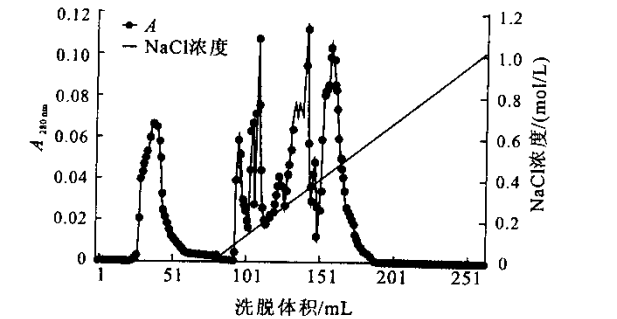


图 3 Q-Sepharose High Performance 离子交换洗脱曲线

Fig.3 Q-Sepharose High Performance ion exchange chromatograph

由图 3 可看出,活性组分在进行 NaCl 浓度梯度洗脱之前即被起始缓冲液洗脱下来,说明活性组

分未被离子交换层析固定相吸附或吸附非常弱.因选择的层析固定相为强阴离子交换介质,且洗脱缓冲液 pH 8.2,提示目标纤溶酶是一种等电点高于 8.2 的碱性蛋白质.这与以往文献描述的多数根霉产酸性蛋白酶不同^[12].实验结果还表明,经疏水层析后样品中含有多种等电点小于 8.2 的杂蛋白,被离子交换固定相吸附,和目标纤溶酶一起得到分离.经过阴离子交换柱后,样品得到进一步的纯化和浓缩,其活性回收和纯化倍数计算结果见表 2.

将离子交换层析放在根霉纤溶酶提纯第二部的优点在于避免粗酶液中的色素物质对离子交换层析介质的污染.色素物质带电性质复杂,实验中发现色素物质一旦吸附到离子交换介质上,即使使用强的酸碱也很难使介质完全再生,这样就会减小离子交换介质的交换容量,缩短介质的使用寿命.

2.5 凝胶层析

与疏水相互作用层析和离子交换层析相比,凝胶层析的特点是上样量小,而且样品中不能有太多的待分离组分,否则会严重影响分离效果.纤溶酶粗酶液经过分级盐析、疏水层析和离子交换层析后,已经除去了大部分杂蛋白.样品经聚丙烯酰胺电泳检测,结果表明,样品中只剩下 4~5 种含量较高的蛋白质,可以采用凝胶层析的方法进行最后的分离.为保证分离效果,应尽量采用颗粒细小均匀、分离度高的层析介质.图 4 是进行 Sephacryl S-100 预装柱凝胶层析的洗脱曲线.

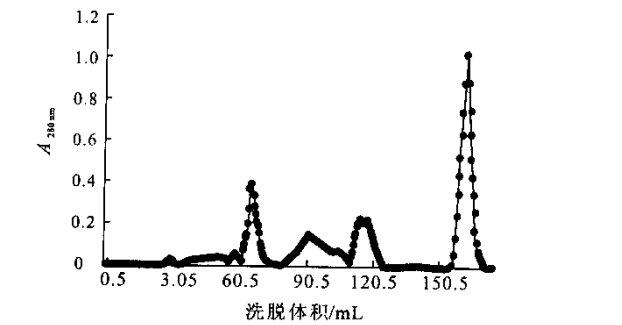


图 4 Sephacryl S-100 凝胶过滤洗脱曲线

Fig.4 Sephacryl S-100 gel filtration chromatograpy

经纤溶活性检测,洗脱峰 1 为活性组分.由洗脱曲线可知,Sephacryl S-100 凝胶过滤对样品进行分离时,洗脱峰 1(活性组分)峰形对称,基线近零,表明用其对 Q-Sepharose 离子交换后样品进行最后的分离纯化时,效果较好.

2.6 华根霉纤溶酶纯度的电泳鉴定及纯化回收

对 Sephacryl S-100 层析后的活性组分进行浓缩,用碱性系统(7.5 g/dL 和 12 g/dL)和酸性系统(7.5 g/dL 和 12 g/dL)的聚丙烯酰胺凝胶电泳

(PAGE)进一步鉴定其纯度.结果在不同条件下的常规不连续系统PAGE都呈现单一条带.通过对华根霉发酵浸提液作各步纯化处理,1 000 mL浸提液的酶活力回收率和纯化倍数见表2.

2.7 纤溶酶的相对分子质量测定

2.7.1 SDS-PAGE 方法测定 经 Sephacryl S-100 凝胶过滤后样品冻干后,用 SDS-PAGE 测定其相对分子质量.电泳结果见图5.结果显示,华根霉纤溶酶分子可能由相对分子质量相同的1个或几个蛋白质亚基组成.凝胶成像系统 Labworks 软件分析亚基相对分子质量约为18 000. SDS-PAGE 结果还支持了凝胶过滤后样品均一的结论.

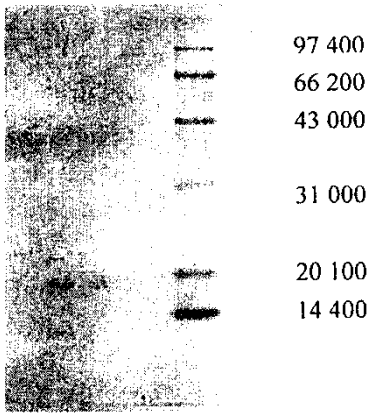


图 5 根霉纤溶酶的 SDS-PAGE 结果

Fig.5 SDS-PAGE analysis of fibrinolytic enzyme

2.7.2 凝胶过滤法纤溶酶相对分子质量测定 做标准蛋白质相对分子质量对数($\lg M_r$)与可用分配系数(K_{av})关系标准曲线. $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$. Sephacryl S-100 凝胶柱的外水体积 V_o . 用蓝色葡聚糖 2 000 上样洗脱测定,因为蓝色葡聚糖 2 000 在 Sephacryl S-100 色谱柱上被完全排阻,因此其洗脱体积(V_e)相当于色谱柱外水体积.测得 V_o 为 30.6 mL,柱床总体积 V_t 为 120.5 mL. 相同条件下测定各相对分子质量标准的洗脱体积(V_e),重复 2 次,求平均值.计算相应 K_{av} ,用 Excel 2 000 做 $\lg M_r$ 与 K_{av} 关系曲线如图6,得到回归方程 $\lg M_r = -1.9126K_{av} + 5.0626$, $R^2 = 0.9794$.

测定华根霉纤溶酶的洗脱体积为 70.1 mL,

$K_{av} = 0.4393$. 根据标准曲线或代入上述回归方程,求得纤溶酶相对分子质量对数 $\lg M_r = 4.2222$,进而求得纤溶酶相对分子质量约为 16 600.

实验中发现,Sephacryl S-100 在低盐质量浓度时对蛋白样品有非特异性吸附作用,因此柱子的平衡和洗脱液含盐浓度加大到 0.3 mol/L 时,实验效果良好.

凝胶过滤法测定华根霉纤溶酶相对分子质量(16 600)与 SDS-PAGE 测定的结果(18 000)接近,提示华根霉纤溶酶分子只由一个蛋白质亚基组成.与其他正在研究开发的微生物来源、动物来源的纤溶酶相比^[1~6],相对分子质量相对较小,免疫原性可能相对较小.

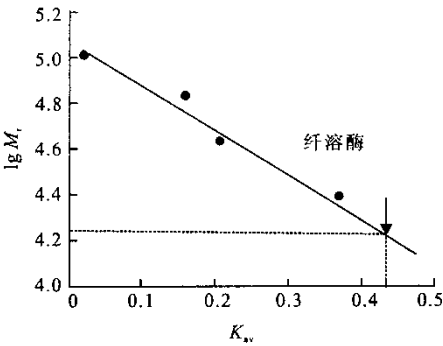


图 6 相对分子质量对数 ($\lg M_r$)与可用分配系数 (K_{av}) 关系

Fig. 6 Relation between $\lg M_r$ and K_{av} on Sephacryl S-100 16/60

3 结 论

采用疏水层析、离子交换层析和凝胶层析方法对活性组分进行分离提纯,效率较高.经分离提纯的华根霉纤溶酶比活力较高,是一种碱性蛋白酶,其等电点和最适溶纤作用 pH 值都位于碱性侧. SDS-PAGE 方法测定该酶相对分子质量为 18 000,凝胶过滤方法测定相对分子质量为 16 600,该酶由单亚基组成.从初步实验结果判断,该酶是一种新的纤溶酶.因此进一步开展酶学性质和相关生物医学领域研究,有望将其开发成一种新型的纤溶酶制剂.

参考文献：

[1] Fujita M, Nomura K, Hong K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme(Nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. Biochem Biophy Res Commun, 1993, 197(3):1340 - 1346.

[2] Kim S , Choi N. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus sp.* strain DJ-4 screened from Doen-Jang[J]. **Biosci Biotechnol Biochem** 2000 ,64(8) :1722 – 1725.

[3] Bono F , Savi P , Tuong A , *et al.* Purification and characterization of a novel protease from culture filtrates of a *Strptomyces sp.*[J]. **FEMS Microbiol Lett** , 1996 ,141 :213 – 222.

[4] Chitte R , Dey S. Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5[J]. **Lett Appl Microbiol** 2000 , 31 :405 – 410.

[5] Toshiaki N , Yoshiyuki O , Youichi H , *et al.* Isolation and characterization of fibrinogenase from *Candida albicans* NH-1[J]. **Int J Biochem** ,1993 , 25(12) :1815 – 1822.

[6] Su Tao , Liu Beihui , Li Peng , *et al.* New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum*[J]. **Proc Biochem** ,1998 , 33(4) :419 – 422.

[7] Lu F P , Wang M , Wang J L , *et al.* Optimization of thrombolysis enzyme production from *Rhizopus sp*[J]. **Amino Acids & Bi-otic Resouces** ,1997 ,19(2) :18 – 22.

[8] Astrup T , Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. **Arch Biochem Biophys** , 1952 , 40 :346 – 351.

[9] Guo X J. Protein Electrophoresis Laboratory Technology(蛋白质电泳实验技术) [M]. Beijing : Science Press , 1999

[10] He Z X , ZHANG S Z. Electrophoresis[M]. Beijing : Science Press , 1999.

[11] Li J W , Xiao N G , Yu R Y , *et al.* Principle and Method of Biochemistry Experiment[M]. Beijing : Beijing University Press , 1994.

[12] ZHANG S Z. Enzyme Preparation Industry[M]. Beijing : Science Press , 1984.

(责任编辑 杨 萌)

(上接第 20 页)

3 结 论

- 1) 以大蒜片的形式进行冻干可以获得较好的产品.
- 2) 采用酸浸泡的方法脱臭 , 既可以达到脱臭的

目的 , 也可以较好地保留 SOD 和大蒜素.

3) 最佳冷冻干燥过程 : 预冻至 - 35 ℃ , 加热板升到 60 ℃ 后保持 8. 5 h , 再降温到 40 ℃ 保持 4 ~ 5 h.

参考文献 :

[1] 孙君社 , 郑晖 , 周洋 , 等. 大蒜脱臭和无臭蒜汁的研究[J]. 食品科学 , 1995 ,16(2) :21 – 24.

[2] 罗平. 饮料分析与检验[M]. 北京 : 中国轻工业出版社 , 1992. 353 – 354.

[3] 张晋陆. 食品真空冷冻干燥工艺及其强化[J]. 广州食品工业科技 , 1998 ,14(2) :59 – 62.

[4] 吴大康 , 阴晓伟. 大蒜素稳定性的研究[J]. 食品科学 , 1997 ,18(5) :34 – 36.

[5] 余伯良 , 吴士业 , 穆芳. 不同脱臭方法对大蒜抗菌效力的影响[J]. 中国调味品 , 1998 (8) :8 – 10.

[6] 谢秀英 , 李建明 , 程远霞. 食品物料共晶共熔温度测试系统研制[J]. 洛阳工学院学报 , 1998 ,12(4) :12 – 15.

[7] 高福成 , 杨方琪 , 刘志胜. 冷冻干燥法生产优质大蒜粉的研究[J]. 无锡轻工大学学报 , 1994 ,13(3) :192 – 200.

[8] 张颜民 , 徐光 , 董建民. 食品真空冷冻干燥过程工艺参数分析[J]. 真空与低温 , 1999 ,5(3) :180 – 185.

(责任编辑 杨 勇)