

[文章编号] 1003-4684(2022)02-0060-05

枯草芽胞杆菌高细胞密度发酵优化

戴 航^{1,2,3}, 丁 跃^{1,2,3}, 陈 雄^{1,2,3}, 王 志^{1,2,3}

(1 湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室,湖北 武汉 430068;

2 湖北工业大学工业发酵湖北省协同创新中心,湖北 武汉 430068;

3 湖北工业大学工业微生物湖北省重点实验室,湖北 武汉 430068)

[摘 要] 动物益生菌-枯草芽胞杆菌的工业生产存在芽胞率不稳定等问题。在 30 L 罐水平研究不同发酵策略对枯草芽胞杆菌生长效率的影响,确定优化培养基与发酵条件:玉米淀粉 35 g·L⁻¹,豆粕 40 g·L⁻¹,葡萄糖 5 g·L⁻¹,酵母浸粉 3 g·L⁻¹,蛋白胨 8 g·L⁻¹,轻质碳酸钙 3 g·L⁻¹,七水硫酸镁 0.5 g·L⁻¹,氯化钠 2 g·L⁻¹,三水磷酸氢二钾 2 g·L⁻¹,一水硫酸锰 0.3 g·L⁻¹,发酵 24 h 温度从 35℃ 升至 40℃,生物量(36 h)达 217×10⁸ CFU/mL,芽胞数 208 亿个/mL,较优化前分别提高 28.4%、31.6%,为枯草芽胞杆菌工业化生产稳定芽胞率提供重要参考。

[关键词] 枯草芽胞杆菌;芽胞;发酵优化;高细胞密度发酵

[中图分类号] TQ920.1, S435.111 **[文献标识码]** A

益生菌是一类定植于动物肠道、能够对宿主产生健康功效的有益活性微生物,其作用机制大致分为四类:增强肠道黏膜屏障功能^[1]、阻止病原菌的黏附^[2]和定植^[3]、增强系统的免疫反应^[4]、分泌物质^[5]和改变肠道环境^[6]。枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)发酵能够产 α -淀粉酶、 β -葡聚糖酶、蛋白酶等十几种酶^[7],是被允许作为动物饲料添加剂的益生菌菌种^[8-10]。因其芽胞具有极强的抗逆性,常被加工成芽胞菌粉以便运输和保存。采用高密度发酵技术大规模培养非遗传修饰菌是枯草芽胞杆菌工业生产的常用方式,而达到高密度发酵的一般标准是芽胞数达到 200 亿个/mL 的水平。

微生物生长繁殖过程复杂,受到内外部条件共同影响^[11-14]。培养基作为微生物生长代谢的营养基质,其组成成分和比例对细胞生长存在很大影响。赵达等^[15]通过摇瓶发酵培养基优化,确定在 3% 玉米淀粉、6% 豆粕等培养物下,发酵 60~66 h, *B. subtilis* B03 生物量达到 105.7×10⁸ CFU/mL;陈俊煌^[16]优化 *B. subtilis* HS-09 发酵培养基发现,使用复合氮源能显著提高菌落总数,在最适发酵培养基下用 200 L 发酵罐放大试验,有效活菌数达 4.3×10⁹ CFU/mL,芽胞率 90%;朱晓立等^[17]研究了 *B. subtilis* B53 在前期碳限制条件下(0.4% 玉米淀粉、0.2% 葡萄糖)结合流加葡萄糖的补料策略,30 L 罐

培养 26 h,芽胞数最高能达到 110 亿个/mL。

在枯草芽胞杆菌工业生产发酵培养基中,碳氮源是主要的组成部分,其中玉米淀粉、豆粕和蛋白胨的价格是影响发酵成本的主要因素。通过发酵培养基优化确定其比例对菌体生长效率的影响尤为重要。而发酵温度不仅影响酶活性,还影响发酵液的物理特性,从而对菌体产生影响^[18]。Hecker 等^[19]发现热激能够诱导 RelA 蛋白的合成,促发严谨反应。而芽胞生成本身就是细胞对逆境应激的策略之一^[20]。因此适宜的碳氮比和发酵条件以及一定的逆境条件可能会促进芽胞的生成。

基于以上分析,本研究首先在 30 L 罐上采用分批发酵方式探讨不同发酵策略对枯草芽胞杆菌生长的影响,确立了一种有效的发酵方法,为枯草芽胞杆菌的工业化生产提供了重要参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

枯草芽胞杆菌 HT-03(*Bacillus subtilis* HT-03, HT-03 菌株),由发酵工程教育部重点实验室保存。

1.2 培养基

斜面培养基:酵母浸膏 20 g/L,琼脂 20 g/L, NaCl 5 g/L,调 pH 7.5±0.1,123℃ 灭菌 30 min;活

[收稿日期] 2021-03-14

[第一作者] 戴 航(1994-),男,湖北黄冈人,湖北工业大学硕士研究生,研究方向为微生物工程

[通信作者] 王 志(1971-),男,山东招远人,湖北工业大学教授,研究方向为微生物工程

菌数测定(平板计数)培养基同上。

30 L 罐基础(对照)培养基配方为摇瓶正交实验优化后所得配方(g/L):玉米淀粉 30,豆粕 60,葡萄糖 5,酵母浸粉 3,蛋白胨 3,轻质碳酸钙 3,MgSO₄·7H₂O 0.5,NaCl 2,K₂HPO₄·3H₂O 2,MnSO₄·H₂O 0.3。

1.3 培养方法

1.3.1 种子活化 从-80℃冰箱的甘油管转接试管斜面,37℃培养 36 h。

1.3.2 种子制备 向新鲜试管斜面加入无菌水,制备菌悬液,后 80℃水浴 10 min,备用接种,接种量为 10 mL,菌体浓度为 20×10⁸ CFU/mL。

1.3.3 30 L 罐分批发酵培养 发酵体积按罐容积的 60%(18 L)计,121℃,灭菌 30 min。

发酵条件:恒温 35℃,起始转速 500 r/min,通风量 1.0 m³/h,发酵 8 h 转速和通风量调至 800 r/min、2.5 m³/h,发酵 24 h 转速和通风量调至 500 r/min、1.5 m³/h,发酵 30 h 转速和通风量调至 300 r/min、1.0 m³/h。整个发酵周期罐压维持在 0.04~0.05 MPa。

1.3.4 30 L 罐发酵策略 如表 1 所示。

表 1 发酵策略设计

发酵策略	实验方案
1	用基础培养基按发酵参数进行发酵培养
2	将玉米淀粉和豆粕分别调整为 40 g/L、80 g/L,其他同发酵策略 1
3	将玉米淀粉和豆粕分别调整为 40 g/L、50 g/L,其他同发酵策略 1
4	将玉米淀粉、豆粕和蛋白胨分别调整为 40 g/L、50 g/L、8 g/L,其他同发酵策略 1
5	将玉米淀粉、豆粕和蛋白胨分别调整为 35 g/L、40 g/L、8 g/L,其他同发酵策略 1
6	24 h 将发酵温度升至 40℃,其他同发酵策略 5

1.4 检测方法

1.4.1 活菌数的测定 发酵液活菌数(CFU/mL)采用稀释涂布平板法^[21],每间隔 3 h 周期取样检测。

1.4.2 芽胞数的测定 适当稀释的菌液经 80℃水浴 15 min,后进行平板涂布。

1.5 数据处理

实验数据至少是 3 组平行实验的均值,通过 Origin 9.0 对实验数据进行作图分析。

2 结果与分析

2.1 枯草芽胞杆菌在发酵策略 1 下的生长情况

在发酵策略 1 下细胞生长情况如图 1 所示:18~24 h 菌体对数生长,其平均比生长速率 $\mu =$

0.062 h⁻¹^[14],24 h 生物量达到 157×10⁸ CFU/mL,芽胞 155 亿个/mL。

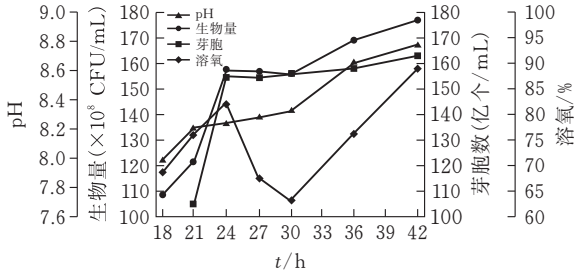


图 1 枯草芽胞杆菌在发酵策略 1 下的生长情况

由于芽胞杆菌对数生长会发生溢流代谢而产生酸,所以 pH 逐渐下降,而后菌体可以利用溢流的有机酸作碳源进行二次生长^[22],再加上基质中氨基酸的消耗,因而 pH 从 18 h 的 7.99 持续回升至 8.78 (42 h)。

18~24 h 溶氧(DO)持续回升至 77.9%,此时降低转速至 500 r/min、通风量至 1.0 m³/h,DO 降至最低值 53.8% (30 h) 后快速上升。30~42 h 生物量略有增加,但 μ 仅有 0.011 h⁻¹。虽然 42 h 生物量达到 177×10⁸ CFU/mL,但芽胞数(163 亿个/mL)较 30 h(155.8 亿个/mL)只提高 4.6%。说明:发酵后期(30 h 之后)基质营养不足以满足菌体生长的需求,并引起细胞耗氧大幅下降,使 DO 于 42 h 回升至 86.3%。由于 30 h 后碳源、氮源等营养基质不能满足菌体大量生长所需,所以生物量和芽胞数均不高,因此接下来可考虑调整碳氮源的比例来考察菌体的生长情况。

2.2 策略 2 对枯草芽胞杆菌生长的影响

在发酵条件、培养基其他成分不变的基础上,仅将基料中的玉米淀粉和豆粕分别提高到 4% 和 8% 形成策略 2,菌体生长代谢情况如图 2 所示:

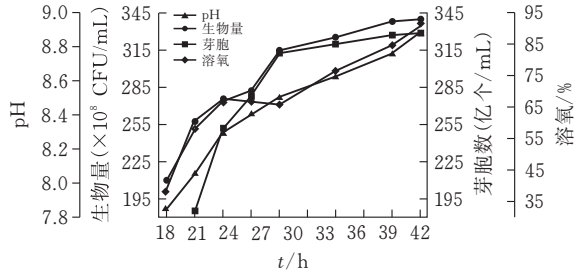


图 2 策略 2 对枯草芽胞杆菌生长的影响

18~24 h 生物量从 210×10⁸ CFU/mL 增长到 274×10⁸ CFU/mL,虽然其 μ 为 0.044 h⁻¹,比策略 1 低 29%(这可能是由于对数前期菌体迅速生长所产生的代谢产物对后期生长有一定抑制作用),但其 24 h 的生物量较策略 1 提高 74.5%。

与策略 1 相似的是:pH 从 18 h(7.85)上升至发酵结束(8.89),不同的是:24 h 以后生物量和芽胞还

在持续增加,说明:增加碳源、氮源的用量能够延长细胞生长周期,提高生物量和芽胞数。芽胞从 21 h 的 185 亿个/mL 增加到 30 h 的 312 亿个/mL,较发酵策略 1 下 30 h 的芽胞数提高 100.3%。

18~24 h 溶氧持续回升至 67.5%,降低转速和通风量后,溶氧基本维持稳定,30 h 后开始上升至发酵终点 91.3%。虽然 30~42 h 芽胞数有所提高,但培养 12 h 只提高了 4.8%,42 h 后维持稳定。因此在策略 2 条件下可考虑发酵终点选在第 30 h。

虽然 30 h 芽胞数达到 312 亿个/mL,但由于基料浓度高,导致发酵液粘度增大,不仅使成本升高,而且对发酵下游加工处理带来较大困难。因此,考虑减少配方用料,考察菌体的生长情况。

2.3 策略 3 对枯草芽胞杆菌生长的影响

豆粕用量降至 5%(发酵策略 3)菌体生长情况如图 3 所示。

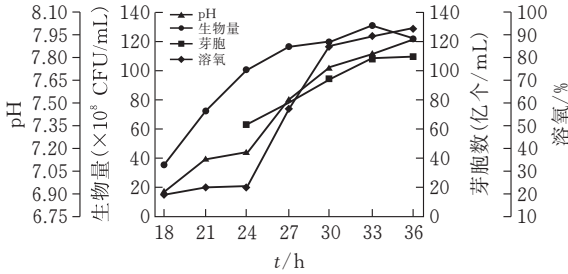


图 3 策略 3 对枯草芽胞杆菌生长的影响

18~33 h 的生物量一直在增加,但 30 h 仅有 119×10^8 CFU/mL,较发酵策略 2 下 30 h 的生物量 (315×10^8 CFU/mL)减少近 62%、较发酵策略 1 减少 24%。33 h 生物量达到峰值 130×10^8 CFU/mL 后有略微下降。18~33 h 菌体平均生长速率为 6.33×10^8 CFU · (mL · h)⁻¹较策略 2 下 18~30 h 的平均生长速率 (8.75×10^8 CFU · (mL · h)⁻¹)下降 27.7%。18 h 以后 pH 持续回升,但 pH 均低于发酵策略 1 和 2,36 h 取样结束时的 pH 为 7.92。

18~24 h 溶氧缓慢上升,24 h 降低转速和通风量后,溶氧上升较快,这与菌体生长速率逐渐减小的趋势保持一致。

另外,24 h 之前几乎还未形成芽胞,且 30 h 的芽胞数仅有 94 亿个/mL,较策略 1 和 2 减少 40%、70%。33 h 芽胞数达到 108 亿个/mL,此时芽孢率也仅有 83%。相较于策略 1,虽然玉米淀粉由 3% 增加至 4%,但豆粕由 6% 减少至 5%,生物量和芽胞数都有所下降,这可能是由于氮源对枯草芽胞杆菌后期的生长和芽胞生成影响较大。相较于策略 2,由于培养基中豆粕减少了 37.5%,所以可供菌体用于生长繁殖和形成芽胞所需的氮源大量减少,不足以维持菌体高密度发酵以及有效生成芽胞。

2.4 策略 4 对枯草芽胞杆菌生长的影响

既然豆粕减少至 5%不能满足高密度发酵所需的条件,那么接下来可考虑微调其他氮源的用量来考察其对菌体生长的影响。

在策略 3 的基础上,将蛋白胨的用量从 0.5% 增加到 0.8% 形成策略 4。菌体生长情况如图 4 所示:18~36 h 生物量从 122×10^8 CFU/mL 持续上升至 252×10^8 CFU/mL,平均生长速率为 7.22×10^8 CFU · (mL · h)⁻¹,36 h 后有略微增加。36 h 的芽胞数 (198 亿个/mL)较策略 3 提高近 82%,42 h 芽胞数达到 210 亿个/mL,较策略 1 (163 亿个/mL)提高 29%。

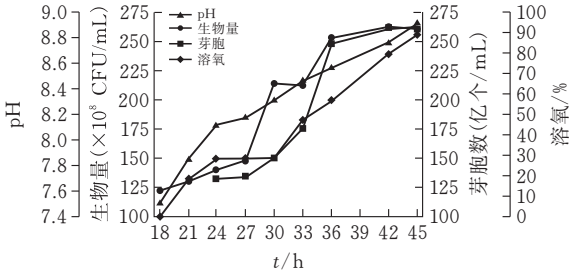


图 4 策略 4 对枯草芽胞杆菌生长的影响

与策略 3 一样,18 h 之后 pH 持续回升,但 pH 值均高于策略 3,发酵终点 45 h 的 pH 为 8.91。24 h 调低转速和通风量后,溶氧维持在 30% 左右,这可能是由于菌体还在缓慢生长,因此 6 h 之内耗氧和溶氧速率基本相等,二者处于动态平衡。

蛋白胨中含有丰富的蛋白质、氨基酸、生长因子和微量元素等营养成分。微调增加了 0.3% 后,菌体生长速率较策略 3 有明显提高,且芽胞数高于策略 3。

2.5 策略 5 对枯草芽胞杆菌生长的影响

将策略 4 中玉米淀粉和豆粕的用量从 4%、5% 分别降低到 3.5%、4% 形成策略 5。菌体生长情况如图 5 所示:18 h 的 pH 值为 7.43 与策略 4 相近,但与策略 4 不同的是,30 h 之前回升较快,与溶氧变化趋势一致,这可能是由于溢流的有机酸较少,消耗较快,到后期营养不足,菌体生长变缓。虽然 18 h 的生物量 (94×10^8 CFU/mL) 只有策略 4 的 77%,但 42 h 生物量 (236×10^8 CFU/mL)较策略 4 只减少 10%。42 h 芽胞数较策略 4 仅减少 6.7%,较策略 1 提高 20.2%。策略 4 的 36 h 芽胞数为 198 亿个/mL,而策略 5 发酵 42 h 芽胞也能达到 196 亿个/mL,只是发酵周期较策略 4 延长了 6 h。因而需要考虑采用工艺参数优化来缩短发酵周期。

2.6 策略 6 对枯草芽胞杆菌生长的影响

基于策略 5,发酵 24 h 将温度从 35℃ 升至 40℃ 形成策略 6,考察一定的逆境条件对细胞生长情况

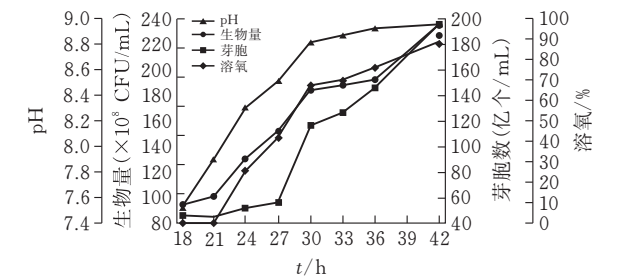


图 5 策略 5 对枯草芽胞杆菌生长的影响

的影响(图 6):18~24 h 生长情况如策略 5 基本一致,18 h 的 pH 值 7.37,后持续上升至发酵结束(42 h)为 8.65,略微低于策略 5。24 h 升温后,虽然 27 h 生物量只比策略 5 高 5.2%,但此时芽胞数(82 亿个/mL)较策略 5 提高了 46.4%。同时,芽胞率也比策略 5 提高了 39%。36 h 芽胞达 208 亿个/mL,较策略 5 提高 42.5%。发酵 24 h 降低转速和通风量后溶氧依然在上升,这可能是由于菌体进入对数生长后期,胞内能量代谢水平降低,对溶氧需求逐渐下降造成。

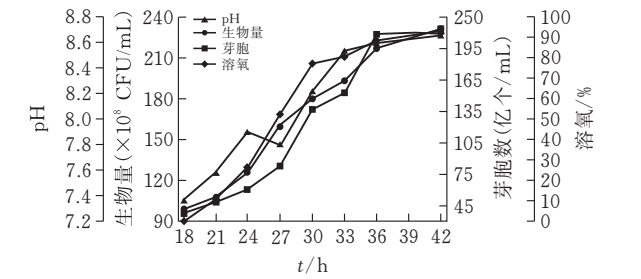


图 6 策略 6 对枯草芽胞杆菌生长的影响

以上数据表明:策略 6 芽胞数达到 200 亿个/

mL 左右用时(36 h)比策略 5 减少近 15%,与策略 4 接近,但其碳、氮源较策略 4 分别下降 12.5%、20%,生产成本显著降低。

2.7 不同策略对枯草芽胞杆菌生长的影响

不同策略对枯草芽胞杆菌生长的影响如表 2 所示。

升温能促进芽胞生成效率,但对细胞生长没有促进效果(策略 6 和策略 5)。策略 1 发酵 42 h 生物量为 177×10^8 CFU/mL,未达到高密度最低要求。即使升温缩短了芽胞生成周期、提高了芽胞率,仍不能达到高密度发酵水平(芽胞数 200 亿个/mL),因此未研究策略 1 下升温处理对细胞生长代谢的影响。

策略 2 枯草芽胞杆菌生物量和芽胞数最高,24 h 芽胞数就已达到 251 亿个/mL,但在此条件下成本较高。策略 3 生物量和芽胞数最低,36 h 芽胞数仅有 109 亿个/mL。策略 4 发酵 36 h 芽胞数达到 198 亿个/mL,将策略 4 中的玉米淀粉和豆粕分别降低 0.5% 和 1%(策略 5)发酵 42 h 芽胞数达到 196 亿个/mL,虽然周期延长了 6 h,但碳氮源分别减少了 12.5% 和 20%,发酵成本降低。在策略 5 基础上,24 h 将发酵温度从 35℃ 升至 40℃,发酵 36 h 芽胞数达到 208 亿个/mL,与策略 4 相近。

另外,策略 6 发酵 36 h,细胞数达 217×10^8 CFU/mL,芽胞数 208 亿个/mL,其发酵效率相比赵达等^[15]、陈俊煌^[16]、朱晓立等^[17]的报道显著提高。

表 2 不同策略对枯草芽胞杆菌生长的影响

策略编号	发酵 36 h		发酵 42 h	
	生物量 ($\times 10^8$ CFU/mL)	芽胞数 (亿个/mL)	生物量 ($\times 10^8$ CFU/mL)	芽胞数 (亿个/mL)
1	169	158	177	163
2	325	320	338	327
3	121	109	—	—
4	252	198	262	210
5	192	146	236	196
6	217	208	231	210

3 结论

枯草芽胞杆菌高密度发酵中,培养基和发酵条件对细胞生长和芽胞生成具有很重要的影响。本研究在已确定摇瓶水平最适发酵培养基以及发酵温度的基础上,进一步通过优化发酵策略确定了 30 L 罐分批发酵工艺参数:玉米淀粉 $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 豆粕 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母浸粉 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 轻质碳酸钙 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 七水硫酸镁 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钠 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 三水磷酸氢二钾

$2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 一水硫酸锰 $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 发酵 24 h 温度从 35℃ 升至 40℃。发酵 36 h, 细胞数达 217×10^8 CFU/mL, 芽胞数 208 亿个/mL, 较优化前分别提高 28.4%、31.6%, 实现了低成本培养基配方条件下的高芽胞率高密度发酵, 为枯草芽胞杆菌工业化生产稳定芽胞率提供了重要参考。

另外, 细胞是否开始形成芽胞是由内外环境条件共同决定的, 与调控因子 Spo0A 含量和其磷酸化水平有关^[23]。由于枯草芽胞杆菌呼吸代谢过程存在氧化应激^[24], 而氧化应激会对电子传递链造成损

伤,影响细胞的能量供应效率^[25-26]。进而可能会对芽胞生成效率产生影响,因而该领域的研究有待进一步展开。

[参 考 文 献]

[1] BISCHOFF S C. 'Gut health': a new objective in medicine? [J]. BMC Medicine, 2011, 9(1): 24.

[2] WU X, VALLANCE B A, BOYER L, et al. *Saccharomyces boulardii* ameliorates *Citrobacter rodentium*-induced colitis through actions on bacterial virulence factors [J]. Gastrointestinal and Liver Physiology, 2008, 294(1): G295-G306.

[3] MACK R D. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro[J]. Gut, 2003, 52(6): 827-833.

[4] PATEL R M, LIN P W. Developmental biology of gut probiotic interaction[J]. Gut Microbes, 2010, 3(1): 186-195.

[5] 操银红. 益生菌的作用机理及功能的研究进展[J]. 生物技术世界, 2015(5): 39-45.

[6] MIAO S, ZHU J, ZHAO C, et al. Effects of C/N ratio control combined with probiotics on the immune response, disease resistance, intestinal microbiota and morphology of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. Aquaculture, 2017, 47(6): 125-133.

[7] 马明, 杜金华. 枯草芽孢杆菌酶在工业生产中的应用[J]. 山东科学, 2006, 19(3): 35-38.

[8] 王宗伟, 李法增, 杨志平, 等. 枯草芽孢杆菌在畜禽营养上的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(1): 80-83.

[9] 王景会, 李达, 姜媛媛, 等. 枯草芽孢杆菌 JAASB4 的安全性评价[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(5): 102-103, 112.

[10] 王苇, 秦瑶, 李爽, 等. 枯草芽孢杆菌微生态制剂的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(11): 217-220.

[11] 周映华, 吴胜莲, 贺月林, 等. 饲用枯草芽孢杆菌发酵条件的优化[J]. 湖南农业科学, 2010(11): 21-23.

[12] 胡红伟, 段明房, 闫凌鹏, 等. 一株枯草芽孢杆菌的鉴定及液体发酵工艺优化[J]. 中国饲料, 2017(5): 13-19.

[13] 王佳佳, 曹克强, 王树桐. 枯草芽孢杆菌 Bs-0728 菌株

发酵条件的优化[J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(6): 64-68.

[14] 康兴娇, 贾招闪, 申红妙, 等. 内生枯草芽孢杆菌 CN181 发酵条件优化[J]. 山东农业大学学报, 2016, 47(5): 647-653.

[15] 赵达, 刘伟成, 裘季燕, 等. 枯草芽孢杆菌 B03 液体发酵条件的优化[J]. 华北农学报, 2008, 23(2): 205-209.

[16] 陈俊煌. 枯草芽孢杆菌 HS-09 产芽孢发酵培养基的优化[J]. 福建农业科技, 2020(10): 16-21.

[17] 朱晓立, 俞巍蔚. 30 L 发酵罐培养枯草芽孢杆菌产高密度芽孢的研究[J]. 当代化工研究, 2016(7): 54-55.

[18] 刘子宇, 李平兰, 郑海涛, 等. 微生物高密度培养的研究进展[J]. 乳品加工, 2005(12): 47-51.

[19] HECKER M, VOLKER U, HEIM C. RelA-independent (p)ppGpp accumulation and heat shock protein induction after salt stress in *Bacillus subtilis* [J]. FEMS Microbiology Letters, 1989, 58: 125-128.

[20] PIGGOT P J, HILBERT D W. Sporulation of *Bacillus subtilis* [J]. Current opinion microbiology. 2004, 7(6): 579-586.

[21] 杨生玉, 王刚, 沈永红. 微生物生理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 244-245.

[22] PACZIA N, NILGEN A, LEHMANN T, et al. Extensive exometabolome analysis reveals extended overflow metabolism in various microorganisms[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 122.

[23] BURBULYS D, TRACH K A, HOCH J A. Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* controlled by a multi-component phosphorelay [J]. Cell, 1991, 64(3): 545-552.

[24] IMLAY J A. How Oxygen Damages Microbes: Oxygen Tolerance and obligate anaerobiosis[J]. Advances in Microbial Physiology, 2002, 46: 111-153.

[25] IMLAY J A, FRIDOVICH I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(11): 6957-6965.

[26] MESSNER K R, IMLAY J A. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(15): 10119-10128.

(下转第 74 页)