

钴及其配合物对产甲烷关键酶的影响

赵 阳¹ 李秀芬¹ 堵国成¹ 陈 坚^{1,2}

(1. 江南大学生物工程学院环境生物技术实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要 通过考查产甲烷过程中辅酶 M 和辅酶 F₄₂₀ 浓度的变化, 研究了钴及其配合物的添加对产甲烷的影响。研究表明, 添加钴和配合钴对产甲烷关键酶的浓度均有一定影响, 同时, 在相同添加摩尔浓度下, 相对于钴, 配合钴对关键酶的影响更为显著。当丝氨酸-钴配合物的添加剂浓度为 2 μmol/L 时, 污泥中(VSS)辅酶 F₄₂₀ 的浓度由空白样的 0.375 μmol/g 提高到 0.628 μmol/g, 辅酶 M 的浓度由空白样的 51.01 μmol/g 提高到 110.60 μmol/g。

关键词 微量元素; 钴; 配合物; 辅酶 M; 辅酶 F₄₂₀

中图分类号 Q814 **文献标识码** :A **文章编号** :1004-693X(2008)02-0082-04

Effect of cobalt and its complexation on the key enzymes in methanogenesis

ZHAO yang¹, LI Xiu-fen¹, DU Guo-cheng¹, CHEN Jian^{1,2}

(1. Environmental Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effects of cobalt and its complexation on methanogenesis were investigated through the indicators of coenzyme M and coenzyme F₄₂₀. Research indicated that the addition of cobalt and its complexation influenced the content of the key enzymes in methanogenesis. Compared with cobalt, the complexation of cobalt has significant influence on the enzyme under the condition of equal addition. The addition of 2 μmol/L of serine-co complexation led to an increase of coenzyme F₄₂₀ from 0.375 μmol/g to 0.628 μmol/g and a simultaneous increase of coenzyme M from 51.01 μmol/g to 110.60 μmol/g.

Key words: trace element; cobalt; complexant; coenzyme M; coenzyme F₄₂₀

在厌氧消化产甲烷的过程中,以充足量和生物学有效形式存在的微量金属元素钴不仅有利于产甲烷过程和微生物细胞的合成^[1-2],还可促进酶合成或激活在生化反应中起催化作用的酶^[3]。产甲烷代谢途径中包含 2 类重要的辅酶^[4]:作为甲基载体的辅酶和作为电子载体的辅酶。辅酶 F₄₂₀在产甲烷的电子传递链中起着不可忽视的作用^[5],是产甲烷菌特有的物质,可以用来反映同种厌氧污泥产甲烷菌的数量或是污泥的产甲烷活性^[6]。辅酶 M 存在于所有的产甲烷菌中,在甲基传递链中作为甲基传递的辅酶,也可用来反应产甲烷菌的数量及活性^[7]。到

目前为止,有关微量元素钴对产甲烷的促进作用研究主要以产甲烷量为评价指标。本文拟通过产甲烷过程中关键酶浓度的变化来评价钴及其配合物对厌氧消化产甲烷过程的影响。

1 材料与方法

1.1 实验用水^[2,5]

本实验采用合成配水。其配方如下:葡萄糖质量浓度 5 g/L,氮、磷分别以 NH₄Cl 和 KH₂PO₄ 及 Na₂HPO₄ 的形式提供,满足 n(COD):n(N):n(P)=200:5:1。为保证体系有足够的 pH 缓冲能力,配水

中加入质量浓度为 5 g/L 的 NaHCO_3 。

常量元素： $c(\text{NaCl}) = 5 \text{ mmol/L}$ ； $c(\text{MgCl}_2) = 0.5 \text{ mmol/L}$ ； $c(\text{CaCl}_2) = 0.5 \text{ mmol/L}$ ； $c(\text{Na}_2\text{S}) = 1 \text{ mmol/L}$ 。

微量元素溶液： Na_2SeO_3 ， Na_2WO_4 ， Na_2MoO_4 ， H_3BO_4 ， ZnCl_2 ， CuCl_2 ， MnCl_2 的浓度为 1 mmol/L； $c(\text{NiCl}_2) = 1 \text{ mmol/L}$ ； $c(\text{FeCl}_2) = 10 \text{ mmol/L}$ 。

1.2 实验污泥

实验所用的颗粒污泥取自启动成功的 UASB 反应器， $\rho(\text{COD}) = 5 \text{ g/L}$ ， $\text{HRT} = 1 \text{ d}$ 。在实验室用 1 L 的 UASB 反应器驯化 10 d 后，COD 去除率稳定在 85% 左右，即认为污泥驯化成熟。污泥 TS 是指试样在一定温度下蒸发至恒重时所余固体的总量，VSS 是指试样经过滤或离心后得到的悬浮物蒸发后所余固体量中有机物的含量，常以 VSS 表示厌氧污泥的生物量。本实验所用污泥 TS 为 10.76%（湿污泥中总固体质量分数），VSS 为 80.93%（总固体 TS 中有机物的质量分数）。

1.3 分析方法

1.3.1 厌氧污泥产甲烷体积的确定（史式发酵法^[8]）

取驯化好的湿污泥 6 g，置入 125 mL 血清瓶中，然后加入 100 mL 实验用水，并按要求添加 Co^{2+} 或钴的配合物，pH 值调至 7 ± 0.2 ，充氮气 10 min，迅速密封，置于 35℃ 恒温箱中，定时记录甲烷的累积产量，直至甲烷累积产量停止增加时，结束实验。期间，为使污泥和基质充分接触，每 12 h 摇动血清瓶 1 次。

1.3.2 厌氧污泥中辅酶 F_{420} 浓度的测定（紫外分光光度法^[5]）

a. 步骤，见图 1。

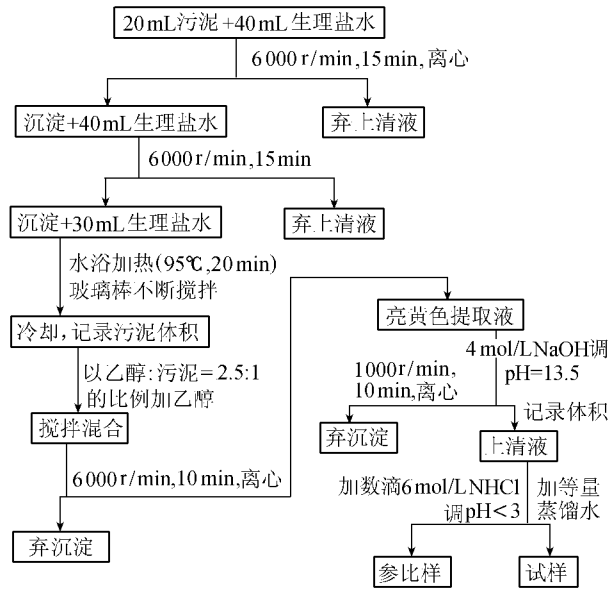


图 1 颗粒污泥样品(F_{420})预处理步骤

b. 计算方法。用紫外-可见光光度计在波长 420 nm 下测定。计算公式如下：

$$c = \frac{(A_1 - A_0)f}{\epsilon l}$$

式中： c 为污泥中的辅酶 F_{420} 浓度，mmol/L； A_1 为试样在 420 nm 下的吸光度值； A_0 为参比样在 420 nm 下的吸光度值； f 为稀释倍数； l 为比色皿厚度，cm； ϵ 为辅酶 F_{420} 的消光系数， $\text{L}/(\text{cm} \cdot \text{mmol})$ ；在 $\text{pH} = 13.5$ 时， $\epsilon = 54.3 \text{ L}/(\text{cm} \cdot \text{mmol})$ 。

在求出污泥混合液的辅酶 F_{420} 浓度 c 后，可以根据污泥液的 VSS 浓度求出污泥内的辅酶 F_{420} 浓度，计算公式为

$$c_x = \frac{c}{X}$$

式中： c_x 为单位质量污泥中辅酶 F_{420} 的含量，mmol/g； X 为单位体积污泥中的污泥质量，g/L。

1.3.3 厌氧污泥中辅酶 M 浓度的测定^[7]

取 5 g 湿污泥与 2 mL 质量分数为 1% 的三正丁基膦混合，室温反应 1 h 后，离心（转速为 12 000 r/min）2 min 分离。取 1 mL 上清液和 20 μL 邻苯二甲醛溶液（甲醇质量浓度为 20 mg/mL），20 μL 乙醇胺溶液（硼酸缓冲液（ $\text{pH} = 9.0$ ）质量浓度为 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ）衍生。衍生条件为好氧、室温反应 5 min。然后取样进行 HPLC 分析测定辅酶 M 的浓度。

HPLC 检测条件：Beckman 157 荧光检测器，发射波长为 338 nm，激发波长为 450 nm；HPLC 分析采用 Econosphere C18 柱，流动相配比为 7:3 的乙酸纳缓冲液（50 mmol/L， $\text{pH} = 5.7$ ）和乙腈，流速为 1 mL/min，进样量为 2 μL 。实验所用辅酶 M 标样购于 sigma 公司。

1.3.4 VSS 的测定（重量法^[9]）

取定量污泥，离心机（转速为 4 500 r/min）离心 10 min 后，将离心后固体部分完全转移至坩埚内，放入烘箱内于 105℃ 下烘至恒重后，放入马弗炉内，在 60℃ 下灼烧至恒重后，取出测定其 VSS 值。

2 结果与讨论

2.1 钴的添加对辅酶浓度的影响

Co^{2+} 的添加对辅酶 M 和辅酶 F_{420} 浓度的影响情况如图 2 所示。随着体系中 Co^{2+} 浓度的增大，辅酶 M 和辅酶 F_{420} 的浓度均呈先增加后降低的趋势。当 Co^{2+} 的添加浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时，辅酶 M 和辅酶 F_{420} 浓度的提高幅度分别为 3.92% 和 9.63%。当钴的添加浓度升高到 4 $\mu\text{mol/L}$ 时，产甲烷过程中的辅酶 M 和辅酶 F_{420} 的浓度最高，分别比空白样增加了 17.92% 和 29.87%。之后随着 Co^{2+} 添加浓度的进一步增加，辅酶 M 和辅酶 F_{420} 的浓度开始降低，当添

加浓度为 $8\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时 辅酶浓度略低于空白样 Co^{2+} 添加表现出一定的抑制作用。此后 钴的添加浓度越高 抑制作用越明显 到 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时 辅酶 M 和辅酶 F_{420} 的浓度分别比空白样减少了 10.06% 和 5.32%。 Co^{2+} 的添加对厌氧污泥产甲烷的影响如图 3 所示。由图 2 可知 Co^{2+} 的添加对厌氧污泥产甲烷的影响与对辅酶 M 和辅酶 F_{420} 浓度关系存在一定的相关性。当 Co^{2+} 的添加浓度为 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时 产甲烷量提高了 8.16% Co^{2+} 的添加浓度为 $4\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时 产甲烷体积达到最高 比空白样增加了 33.55%。

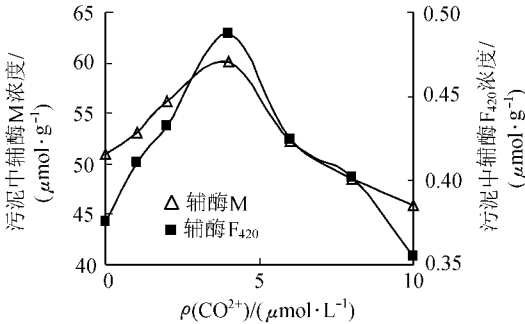


图 2 Co^{2+} 浓度对辅酶 M 和辅酶 F_{420} 的影响

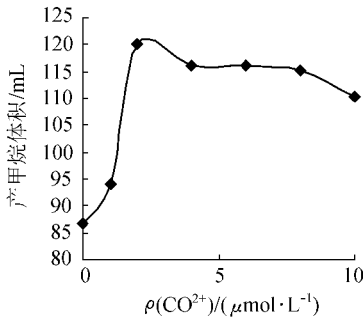


图 3 Co^{2+} 浓度对甲烷发酵的影响

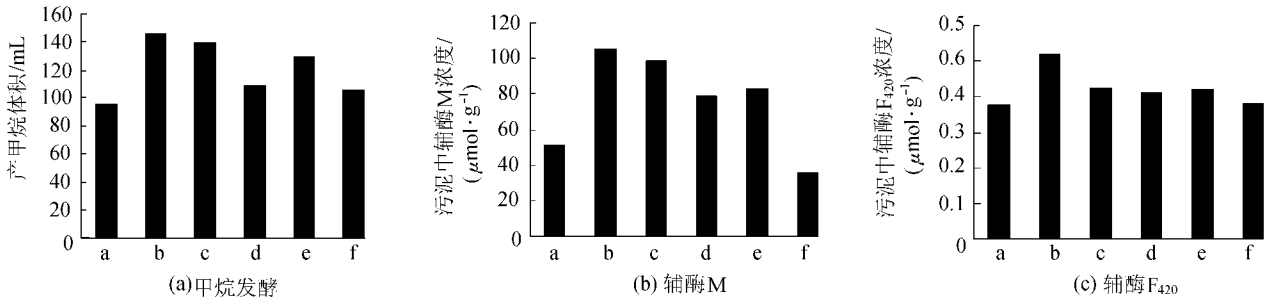
可见 钴的添加对产甲烷过程中的辅酶以及厌氧污泥产甲烷活性均存在‘低促高抑’效应。厌氧污泥的产甲烷活性反映了产甲烷菌的活性 适量钴的添加能促进产甲烷菌的活性或是促进产甲烷菌的生长 也可体现在辅酶浓度变化上 ①足量的元素钴可以促进微生物细胞的合成^[2-3]。本试验采用的是缺钴驯化方法 因此接种污泥中所含钴的量很少 微量

钴的添加可以促进产甲烷菌的生长 相应的辅酶浓度增加 厌氧污泥产甲烷体积增加。②足量的钴可以促进酶的合成^[4]。与产甲烷过程密切相关的辅酶 B_{12} 含有钴 钴的添加可促进辅酶 B_{12} 的合成 进而有利于辅酶 M 和辅酶 F_{420} 的合成。③钴还能抑制细胞呼吸链中重要的呼吸酶 具有脱氧作用 可为厌氧菌提供良好的生长环境 促进厌氧菌的生长 辅酶浓度随之升高。因此 在添加低浓度钴时 钴可以提高辅酶的浓度。当 Co^{2+} 的添加浓度超过 $6\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时 即钴浓度过高时 过量的 Co^{2+} 可能会与体系中的 CO_3^{2-} 、 S^{2-} 、 SO_4^{2-} 发生反应 生成难溶沉淀 而这些难溶物的凝聚作用可使部分酶发生沉淀 从而降低酶的浓度。另一方面 过量的 Co^{2+} 容易与细菌蛋白质结合而使蛋白质变性或沉淀^[5] 因此 过量钴的添加不利于甲烷发酵过程及辅酶浓度的提高。

2.2 不同配合钴对辅酶浓度的影响

微量金属的生物有效性是指微生物能够真正利用的微量金属元素的量。化学配合作用可以保持微量金属元素的溶解状态 从而提高添加钴的生物有效性。本文选择 5 种配体与钴进行配合 考察配合钴对辅酶 F_{420} 和辅酶 M 的影响 不同钴配合物的添加浓度均为 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。5 种氨基酸选择的理由是：甘氨酸（氨基乙酸）是最简单的氨基酸也是最简单的配合物 赖氨酸能与钴形成比较稳定的 1:4 的配合物；半胱氨酸和甲硫氨酸里面含有硫 并且可以被微生物利用^[3] 具有双重营养作用；丝氨酸的结构和辅酶 M 类似^[10] 或许能对微生物的生长起到促进作用 也具有双重营养作用。

图 4 分别给出了不同氨基酸-钴配合物的添加对厌氧污泥产甲烷影响以及辅酶 M 和辅酶 F_{420} 浓度的影响。从图 4(a)可以看出 5 种配体氨基酸均能促进厌氧污泥产甲烷。从图 4(b)和图 4(c)结果可以看出 5 种配体氨基酸(除甲硫氨酸-钴的配合物外)也相应地促进辅酶 M 和辅酶 F_{420} 的产生 其中以丝氨酸-钴配合物的效果最佳。由此可以推断 配合形式钴的添加促进产甲烷菌的生长以及辅酶的产



a—空白 b—丝氨酸-钴配合物 c—赖氨酸-钴配合物 d—半胱氨酸-钴配合物 e—甘氨酸-钴配合物 f—甲硫氨酸-钴配合物

图 4 配合钴对甲烷发酵和辅酶的影响

生,从而促进了厌氧污泥的产甲烷量。对比图 2 和图 4(b) 图 4(c) 中的实验结果可知,添加 1 $\mu\text{mol/L}$ 丝氨酸-钴配合物时的辅酶 M 和辅酶 F_{420} 浓度比直接添加 1 $\mu\text{mol/L}$ Co^{2+} 分别增加了 51.82% 和 25.55%。配合形式钴的添加可以提高钴的生物有效性,避免与体系中的 CO_3^{2-} 、 S^{2-} 、 SO_4^{2-} 发生反应生成难溶沉淀。

2.3 配合钴的添加量对辅酶浓度的影响

以丝氨酸为配体,考察了配合钴的添加量对厌氧污泥产甲烷量影响以及对辅酶 M 和辅酶 F_{420} 的影响,结果如图 5、6 所示。由图 5 可见,产气量先增加后降低。添加 1 $\mu\text{mol/L}$ 丝氨酸-钴的配合物产气量达到 129.5 mL,相比空白样增加 33.64%。当丝氨酸-钴配合物浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时,产气量达到最大,为 154.76 mL,比空白样增加了 60%。辅酶 M 和辅酶 F_{420} 浓度的变化也呈相同的趋势,在添加配合物浓度较高时,污泥中对辅酶浓度的影响更为明显。当丝氨酸-钴配合物浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时,辅酶 M 和辅酶 F_{420} 浓度分别为 110.60 $\mu\text{mol/g}$ 和 0.628 $\mu\text{mol/g}$,比空白样分别增加了 116.82% 和 67.47%。当添加浓度继续增加时,辅酶浓度反而减少。当添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 丝氨酸-钴配合物时,污泥中辅酶 M 和辅酶 F_{420} 浓度分别从 110.60 $\mu\text{mol/g}$ 和 0.628 $\mu\text{mol/g}$ 降低到 72 $\mu\text{mol/g}$ 和 0.398 $\mu\text{mol/g}$ 。

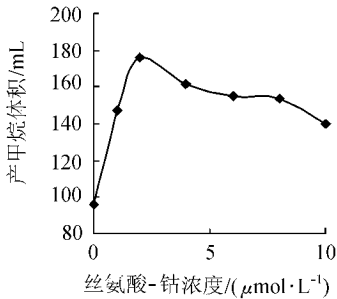


图 5 丝氨酸-钴的添加量对甲烷发酵的影响

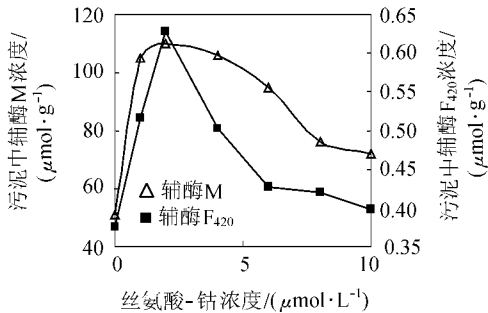


图 6 丝氨酸-钴浓度对辅酶 M 和辅酶 F_{420} 的影响

对比分析图 3 与图 6 中的结果可知,配合钴的添加量对辅酶浓度的影响趋势与直接添加 Co^{2+} 对辅酶浓度的影响趋势基本相似,但影响程度不同。

无论是添加配合钴还是直接添加 Co^{2+} 均能刺激产甲烷菌的生长,提高辅酶的浓度,但在相同钴元素浓度的条件下,配合形式的钴对辅酶的促进作用明显大于直接添加 Co^{2+} 的情形。在各自的最佳添加量下(前者为 2 $\mu\text{mol/L}$,后者为 4 $\mu\text{mol/L}$)辅酶 M 和辅酶 F_{420} 的浓度分别比空白样增加了 116.82%、67.47% 和 17.92%、29.87%。配合态的钴对产甲烷菌的促进作用大于 Co^{2+} ,并且随着添加浓度的增加,配合态钴对产甲烷菌的抑制作用要小于直接添加 Co^{2+} ,即使在添加浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,相对空白样仍具有一定的促进作用。这可能是因为配合形式的钴不易与体系中的 CO_3^{2-} 、 S^{2-} 、 SO_4^{2-} 发生反应生成难溶沉淀,避免了对产甲烷菌的不利影响。

3 结 论

a. 直接投加 Co^{2+} 对产甲烷菌的生长和关键酶的影响存在“低促高抑”效应。最高的辅酶浓度出现在 Co^{2+} 的添加量为 4 $\mu\text{mol/L}$ 时,污泥中辅酶 F_{420} 浓度由空白样的 0.375 $\mu\text{mol/g}$ 提高到 0.487 $\mu\text{mol/g}$,辅酶 M 的浓度则由空白样的 51.01 $\mu\text{mol/g}$ 提高到 60.15 $\mu\text{mol/g}$ 。

b. 投加配合形式的钴对产甲烷菌的生长和关键酶的产生具有更大的影响,同样也存在“低促高抑”现象,其中以丝氨酸-钴配合物的添加对关键酶浓度的影响最为明显。最高的辅酶浓度出现在丝氨酸-钴配合物的添加剂量为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时,污泥中辅酶 F_{420} 的浓度由空白样的 0.375 $\mu\text{mol/g}$ 提高到 0.628 $\mu\text{mol/g}$,辅酶 M 的浓度由空白样的 51.01 $\mu\text{mol/g}$ 提高到 110.60 $\mu\text{mol/g}$ 。

参考文献:

[1] ORENCIO L, FIELD J A, LELLINGA G. Importance of cobalt for individual trophic groups in an anaerobic methanol-degrading consortium[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 227-234.

[2] ZHANG Ya-sheng, ZHANG Zhen-ya. Uptake and mass balance of trace metals for methane producing bacteria[J]. Biomass and Bioenergy, 2003, 25: 427-433.

[3] JENS E S, BIRGOTTE K A. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 49: 229-246.

[4] 胡纪萃. 废水厌氧生物处理理论与技术[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2003.

[5] 伊小波, 连莉文, 徐洁泉, 等. 产甲烷过程的独特酶类及其生化监测方法[J]. 中国沼气, 1998, 16(3): 8-13.

(下转第 91 页)

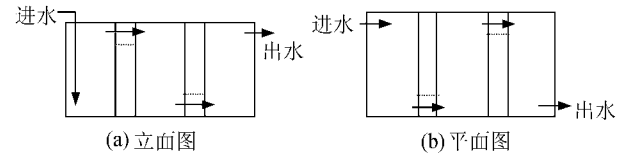


图2 推流式水解池结构示意图

(PAC)投加量 200~300 mg/L。气浮采用部分回流加压系统,回流量为 40%,气浮池前增加 10 min 反应室容积,气水比 2%,溶气压力 3~4 个大气压,溶气时间 3 min,溶气罐内充填瓷环填料,以增加溶气效率^[3]。废水经混凝气浮后, $\rho(\text{COD})$ 降至 150 mg/L 以下。

e. 活性炭吸附能力强,脱色和去除 COD 都十分有效。尽管价格较贵,再生比较困难,但由于其吸附容量大,运行周期长,作为废水深度处理或废水终端处理的把关装置具有突出的优越性。目前在较小规模的污水治理工程中,活性炭吸附装置仍广泛采用。实验和工程运行结果表明,吸附后的废水 $\rho(\text{COD})$ 低于 100 mg/L,达到一级排放标准。

2.3 主要构筑物的设计参数与运行效果

主要构筑物的设计参数见表 2。

表2 主要构筑物的有效容积与水力停留时间

处理单元	有效容积/ m ³	水力停留 时间/h	处理单元	有效容积/ m ³	水力停留 时间/h
废水池	120.0	24.0	水解池Ⅱ	450.0	45.0
中和池	50.0	10.0	好氧池Ⅱ	150.0	15.0
沉淀池	20.0	4.0	气浮池	30.0	1.5
水解池Ⅰ	150.0	30.0	吸附塔	15.7	1.0
好氧池Ⅰ	60.0	12.0			

废水处理工程建成后的处理效果分别见表 3、4。

表3 各处理单元对 COD 处理效果

处理单元	$\rho(\text{COD})$ / (mg·L ⁻¹)	处理单元	$\rho(\text{COD})$ / (mg·L ⁻¹)
沉淀池	5000~6000	好氧池Ⅱ	250~350
水解池Ⅰ	3800~4000	气浮池	120~150
好氧池Ⅰ	1100~1200	吸附塔	85~100
水解池Ⅱ	600~700	总去除率/%	>99

注:水解池Ⅰ、好氧池Ⅰ、水解池Ⅱ、好氧池Ⅱ的数据是出水经沉淀测得。

表4 工程实际运行效果

pH	$\rho(\text{COD}_{\text{Cr}})$ / (mg·L ⁻¹)	$\rho(\text{BOD}_5)$ / (mg·L ⁻¹)	$\rho(\text{SS})$ / (mg·L ⁻¹)	色度/倍
8.2	99	29	30	42
8.5	94	27	35	33
7.9	91	24	43	37
8.1	88	22	40	29

注:表中数据为平均值,采样地点为总排放口。

从表 3 和表 4 可以看出,山梨酸生产废水经石灰中和沉淀、两级水解酸化-好氧处理、混凝气浮、吸附处理后,COD 总去除率达 99% 以上,出水 $\rho(\text{COD})$ 在 100 mg/L 以下,主要污染指标达到 GB 8978—1996《污水综合排放标准》一级排放标准。

3 结 语

a. 山梨酸生产废水经石灰中和沉淀、两级水解酸化-好氧处理、混凝气浮、吸附处理后, $\rho(\text{COD})$ 从 15000 mg/L 降至 100 mg/L 以下,总去除率达 99% 以上,主要污染指标达到 GB 8978—1996 的一级排放标准。

b. 采用石灰中和,辅以空气搅拌,可使一部分污染物转为沉淀物得以去除,一部分可挥发性污染物被吹脱去除,并将废水的 pH 值提高到 7~8,减弱生化处理阶段山梨酸对微生物抑制作用。

c. 采用两级水解酸化-好氧工艺,利用厌氧菌和乳酸菌分解废水中残留的山梨酸,同时兼性细菌(水解菌和产酸菌)可将废水中的大分子有机物分解为易生化的小分子有机物,BOD₅与 COD 之比值从 0.19 提高到 0.30 以上,改善废水的可生化性,为后续好氧处理创造条件,提高了生化处理的整体效果。

参考文献:

[1] 朱红旭,宫素芝,焦健. 山梨酸的合成与应用[J]. 河北轻化工学院学报,1994,15(1):47-53.
[2] 万素英. 食品防腐与食品防腐剂[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998.
[3] 张自杰. 排水工程(下册)[M]. 4 版. 北京:中国建筑工业出版社,2000.
[4] 钱易,米祥友. 现代废水处理新技术[M]. 北京:科学技术出版社,1993.

(收稿日期 2006-12-05 编辑:高渭文)

(上接第 85 页)

[6] JAN D, JAN-WILLEM M. Comparison of methane production rate and coenzyme F₄₂₀ content of methanogenic consortia in anaerobic granular sludge[J]. App Environ Microbiol,1985,49:1142-1145.
[7] DWAYNE A E, LEE R K, RALPH S T, et al. Estimation of methanogen biomass by quantitation of coenzyme M[J]. Applied and Environmental Microbiology,1999,65(12):5541-5545.
[8] 俞毓馨,吴国庆,孟宪庭. 环境微生物检验手册[M]. 北京:中国环境科学出版社,1990.
[9] 国家环保总局. 水和废水分析方法[M]. 3 版. 北京:中国环境科学出版社,1989.
[10] GUNSALUS R P, WOLFE R S. Structure and methylation of coenzyme M (HSCH₂-CH₂-SO₃)[J]. J Biol Chem,1974,249:4879-4885.

(收稿日期 2006-12-01 编辑:高渭文)