

超高压体系下皱褶假丝酵母脂肪酶的水解特性

杜焕梅, 缪铭, 冯磊, 江波*, 张涛

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了压力、温度、pH、保压时间对脂肪酶活性的影响,并分析了酶的复原性,测定了不同温度和压力处理脂肪酶的动力学参数。结果表明,200 MPa 时脂肪酶酶活最高,是常压的 1.76 倍。200 MPa 时脂肪酶最适温度为 40 °C,最适 pH 值 7.5,最佳保压时间为 10 min。与常压相比,200 MPa 时,40 °C 时 K_m 值变化不大,50 °C 时 K_m 值有所增加,而 V_{max} 、 K_{cat} 、 K_{cat}/K_m 值随压力的升高而增大。

关键词: 超高压;脂肪酶;酶活;催化;动力学

中图分类号:Q 556 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2018)03—0256—06

Hydrolysis Characteristics of *Candida rugosa* Lipase under Ultra High Pressure System

DU Huanmei, MIAO Ming, FENG Biao, JIANG Bo*, ZHANG Tao

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The effects of pressure, temperature, pH and holding time on *Candida rugosa* lipase activity were studied and the recovery of the enzyme was analyzed. We also investigated the changes of kinetics parameters of lipase under different temperature and pressure. The results showed that lipase activity was the highest under 200 MPa and almost 1.76 times of atmospheric pressure. Under this pressure, the optimum temperature and pH for lipase were 40 °C and pH 7.5, respectively; the processing time was 10 min; the change of K_m at 40 °C is not as obvious as 50 °C; meanwhile the V_{max} , K_{cat} and K_{cat}/K_m increased significantly with the elevated pressure.

Keywords: ultra high pressure, lipase, enzyme activity, catalyze, kinetics

近年来,消费者对食品质量的要求越来越高,超高压技术作为一种替代热处理的加工新技术,因其能够更好的保持食品的风味和营养成分越来越受到人们的关注,同时在酶学领域,超高压技术也倍受瞩目。压力作为一项重要的热力学参数,同温

度、pH 等影响因素一样,对调节酶催化行为起着至关重要的作用^[1]。起初这项技术只是应用于钝化内源酶,以改善其口感以及延长货架期^[2],例如多酚氧化酶^[3]、果胶甲酯酶^[4]、过氧化物酶等,但是近几年有学者发现它可以作为一种稳定、激活酶的工具^[5],这

收稿日期:2015-11-03

基金项目:国家 863 计划项目(2013AA102102)。

* 通信作者:江波(1962—),男,江苏无锡人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品化学及应用酶技术方面的研究。

E-mail:bjiang@jiangnan.edu.cn

引用本文:杜焕梅,缪铭,冯磊,等.超高压体系下皱褶假丝酵母脂肪酶的水解特性[J].食品与生物技术学报,2018,37(03):256-261.

一发现使超高压技术成为国内外研究的热点^[6]。刘苗等报道了在 200 MPa, 80 °C 下, IFTase 催化水解菊糖的转化率较 0.1 MPa, 60 °C 的转化率提高了 1 倍多^[7]。与此同时, 有文章指出, 脂肪酶在适宜压力处理下, 也有酶活增高、稳定性增强的现象^[8]。

脂肪酶(Lipase, EC.3.1.1.3)结构独特, 可以在水相溶液中催化三酰甘油酯和水不溶性酯的水解, 也可在有机溶剂中催化转酯化、酯合成反应, 因此其在工业领域有着广泛的应用, 例如食品风味物质及医药产品的生产、羧酸酯的合成、乳制品的加工等^[9-11]。另外, 脂肪酶还具有立体选择性、底物专一性、反应条件温和等优点。

虽然随着现代生物技术的发展, 已有酶学技术可以在分子层面上改善酶活, 但是超高压技术改善酶活有其独特的优势, 压力处理仅使酶的体积发生改变, 影响因素较单一, 更有利于对酶的催化特性进行研究。有学者发现, 脂肪酶在常压下不能催化一些重要反应, 但在高压下能顺利进行^[12]。目前有关超高压加工技术对皱褶假丝酵母脂肪酶催化特性和动力学参数的影响的研究还比较少。作者旨在从宏观上改善体系反应条件, 探讨超高压加工技术对催化活性的影响, 研究超高压处理水解反应的动力学参数的变化, 为皱褶假丝酵母脂肪酶的工业应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂 脂肪酶(EC3.1.1.3): 别名三酰基甘油脂肪酶, 来源于 *Candida rugosa* lipase type VII, 购自 Sigma 公司, 酶活 ≥ 700 U/mg; 对硝基苯酚棕榈酸酯(p-NPP)及对硝基苯酚(p-NP)标准品: 购自 Sigma 公司; 二甲亚砜、Triton-X 100、阿拉伯树胶粉等其他相关试剂: 分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器设备 MICRO FOODLAB FPG5740 超高压仪器: 英国 Stansted Fluid Power 公司; HAAKE SC 100 循环水浴: 美国 Thermo Scientific 公司; EWS30 空压机: 浙江永源机电制造有限公司; DK-8D 电热恒温水槽: 上海森信实验仪器有限公司; UV-2102PC 紫外-可见分光光度计: 上海尤尼柯仪器有限公司; Delta 320s pH 计: 梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酶水解酶活的测定 吸光度法测定脂肪酶活力^[13-15]。

溶液 A: 对硝基苯酚棕榈酸酯(p-NPP)溶于二甲亚砜, 3 mg/mL; 溶液 B: 含 0.4 g/dL Triton-X 100 和 0.1 g/dL 阿拉伯树胶粉, pH 7.5, 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液。按照 A 液:B 液=1:9 的比例, 将 A 液缓慢加入 B 液中制成底物溶液, 现配现用。

取 2.8 mL 底物溶液, 40 °C 预热 3 min 后加入 200 μ L 酶液反应 10 min, 测定 OD₄₁₀ 值, 对照组加入灭活的酶液, 每个样品均测定 3 个平行样。脂肪酶国际单位 U 定义为: 在测定条件下, 单位时间内释放 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量。本研究中相对残余酶活为 A_t/A_0 , 其中 A_0 为 pH 7.5、温度 40 °C、处理时间 10 min 的常压酶活。

1.2.2 压力对脂肪酶活性的影响 称取脂肪酶 2 mg, 溶于 50 mmol/L, pH 7.5 的磷酸钠盐缓冲液, 在 40 °C, 0.1、100、150、200、250、300、400 MPa 下分别处理 10 min, 取出后根据 1.2.1 所述方法立即测定酶活。

1.2.3 温度对脂肪酶活力的影响 称取脂肪酶 2 mg, 溶于 50 mmol/L, pH 7.5 的磷酸钠盐缓冲液, 在 0.1 MPa 和 200 MPa, 35、40、45、55、65、70、80 °C 下分别处理 10 min, 取出后根据 1.2.1 所述方法立即测定酶活。

1.2.4 pH 对脂肪酶活力的影响 配制 50 mmol/L, pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 的磷酸钠盐缓冲液, 称取脂肪酶 2 mg, 分别溶于上述磷酸盐缓冲液, 在 40 °C、0.1 MPa 和 200 MPa 下处理 10 min, 取出后根据 1.2.1 所述方法立即测定酶活。

1.2.5 保压时间对脂肪酶活力的影响 称取脂肪酶 2 mg, 溶于 50 mmol/L, pH 7.5 的磷酸钠盐缓冲液, 在 40 °C, 0.1 MPa 和 200 MPa 下分别处理 5、10、15、30、60 min, 取出后根据 1.2.1 所述方法立即测定酶活。

1.2.6 压力处理后脂肪酶的回复性 称取脂肪酶 2 mg, 溶于 50 mmol/L, pH 7.5 的磷酸钠盐缓冲液, 在 40 °C、0.1 MPa 和 200 MPa 下处理 10 min, 取出后放置 0、0.5、1、2、4、6 h, 根据 1.2.1 所述方法立即测定酶活。

1.2.7 反应速率常数的确定 按照 1.2.1 所述方法, 测定反应 3、6、9、12、15、18、21、24 min 时的产物浓度, 绘制产物浓度对时间的曲线。反应速率常数

通过水解反应 2、4、6、8、10 min 时的产物浓度对时间的曲线线性回归得到。

1.2.8 动力学参数的确定 分别配制 0.2、0.4、0.6、1、2、3 mg/mL 的 p-NPP 溶液,在 40 °C 和 55 °C 下分别用 0.1 MPa 和 200 MPa 处理 10 min,按照 1.2.7 所述方法确定初始反应速率。表观米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 按照 Lineweaver-Burk 双倒数法线性得到。同时计算脂肪酶的转换数 K_{cat} 以及催化效率 K_{cat}/K_m 。

2 结果与分析

2.1 压力对脂肪酶活力的影响

压力是影响酶活的重要环境因素之一,从图 1 可以看出,在 40 °C 条件下,200 MPa 处理 10 min 的脂肪酶酶活最高,是常压的 1.76 倍。超过 200 MPa 时,随着压力的上升,酶活开始下降,500 MPa 处理后酶活已低于常压。从本研究的结果来看,超过一定压力酶会发生失活,而较低压力处理,如 200 MPa 能够提高酶活。

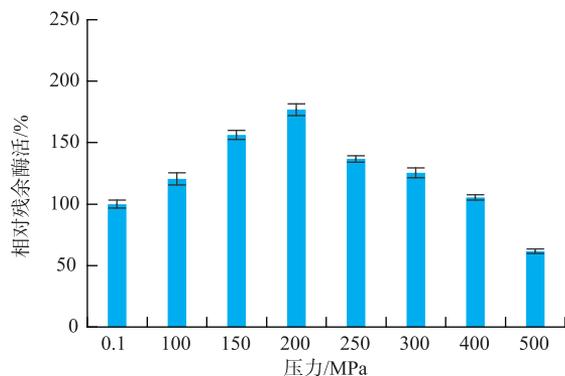


图 1 压力对脂肪酶活力的影响

Fig. 1 Effects of pressure on lipase activity

分析原因可能为,压力的处理对分子间或者分子内共价键的影响可能会导致酶活性中心位点更多的暴露出来(低压升高酶活)与底物更好的结合,或者使酶活性位点更隐蔽(高压抑制酶活)^[16],因此压力对酶活的影响表现为:在较低压力范围内压力的增加使酶活提高,而超过一定值酶活开始缓慢下降,更高的压力可能使酶失活。例如,当脂肪氧合酶在 200 MPa,55 °C 条件下处理 15 min 时,酶活可以提高 120%^[17]。利用 *Candida antarctica* lipase B 在合成乙酸异戊酯时,在 500 MPa 下其催化效率可提高 15 倍^[18]。

2.2 温度对脂肪酶活力的影响

图 2 显示的是温度对脂肪酶活力的影响,结果表明:200 MPa 处理时,40 °C 脂肪酶活性最高;而常压时,50 °C 脂肪酶活性最高。当温度高于最适值时,随着温度的继续升高,酶的催化活性开始下降。80 °C 时常压脂肪酶相对残余酶活仅为 10%,200 MPa 则为 34%。

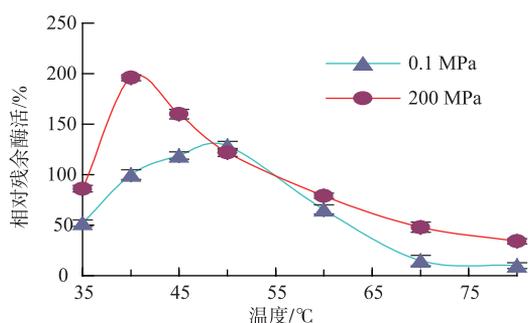


图 2 温度对脂肪酶活力的影响

Fig. 2 Effects of temperature on lipase activity

从实验结果来看,在 200 MPa 压力下,当温度小于 40 °C 时,酶活随温度的升高而增大,40 °C 时,压力和温度为底物分子积累了较多能量,脂肪酶活性中心被激活,酶活达到最大值;当温度大于 40 °C 时,维持酶活的共价键发生不利变化,酶活逐渐降低。张忠义等在 100 MPa 条件下处理胰脂肪酶的最适温度为 35 °C,比常压低 2 °C,有向低温区移动的趋势^[12]。同时,在高温区高压处理能使脂肪酶酶活下降较慢,其原因可能是:一方面在酶的变性温度下,适当提高压力可以保护酶的活性中心,从而减少酶的热失活;另一方面合适的压力可以加速反应进程。这两方面的综合作用使得脂肪酶在高压处理和较高温度下仍能保持较高的酶活。有研究表明,温度和压力对酶的影响存在着相反的效果,在不超过一定压力值的条件下,提升压力可以使酶在较高温度下热稳定性大幅度提高^[19]。

2.3 pH 对脂肪酶活力的影响

由图 3 可以看出,随着 pH 值的增加,酶活先上升后下降,常压条件下最适 pH 为 7.0,而 200 MPa 处理后最适 pH 值增大到 7.5,移动了 0.5 个单位。

分析其原因,一方面可能是超高压处理导致酶的几个重要氨基酸侧链基团的解离状态发生改变,对酶的结构产生影响,例如导致酶分子部分氨基酸裸露,最适 pH 值发生偏移。另一方面可能是因为超

高压处理会引起酶分子氨基酸侧链的移动,从而造成氨基酸之间非共价键的变化,而这些非共价键,包括静电相互作用、氢键、疏水相互作用,对维持酶活性中心部位结构、底物结合和转化有关键作用^[20-21]。有文献报道,高压可以增强氢键作用力^[22]。例如,胰凝乳蛋白酶,经超高压处理后可以改变其活性部位氨基酸的静电相互作用,从而改变酶活^[23]。

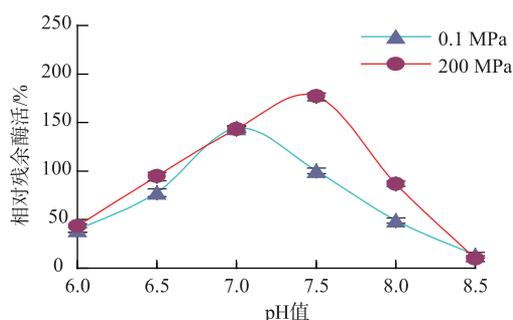


图3 pH值对脂肪酶活力的影响

Fig. 3 Effects of pH on lipase activity

2.4 保压时间对脂肪酶活力的影响

在超高压体系下,保压时间也是影响脂肪酶酶活的重要因素。由图4可以看出,经200 MPa处理10 min时,脂肪酶酶活最高。随着处理时间的延长,酶活逐渐降低,酶变性程度增大。

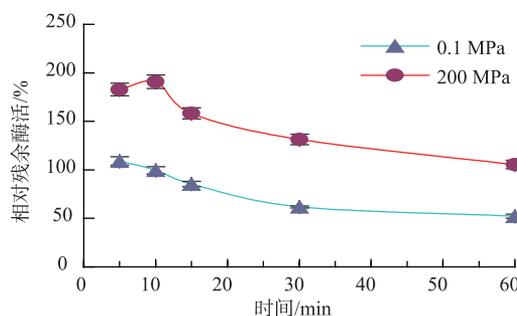


图4 保压时间对脂肪酶活力的影响

Fig. 4 Effects of pressure holding time on lipase activity

由实验结果可以推测,在一定压力条件下,酶的激活与保压时间有关,当时间小于10 min时,超高压处理并未使维持酶空间结构的价键发生解离,同时能量得到积累,因而使酶的结构更加紧凑,增强了酶的活性中心抗逆能力,使酶活提高;当处理时间超过10 min后,随着时间的延长,压力使维持酶活性中心的非共价键遭到破坏,比如发生解离等,因而酶活降低。张忠义等发现,110 MPa处理猪

胰脂肪酶,保压10 min时酶活最高,随着保压时间延长,酶活逐渐减低^[24]。

2.5 压力处理后脂肪酶的回复性

从图5可以看出,经过200 MPa或常压处理后,撤去压力在4℃下放置6 h,脂肪酶酶活均呈缓慢下降趋势,200 MPa时的酶活由176%下降到150%。原因可能是适当强度的压力会挤压酶结构但并不造成破坏,当压力撤去时,酶结构会发生部分恢复。在本研究中,脂肪酶在200 MPa时是激活状态,卸压后原来紧凑的结构有所舒展,发生轻微的不利于与底物结合的变化,从而导致酶活降低。已有研究表明,经较低压力处理后,酶活的变化是可逆的,酶活力的回复需要几个小时^[25]。

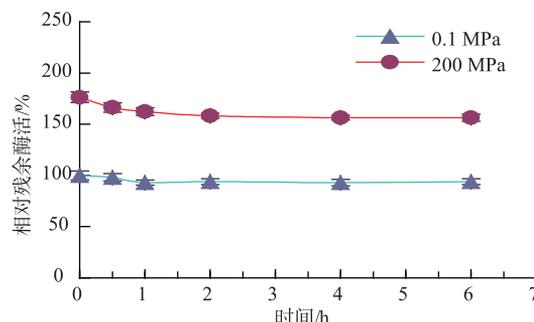


图5 压力处理后脂肪酶的回复性

Fig. 5 Reversibility of lipase after the treatment of HHP

2.6 水解反应进程曲线

由图6可知,产物浓度对时间的线性回归方程为 $y=0.0053x+0.0047$, $R^2=0.9983$ 。结果证明,该水解反应在0~25 min内符合零级反应动力学的规律,即反应速率与浓度无关,因此初始反应速率 V_0 可由产物浓度对时间的线性回归得到,亦即反应速率常数 k 。

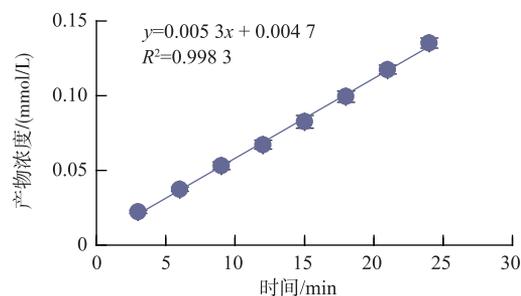


图6 水解反应进程曲线

Fig. 6 Hydrolysis reaction process curve

2.7 动力学参数的确定

脂肪酶在 40 °C 和 55 °C 条件下, 经 0.1 MPa 和

200 MPa 处理后的 K_m 、 V_{max} 、 K_{cat} 、 K_{cat}/K_m 值, 见表 1。

从表 1 可以看出, 200 MPa 处理后, 在 40 °C 时,

表 1 不同处理条件的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters under different processing conditions

$T/^\circ\text{C}$	压力/MPa	$K_m/(\text{mmol/L})$	$V_{max}/(\text{mmol}/(\text{L}\cdot\text{min}))$	K_{cat}/s^{-1}	K_{cat}/K_m ($\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$)
40	0.1	1.635±0.038	12.389±0.24	96.484±2.06	58.997±1.07
	200	1.523±0.034	20.157±0.32	156.988±2.64	103.100±2.40
50	0.1	2.596±0.105	37.538±1.67	292.348±19.5	112.595±4.21
	200	3.073±0.046	53.505±0.91	416.702±6.71	135.601±3.05

K_m 值的变化不大, 而 50 °C 时, K_m 值有所增大; V_{max} 值比常压有一定提高, 40 °C 时提高了 67.8%, 50 °C 时则为 43.2%。 K_{cat} 的变化和 V_{max} 变化相同, 在 40 °C 和 50 °C 条件下, 与 0.1 MPa 处理后的结果相比, 200 MPa 处理后, K_{cat}/K_m 值逐渐升高。 K_{cat}/K_m 表示催化效率, K_{cat}/K_m 值的增大, 表明脂肪酶催化效率提高。

40 °C 时, 200 MPa 处理后 K_m 值几乎不变, 可能是因为在低温区, 脂肪酶没有发生失活现象, 酶的结构相对稳定, 受到压力的影响较小。而 50 °C 时, 随着压力增加 K_m 值增大, 酶与底物结合能力下降, 可能引起反应速率的降低, 但 V_{max} 仍然增大, 原因可能是压力的升高同时促使反应向合成产物的方向进行, 有利于产物的释放(限速步骤)^[15], 从而削弱了底物与酶结合能力减弱的影响, 因而表现为反应速率及酶的催化效率提高。可见, 酶与底物亲和力与反应速率不一定呈现正相关性。Eisenmenger 在

40 °C、200 MPa 条件下处理 CALB 时, V_{max} 值比常压升高 10 倍, 同时酶与底物的结合能力随压力增加减少了 14 倍^[15]。

3 结 语

皱褶假丝酵母脂肪酶在超高压下的水解反应条件得到优化, 在 40 °C、200 MPa 处理后的酶活增加, 比常压高 76 %; 同时最适 pH 值从 7.0 增大到 7.5; 卸压 6 h 内, 脂肪酶结构发生部分恢复; 高压处理对 K_m 值影响在 40 °C 和 50 °C 时表现不同; V_{max} 、 K_{cat} 、 K_{cat}/K_m 值则随压力的增加而升高。这些实验结果表明, 适度的压力可以改善酶催化的反应条件, 而超高压处理引起的脂肪酶的一系列变化的可能机制需要进一步研究。总之, 作为一种绿色环保技术, 超高压技术在生物转化方面具有巨大潜力。

参考文献:

- [1] LI Y, MIAO M, CHEN X, et al. Improving the catalytic behavior of inulin fructotransferase under high hydrostatic pressure[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(13): 2588-2594.
- [2] SHI Lujin, SUN Jincai, CHEN Shan, et al. Influence of high hydrostatic pressure processing on the aroma compounds of orange cyst[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(5): 504-509. (in Chinese)
- [3] RAPEANU G, VAN L A, SMOUT C, et al. Thermal and high pressure inactivation kinetics of Victoria grape polyphenol oxidase: From model systems to grape must[J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2006, 29(3): 269-286.
- [4] SILA D N, SMOUT C, SATARA Y, et al. Combined thermal and high pressure effect on carrot pectinmethylesterase stability and catalytic activity[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 78(3): 755-764.
- [5] THOREY P, KNEZ Z, HABULIN M. Alcohol dehydrogenase in non-aqueous media using high-pressure technologies: reaction set-up and deactivation determination[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2010, 85(7): 1011-1016.
- [6] ZHANG Yu, MIAO Ming, JIANG Bo, et al. The effects of ultra high pressure on the activity and conformation of lipase[J]. *Journal of Food and Fermentation Industries*, 2012, 38(5): 7-11. (in Chinese)
- [7] LIU Miao, MIAO Ming, ZHANG Tao, et al. Effect of high pressure processing on the activity and conformation of inulin fructotransferase[J]. *Journal of Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(23): 49-52. (in Chinese)
- [8] PEDRO H A L, ALFAIA A J, MARQUES J, et al. Design of an immobilized enzyme system for naringin hydrolysis at high-

- pressure[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007, 40(3):442-446.
- [9] NOEL M, COMBES D. Effects of temperature and pressure on *Rhizomucor miehei* lipase stability[J]. **Journal of Biotechnology**, 2003, 102(1):23-32.
- [10] HUNG T C, GIRIDHAR R, CHIOU S H, et al. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2003, 26(1):69-78.
- [11] Lipases: their structure, biochemistry and application[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- [12] ZHANG Zhongyi, WU Xinxia, MENG Lingyan, et al. Study of hydrolysis characteristics of olive oil in ultra-high pressure by porcine pancreas lipase[J]. **Journal of Food Science and Technology**, 2009(1):10-13. (in Chinese)
- [13] PRIM N, SANCHEZ M, RUIZ C, et al. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2003, 22(5):339-346.
- [14] PENCREAC'H G, BARATTI J C. Hydrolysis of p-nitrophenylpalmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1996, 18(6):417-422.
- [15] ZHAO L L, XU J H, ZHAO J, et al. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010[J]. **Process Biochemistry**, 2008, 43(6):626-633.
- [16] EISENMENGER M J, REYES-DE-CORCUERA J I. High hydrostatic pressure increased stability and activity of immobilized lipase in hexane[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2009, 45(2):118-125.
- [17] TEDJO W, ESHTIAGHI M N, KNORR D. Impact of supercritical carbon dioxide and high pressure on lipoxigenase and peroxidase activity[J]. **Journal of Food Science**, 2000, 65(8):1284-1287.
- [18] EISENMENGER M J, REYES-DE-CORCUERA J I. Enhanced synthesis of isoamyl acetate using an ionic liquid-alcohol biphasic system at high hydrostatic pressure[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2010, 67(1):36-40.
- [19] LULLIEN P V, BALNY C. High-pressure as a tool to study some proteins' properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation[J]. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2002, 3(3):209-221.
- [20] MICHELS P C, HEI D, CLARK D S. Pressure effects on enzyme activity and stability at high temperatures[J]. **Advances in Protein Chemistry**, 1995, 48:341-376.
- [21] BOONYARATANAKORNKIT B B, PARK C B, CLARK D S. Pressure effects on intra-and intermolecular interactions within proteins[J]. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, 2002, 1595(1):235-249.
- [22] KUNUGI S. Enzyme reactions under high pressure and their applications[J]. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1992, 672(1):293-304.
- [23] BANG W S, CHUNG H J. Effect of high hydrostatic pressure on the enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*[J]. **New Biotechnology**, 2010, 27(4):440-444.
- [24] ZHANG Zhongyi, WU Xinxia. Effect of high-pressure treatment on the stability of lipase[J]. **Journal of Food Science and Technology**, 2008, 33(4):16-19. (in Chinese)
- [25] FENNEMA O R. Food Chemistry[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1996.

会议消息

第七届中国食品与农产品安全检测技术与质量控制国际论坛

会议名称(中文):第七届中国食品与农产品安全检测技术与质量控制国际论坛

所属学科:农林基础,仪器仪表与装置

开始日期:2018-06-06

结束日期:2018-06-07

所在城市:北京市 朝阳区 具体地点:北京国际会议中心

主办单位:中国仪器仪表学会分析仪器分会、中国仪器仪表行业协会分析仪器分会

联系电话:010-82967481 82967491

传真:010-82967471

会议网站:<http://www.cfascina.com/>