

鲢鱼鱼精蛋白超声波辅助提取工艺优化 及其抗菌活性研究

Optimization of extraction process assisted by ultrasonic and antibacterial activity evaluation on the protamine from silver carp

刘光宪^{1,2} 祝水兰¹ 何家林¹ 周巾英¹ 冯健雄¹

LIU Guang-xian^{1,2} ZHU Shui-lan¹ HE Jia-lin¹ ZHOU Jin-ying¹ FENG Jian-xiong¹

(1. 江西省农业科学院, 江西 南昌 330200; 2. 江西师范大学, 江西 南昌 330022)

(1. Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang, Jiangxi 330200, China;

2. Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China)

摘要: 为了实现鲢鱼加工副产物的高效综合利用, 以鲢鱼精巢为原料, 研究柠檬酸浓度、提取温度、超声功率、提取时间、固液比、提取次数对鱼精蛋白得率的影响。在单因素试验基础上, 通过正交试验获得最佳提取工艺为: 柠檬酸浓度 0.45 mol/L, 温度 55 °C, 超声时间 20 min, 超声功率 400 W, 固液比 1:30 (g/mL), 提取 3 次。在最佳工艺条件下, 鱼精蛋白得率为 3.25%; 鱼精粗蛋白经 Sepharose Fast Flow 离子交换层析分离得到 4 个组分, 对 4 个组分进行抗菌性分析可知, 除鱼精蛋白的前体蛋白外, 其他组分对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有较好的抑制活性, 其中组分 II、III 的抑菌活性较好。

关键词: 鲢鱼; 超声波辅助提取; 鱼精蛋白; 离子交换纯化; 抑菌

Abstract: To realize the high comprehensive utilization on the by-product of silver carp, taking the testis sacs of silver carp as the raw material, the effects were studied, including the concentration of citric acid, the temperature, ultrasonic power, ultrasonic time, solid-liquid rate and extraction times on the efficacy extraction of silver carp spermary. On the base of single-factor experiments, and through the orthogonal test, the optimization experiment conditions were as followed: concentration of citric acid 0.45 mol/L, extraction temperature 55 °C, the ultrasonic time 20 min, ultrasonic power 400 W, ratio of solid-liquid 1:30, and the extraction times 3 times.

基金项目: 江西省农业科学院青年基金(编号:2015CQN002); 江西省科技计划(编号:20161BBF60134)

作者简介: 刘光宪, 男, 江西省农业科学院助理研究员, 江西师范大学在读博士研究生。

通信作者: 冯健雄(1963—), 男, 江西省农业科学院研究员, 学士。
E-mail: fjx630320@163.com

收稿日期: 2017-04-06

The extraction ratio of chub protamine was 3.25% at the optimized conditions. Four groups chub protamine were purified and separated through sepharose fast flow ion-exchanged chromatography. By studying the antibacterial activities of the four group, excepting the precursor protein, the other groups had a good inhibition on the *salmonella*, *staphylococcus aureus* and *escherichia coli*, especially the group II and III.

Keywords: silver carp; ultrasonic assisted extraction; protamine; ion-exchange chromatography; anti-bacteria

鱼精蛋白是一种鱼类成熟精巢组织中的多聚阳离子肽, 一般与核酸结合在一起, 以核精蛋白的形式存在, 分子量约为 4.0~4.5 kDa^[1-2]。研究^[3-5]表明, 鱼精蛋白具广谱抑菌性、抗凝血性、抑制 II 型糖尿病以及促进消化道脂肪的消化等功能。鱼精蛋白的活性和鱼类精巢组织成熟度有关, 从前体蛋白到成熟的鱼精蛋白, 其抑菌性相应增加^[6-7]。由于鱼精蛋白具有较好的生物活性, 其提取及加工利用备受关注。刘燕妮等^[8]从蛙鱼和鲤鱼中提取鱼精蛋白, 研究显示提取的鱼精蛋白具有良好的抑菌活性; 胡晓璐等^[9]采用硫酸法从鲢鱼精巢中提取鱼精蛋白, 研究显示鱼精蛋白得率为 3.42%。目前, 鱼精蛋白相关产品已被广泛地作为天然防腐剂和药物中间体应用于食品和药品生产中, 市场需求量大。

鲢鱼是中国四大家鱼之一, 其肉质鲜嫩, 蛋白质丰富, 但由于刺多, 肉质土腥味重, 导致其不受市场欢迎, 鲜销量和价格均处于低水平, 亟待进行精深加工以提高其附加值, 近年来, 鱼鳞、鱼皮、鱼精巢等加工副产物的综合高效利用已成为鲢鱼加工增值的热点研究课题。

超声波具有频率高、穿透能力强等特点, 能产生空化效应和局部热点效果, 多用于物料中有效成分的提取, 其中在蛋白质^[10]、油脂^[11]、多酚^[12]、多糖^[13]、色素^[14]的提取中均有

应用。鱼精蛋白的提取方法主要是硫酸法^[9],而采用柠檬酸提取的研究较少。为了提高鲢鱼加工副产物(精巢)综合利用效益,本研究采用超声波辅助柠檬酸法提取鱼精蛋白,并对产物进行了分离纯化及抗菌性研究,旨在为鲢鱼精巢的加工利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

新鲜鲢鱼精巢:购买自南昌市青山湖社区菜市场;

考马斯亮蓝 G-250、牛血清白蛋白、CM Sepharose FF:生化级,北京索莱宝科技有限公司;

胰蛋白胨、牛肉膏、琼脂等:生化级,北京奥博星生物技术公司;

柠檬酸、氯化钠、无水乙醇等:分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌:南昌大学生命科学学院微生物研究室;

牛津杯(内径 6 mm,外径 8 mm,高 10 mm):上海精密仪器有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

紫外可见分光光度计:T6 新世纪型,北京普析通用仪器有限公司;

电热鼓风干燥箱:DHG-9140A 型,上海一恒仪器厂;

超声波破碎仪:JY92-II 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

循环水浴锅:HH-50 型,金坛市天竟实验仪器厂;

自动液相色谱分离层析仪:MC99-3 型,上海沪西分析仪器厂有限公司;

分析天平:TP-214 型,北京赛多利斯仪器系统有限公司;

高速台式离心机:TGL-10C 型,上海安亭科学仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 鱼精蛋白提取 以新鲜鲢鱼精巢为原料,参照文献^[15]的提取方法修改如下:以 0.15 mol/L NaCl 溶液提取、干燥得到的脱氧核糖核蛋白(DNP)为原料,研究不同柠檬酸浓度、提取温度、提取时间、超声波功率、固液比、提取次数对鱼精蛋白得率的影响。其中超声波提取采用 6 mm 探头,脉冲工作 3 s,间隙 8 s,其间为减小超声过程中产生的热量对提取温度的影响,采用对应提取温度的循环水浴连接水浴控温杯进行相对控温。各组提取液离心取上清液,用 3 倍体积的无水乙醇沉淀,沉淀用丙酮洗涤 2 次,真空干燥得到鱼精蛋白粗品。在单因素试验基础上,选取对得率影响较大的 4 个因素,开展 3 水平正交试验确定最佳提取工艺。

1.2.2 鱼精蛋白纯化 根据文献^[16]的研究方法修改如下:将粗鱼精蛋白使用 Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱分离纯化,以 CM Sepharose FF 作为柱填料,将样品溶液以柱体积的 10% 上样,并采用 0~1 mol/L NaCl 溶液作为洗脱溶剂,对蛋白进行梯度洗脱,洗脱流速为 0.3 mL/min,洗脱液

使用 10 mL 的试管接 100 管进行后续分析。

1.2.3 基本成分及得率测定

(1) 水分含量测定:按 GB 5009.3—2016 执行。

(2) 蛋白质含量测定:采用考马斯亮蓝法^[17]。

(3) 核酸含量测定:采用定磷法。

(4) 脂肪含量测定:按 GB 5009.6—2016 执行。

(5) 灰分含量测定:按 GB 5009.4—2016 执行。

(6) 鱼精蛋白得率按式(1)计算:

$$C = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

C——鱼精蛋白得率,%;

m_1 ——蛋白含量,g;

m_2 ——鲢鱼精巢总质量,g。

1.2.4 抗菌活性的测定 根据文献^[18]的方法修改如下:胰蛋白胨 10 g,牛肉膏 5 g,NaCl 10 g,琼脂粉 15 g,并将 pH 调至中性,用去离子水定容至 1 L,将配置好的培养基用牛皮纸封口,高温灭菌,在超净台内倒入直径为 90 mm 的培养皿中,每板 10 mL,待培养基凝固之后,用浓度为 10^{-6} CFU 的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌各 5 μ L 进行涂板,并使用刮板器将菌液涂抹均匀后,将培养皿划线分为 3 个扇形区域,在每个区域中心放置牛津杯,并在每个牛津杯孔中加入 20 μ L 经过纯化后的鱼精蛋白溶液(1 mg/mL),以添加生理盐水作为空白。在室温下,待样品完全扩散后,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 72 h,观察并测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 成分分析

鲢鱼精巢的基本成分见表 1,其蛋白质含量为(11.89 \pm 0.42)% ,占精巢干重的 52.22% ,蛋白质含量介于蛙鱼、鲤鱼之间^[8],鲢鱼精巢脂肪和灰分含量少,由此可见其是一种优质的低脂高蛋白产品。

表 1 鲢鱼精巢基本成分

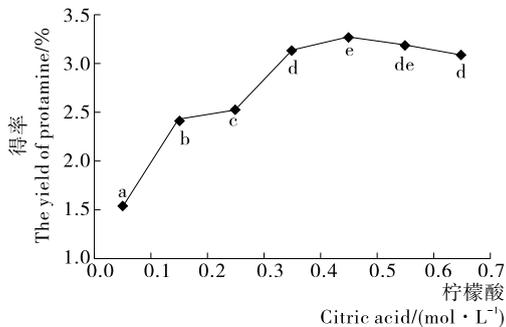
Table 1 Basic composition analysis of silver carp spermary

水分	蛋白质	核酸	脂肪	灰分	%
75.23 \pm 1.35	11.89 \pm 0.42	7.07 \pm 0.80	1.86 \pm 0.08	2.69 \pm 0.13	

2.2 单因素试验结果分析

2.2.1 柠檬酸浓度对鱼精蛋白得率的影响 由图 1 可知,柠檬酸浓度在 0.05~0.65 mol/L 时,鱼精蛋白的得率随着柠檬酸浓度的增大先显著升高后降低($P < 0.05$),在 0.45 mol/L 时得率达到最高(3.22%)。

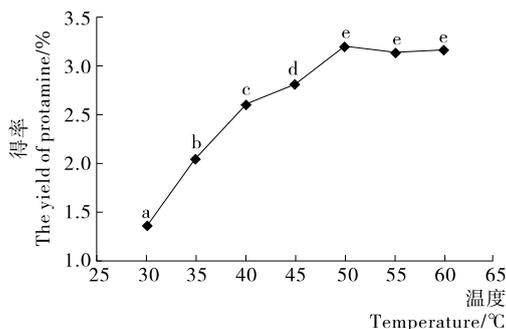
2.2.2 提取温度对鱼精蛋白得率的影响 由图 2 可知,温度对鱼精蛋白得率的影响较大,鱼精蛋白的得率随提取温度的升高显著升高($P < 0.05$),当温度达到 50 $^{\circ}$ C 时,鱼精蛋白的得率为 3.18%,当温度继续升高至 55,60 $^{\circ}$ C 时,得率无显著性变化($P > 0.05$),且提取的鱼精蛋白溶液颜色发黄,因此,选择 50 $^{\circ}$ C 较为合适。



不同字母表示在 0.05 水平差异显著

图 1 柠檬酸浓度对鱼精蛋白得率的影响

Figure 1 Effects of concentration of citric acid on the yield of protamine



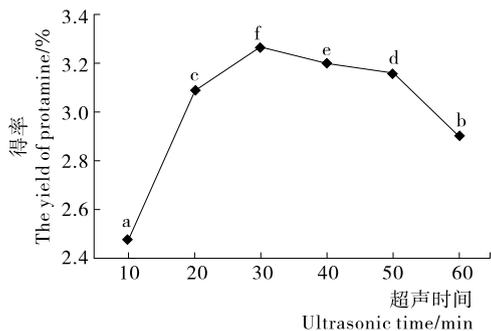
不同字母表示在 0.05 水平差异显著

图 2 提取温度对鱼精蛋白得率的影响

Figure 2 Effects of concentration of extraction temperature on the yield of protamine

2.2.3 超声时间对鱼精蛋白得率的影响 由图 3 可知, 超声时间在 10~60 min 时, 鱼精蛋白的得率先升高后降低, 在 30 min 时得率达到最高, 随后显著降低 ($P < 0.05$)。

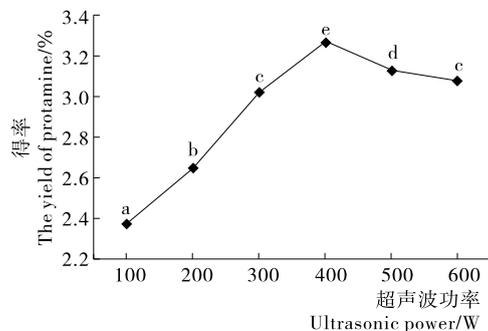
2.2.4 超声功率对鱼精蛋白得率的影响 由图 4 可知, 随着超声波功率增大, 鱼精蛋白的得率先显著升高后降低 ($P < 0.05$), 在 400 W 时得率达 3.22%。当超声功率 > 400 W, 超声波产生的局部热点可能导致蛋白质的碳化或水解, 使其得率显著降低 ($P < 0.05$)。因此, 超声波功率选择 400 W 较为合适。



不同字母表示在 0.05 水平差异显著

图 3 超声时间对鱼精蛋白得率的影响

Figure 3 Effects of ultrasonic time on the yield of protamine



不同字母表示在 0.05 水平差异显著

图 4 超声功率对鱼精蛋白得率的影响

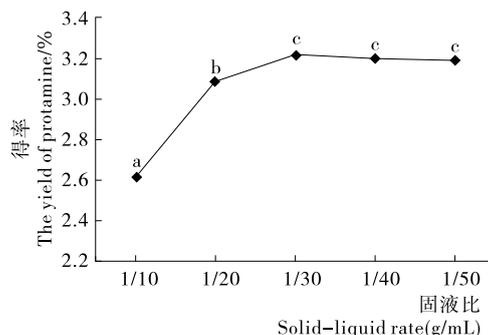
Figure 4 Effects of ultrasonic power on the yield of protamine

2.2.5 固液比对鱼精蛋白得率的影响 由图 5 可知, 固液比在 1:10~1:30 (g/mL) 时, 鱼精蛋白的得率显著增加 ($P < 0.05$), 固液比为 1:30 (g/mL) 时, 得率达到最大。固液比为 1:30 (g/mL) 之后, 得率无显著性变化 ($P > 0.05$), 可能是底物浓度过大导致底物黏度增大而影响提取效率。

2.2.6 提取次数对鱼精蛋白得率的影响 由图 6 可知, 随着提取次数增加, 鱼精蛋白的提取得率增加, 提取 3 次时, 得率最大, 提取次数超过 3 次, 鱼精蛋白的得率无显著变化 ($P > 0.05$)。

2.3 正交试验

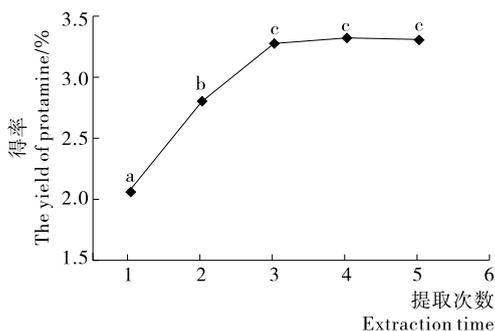
综合单因素试验结果发现, 柠檬酸浓度、提取温度、超声



不同字母表示在 0.05 水平差异显著

图 5 固液比对鱼精蛋白得率的影响

Figure 5 Effects of solid-liquid rate on the yield of protamine



不同字母表示在 0.05 水平差异显著

图 6 提取次数对鱼精蛋白得率的影响

Figure 6 Effects of extraction time on the yield of protamine

时间和超声功率4个因素对鱼精蛋白提取得率的影响较大,因此选择这4个因素,进行3水平正交试验。试验因素水平取值见表2,正交试验中每组开展3次平行试验,得率取平均值,结果见表3。

表2 $L_9(3^4)$ 正交因素水平表

Table 2 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal design

水平	A 柠檬酸浓度/ (mol · L ⁻¹)	B 提取温度/ ℃	C 超声时间/ min	D 超声功率/ W
1	0.35	45	20	300
2	0.45	50	30	400
3	0.55	55	40	500

表3 鱼精蛋白提取工艺的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 3 $L_9(3^4)$ orthogonal design and result of the extraction of protamine

水平	A	B	C	D	得率/%
1	1	1	1	1	2.67
2	1	2	2	2	2.81
3	1	3	3	3	2.87
4	2	1	2	3	3.11
5	2	2	3	1	3.08
6	2	3	1	2	3.25
7	3	1	3	2	3.12
8	3	2	1	3	3.18
9	3	3	2	1	3.01
k_1	2.78	2.97	3.03	2.92	
k_2	3.15	3.02	2.98	3.06	
k_3	3.10	3.04	3.02	3.05	
R	0.37	0.07	0.05	0.14	

由表3可知,影响鱼精蛋白得率的因素主次为:A>D>B>C,最优提取工艺组合为 $A_2B_3C_1D_2$,恰为表3得分最高组。故鱼精蛋白的最优提取工艺为柠檬酸浓度0.45 mol/L,提取温度55℃,超声时间20 min,超声功率400 W,固液比1:30 (g/mL),提取3次。

2.4 鱼精蛋白的纯化及其抗菌活性研究

2.4.1 分离纯化 鱼精蛋白是一种碱性蛋白,因此选择CM Sepharose FF为离子交换层析柱填料,提取得到的鱼精蛋白经 Sepharose Fast Flow 离子交换层析柱分离纯化后,得到4个主要组分(见图7)。

由图7可知,10~20管是用未含盐的溶液洗脱,吸收峰较小,为没有被填料吸附的前体蛋白;32~100管是用含有NaCl 0.3~1.0 mol/L的缓冲液进行线性洗脱,有I、II、III 3个峰出现,分别收集、透析脱盐、减压浓缩后进行抗菌试验。

2.4.2 抑菌活性研究 对分离得到的4个组分进行抑菌研究,抑菌圈研究结果见图8和表4。结果表明,当蛋白质浓度为1 mg/mL时,在pH为7的中性环境下,除前体蛋白外,鱼精蛋白各组分对沙门氏菌(图8A和B)、金黄色葡萄球菌(图8C和D)和大肠杆菌(图8E和F)均具有抑制活性,其中

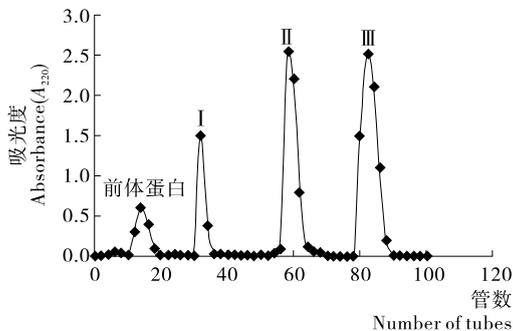


图7 鱼精蛋白离子交换层析图谱

Figure 7 Analysis atlas of protamine treated by ion-exchange chromatography

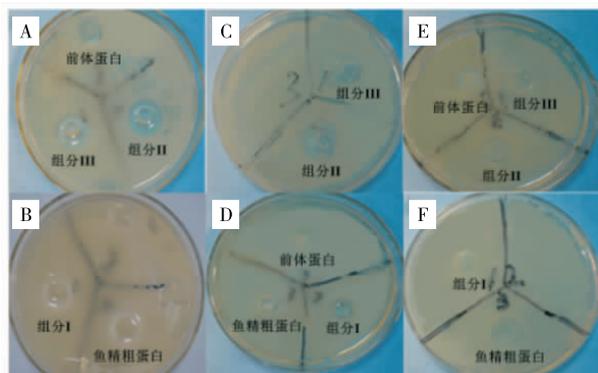


图8 鱼精蛋白各组分对沙门氏菌、金黄色球菌和大肠杆菌的抑制

Figure 8 Inhibitory effect of protamine components on *salmonella*, *staphylococcus aureus* and *escherichia coli*

表4 鱼精蛋白各组分对沙门氏菌、金黄色球菌和大肠杆菌的抑制效果

Table 4 Inhibitory effect of protamine components on *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cm

细菌种类	组分		
	组分 I	组分 II	组分 III
沙门氏菌	1.11±0.10	1.60±0.20	1.30±0.10
金黄色葡萄球菌	0.92±0.13	1.30±0.05	1.00±0.12
大肠杆菌	0.87±0.11	1.10±0.13	0.90±0.07

组分II和组分III的抑菌活性较好。

由表4可知,组分II的抑菌效果明显要强于组分I和组分III,组分III的抑制效果要好于组分I。

3 结论

超声波辅助柠檬酸法提取鱼精蛋白的最佳提取工艺为:柠檬酸浓度0.45 mol/L,提取温度55℃,超声时间20 min,超声功率400 W,固液比1:30 (g/mL),提取3次,在此工艺条件下提取鱼精蛋白得率可达到3.25%;对提取之后的粗鱼精蛋白进行分离纯化获得4个组分,除前体蛋白外,其他3个组分对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均具有抑制活性,其中组分II和组分III的抑菌活性较好。为了揭示不

同种类鱼的鱼精蛋白活性差异,今后可开展鲢鱼鱼精蛋白与其他鱼类鱼精蛋白的活性比较研究。

参考文献

- [1] SCHEICHER B, SCHACHNER-NEDHERER A L, ZIMMER A. Protamine-oligonucleotide-nanoparticles: Recent advances in drug delivery and drug targeting[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 75: 54-59.
- [2] HE Hui-ning, YE Jun-xiao, LIU Er-gang, et al. Low molecular weight protamine (LMWP): A nontoxic protamine substitute and an effective cell-penetrating peptide [J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 193: 63-73.
- [3] ZHANG Zhi-feng, MIAO Yan-ming, ZHANG Qin-di, et al. Facile and sensitive detection of protamine by enhanced room-temperature phosphorescence of Mn-doped ZnS quantum dots [J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 478: 90-95.
- [4] PUGSLEY M K, KALRA V, FROEBEL-WILSON S. Protamine is a low molecular weight polycationic amine that produces actions on cardiac muscle[J]. *Life Sciences*, 2002, 72(3): 293-305.
- [5] FRITSCH A, SCHWEITZER M A, HRING H. Glimpeptide combined with morning insulin glargine, bedtime neutral protamine hagedorn insulin, or bedtime insulin glargine in patients with type 2 diabetes a randomized, controlled trial[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2003, 138(12): 952-959.
- [6] 上官新晨. 鲤鱼抗菌精蛋白的提取, 分离, 抗菌特性研究及抗菌机理探讨[D]. 西安: 陕西师范大学, 2004: 36.
- [7] 万娜. 鱼精蛋白对细菌及生物膜的抑制作用及初步应用研究

- [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013: 1.
- [8] 刘燕妮. 鱼精蛋白的制备, 纯化及其絮凝和抑菌活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015: 21.
- [9] 胡晓璐, 刘淑集, 吴成业. 鲑鱼鱼精蛋白的提取工艺优化研究[J]. *福建水产*, 2013(6): 434-440.
- [10] 马秀婷, 肖志刚, 孙旭, 等. 超声波辅助提取豆渣蛋白工艺优化[J]. *食品与机械*, 2013, 29(1): 108-112.
- [11] 胡炜东, 蔡永敏, 杨俊峰. 超声波辅助提取油莎豆油工艺的研究[J]. *食品与机械*, 2013, 29(2): 109-112, 129.
- [12] 涂宗财, 张露, 王辉, 等. 超声波辅助提取藜蒿多酚工艺优化及抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(5): 239-242.
- [13] 高洁, 董文宾, 王勇, 等. 山皂荚多糖的提取工艺及抑菌活性[J]. *食品与机械*, 2017, 33(3): 145-149.
- [14] 谢秋涛, 李高阳. 超声波辅助乙醇提取法提取玫瑰色素[J]. *食品与机械*, 2012, 28(3): 148-150.
- [15] 黄占旺, 上官新晨, 沈勇根, 等. 鲤鱼精蛋白的提取与抗菌稳定性研究[J]. *农业工程学报*, 2005, 21(2): 165-168.
- [16] 李艳, 孙海燕, 周丽珍, 等. 凝胶层析和离子交换层析结合法纯化重组降血压肽 VLPVPR[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(17): 111-114.
- [17] MCFARLAND G. The staining of starch gels with Coomassie Brilliant Blue G-250 perchloric acid solution[J]. *Experientia*, 1977, 33(12): 1 668.
- [18] LI Ying-qiu, HAN Qing, FENG Jian-ling, et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Food Control*, 2014, 43: 22-27.

(上接第 110 页)

在径向出现小的振动,且振动与静摩擦系数有关;当静摩擦系数为 0.8 时,电控化制动 2.18 s 后,食品斗式提升机速度降到 9 km/h;当静摩擦系数为 0.7 时,电控化制动 2.23 s 后,食品斗式提升机速度降到 7.5 km/h 时;当静摩擦系数为 0.6 时,食品斗式提升机制动盘速度减少得较为明显,且径向出现平缓振动。

4 结论

(1) 设计了食品斗式提升机电—机械制动装置,选用最大驱动力矩 13.69 N·m、转速 24 r/min 的丝杠螺母副,转矩 3.2 N·m 的力矩电机和太阳轮、内齿圈、行星轮齿数为 25、95、35 的标准行星齿轮,传动精确、可靠,完全满足液压制动的参数要求。

(2) 基于相似原理进行了试验研究,试验结果表明食品斗式提升机电—机械制动装置运行正常,刹车驻车等安全可靠,稳定性较好。

(3) 食品斗式提升机制动平稳,振动较小,结构设计合理。但电—机械制动装置仅做了特定制动工况下的试验,还需进行多工况多动载试验,使其满足食品斗式提升机的工况和性能要求。

参考文献

- [1] 中国食品科学技术学会秘书处. 坚守食品安全底线 巩固产业健

- 康转型: 2017 年国际食品安全大会 4 月在京启幕[J]. *食品与机械*, 2016, 33(3): 1-2, 109.
- [2] 陈雨萌. 中国食品安全监管中行政法的规制研究[J]. *食品与机械*, 2016, 32(8): 227-229.
- [3] 虎自平, 曹新华, 宁有才, 等. 斗式提升机的结构分析及改进[J]. *现代食品*, 2016(1): 74-76.
- [4] 赵艳平, 马利平, 贾佳, 等. 胶带斗式提升机张紧装置探析[J]. *粮油食品科技*, 2016, 24(3): 108-110.
- [5] 贺新华. 斗式提升机的参数化设计及仿真分析[D]. 长春: 吉林大学, 2015: 28-40.
- [6] 薛晓金, 姜学鹏, 马鹏飞, 等. 斗式提升机的结构分析及改进[J]. *粮食与食品工业*, 2014, 21(1): 72-74.
- [7] FRANK Schumann. Method for oferating an electromechanical wheel brake device: US, 6305508[P]. 2001-10-23.
- [8] CHIH Feng Lee, CHRIS Manzie. Active brake judder attenuation using an electromechanical brake-by-wire system[J]. *IEEE-Asme Transactions on Mechatronics*, 2016, 21(6): 2 964-2 976.
- [9] ATIA M RA, KAMAL A MM, HAGGAG SA, et al. Enhanced electromechanical brake-by-wire system using sliding mode controller[J]. *Journal of Dynamic Systems Measurement and Control- Transactions of the Asme*, 2016, 138(4): 120-125.
- [10] 李伯全, 董现伦, 何仁, 等. 基于 EMB 和路面自动识别的汽车 ABS 仿真[J]. *机械设计与制造*, 2009(9): 186-188.
- [11] 田甜. 四轮独立驱动电动底盘设计及试验研究[D]. 北京: 中国农业机械化科学研究院, 2012: 39-43.