

溶菌酶与 α -MnO₂ 间的界面吸附作用

蔡爱军^{1,2}, 马子川^{1,3,*}, 刘敬泽^{1,*}

(1. 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016; 2. 河北科技师范学院生命科学系, 秦皇岛 066000;

3. 河北师范大学化学与材料科学学院, 石家庄 050016)

摘要:研究了溶菌酶(LSZ)与 α -MnO₂ 的界面吸附作用及其影响因素。结果表明,体系 pH 值是影响 LSZ 在 α -MnO₂ 表面吸附、脱附的重要因素。在 pH 3.8 ~ 10.8 范围内,LSZ 的吸附率随着体系 pH 值的升高而大致呈上升趋势。在较低 pH 值范围内(pH < 7.1),LSZ 的脱附率随 pH 的升高增幅较大;在较高 pH 值范围内(pH > 7.1),LSZ 的脱附率则随 pH 的升高而略微下降。但是,LSZ 自 α -MnO₂ 表面的脱附率在各 pH 值下均处于较低水平,吸附反应具有较高的不可逆性。LSZ 在 α -MnO₂ 表面的吸附率随离子强度的增大而增大,然而 Na⁺、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 3 种离子对 LSZ 吸附率的影响没有差别。LSZ 的等温吸附曲线符合 Langmuir 吸附方程式,形状呈 L 型。FTIR 进一步证明, α -MnO₂ 表面的确有 LSZ 分子吸附;吸附态 LSZ 分子的空间构象发生了改变。

关键词:LSZ; α -MnO₂; 吸附; 脱附

文章编号:1000-0933(2008)11-5684-07 中图分类号:X171.1 文献标识码:A

The adsorption of lysozyme on the surface of α -MnO₂

CAI Ai-Jun^{1,2}, MA Zi-Chuan^{1,3,*}, LIU Jing-Ze^{1,*}

1 College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

2 Department of Life Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066000, China

3 College of Chemistry and Material Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(11): 5684 ~ 5690.

Abstract: In this work, the adsorption of lysozyme(LSZ) on the α -MnO₂ and by which factors this process is affected were investigated. The results showed that the system pH value was a most important factor affecting adsorption and desorption of LSZ. In the pH range of 3.8 to 10.8, the adsorption percentage of LSZ on α -MnO₂ was increased as pH value raised. The desorption percentage of lysozyme usually increased at low pH condition (pH < 7.1) but slightly decreased at high pH condition (pH > 7.1). However, the desorption percentage was generally low at all pH values tested, indicating the irreversibility of protein adsorption to the surface of α -MnO₂. We also found increasing the ionic strength might increase the LSZ adsorption percentage, but there was no difference on effects of Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ on this adsorption. The LSZ adsorption isotherm belonged to the L type, and was fitted well by the Langmuir model. FTIR spectra further approved that LSZ was attached to the surface of mineral, and the spacial structure of attached protein was changed.

Key Words: lysozyme; α -MnO₂; adsorption; desorption

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(2005037630)

收稿日期: 2008-03-06; 修订日期: 2008-07-10

作者简介: 蔡爱军(1980 ~), 男, 河北人, 实验师, 主要从事环境生态学研究. E-mail: caiaijun80@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ma_zichuan@163, jzliu21@heinfo.net

Foundation item: The project was financially supported by National Postdoctoral Science Foundation of China (No. 2005037630)

Received date: 2008-03-06; **Accepted date:** 2008-07-10

Biography: CAI Ai-Jun, Experimentalist, mainly engaged in environmental ecology. E-mail: caiaijun80@163.com

蛋白质是组成天然有机质的一类重要生物大分子物质,主要来源于人类生产与生活活动中产生的排放物、植物和动物细胞产生的分泌物^[1~3]以及微生物^[4~6]等。受自然和人类活动的影响,蛋白质等生物大分子物质在天然环境(如水体、土壤)中有广泛分布^[7],但是除一部分以游离状态存在外,大多数是以物理化学方式吸附在有机物和无机物表面,或与腐殖质类混合物形成更为复杂的配合物。它们与生态环境中颗粒物的界面作用不仅影响自身的浓度、迁移、转化、生物功能及生物有效性,而且对其它共存的有毒污染物,尤其是持久性有机污染物(POPs)的环境行为产生重要影响。因此,系统开展蛋白质在固/液界面上的研究具有重要的环境学和生态学意义。

锰氧化物是表生环境中常见的矿质颗粒物,广泛存在于土壤、沉积物及水体悬浮颗粒物中^[8,9],对重金属和某些有机物具有强烈的化学活性,是影响重金属和有机物在环境中的迁移、转化及归宿的重要物质^[7,10~12]。这些结果说明,锰氧化物具有丰富的表面活性中心,它们对蛋白质这类天然有机质(NOM)应具有一定的吸附能力和吸附不可逆性,但这方面的研究报道很少^[13]。

蔡爱军等研究过牛血清白蛋白(BSA)与 α - MnO_2 的界面吸附作用,并发现了一些吸附规律^[14]。然而,按照内部的结构稳定性来分,蛋白质可分为软蛋白(soft protein)和硬蛋白(hard protein)两大类^[15]。溶菌酶(LSZ)是一种碱性球蛋白,由 18 种氨基酸组成,分子中碱性氨基酸残基及芳香族氨基酸的比例很高。其最适 pH 值为 pH7 左右,最适温度为 50℃。它广泛存在于自然界动植物和微生物中,是一种典型的硬蛋白,其吸附行为与软蛋白 BSA 有较大差异^[16,17]。本文通过研究溶菌酶与 α - MnO_2 间的界面吸附作用及影响因素,并充分运用傅立叶变换红外光谱技术(FTIR)对实验样品进行表征,以期为进一步探寻硬蛋白类在环境介质间的迁移转化行为及其所产生的生态环境效应提供理论依据。

1 材料、试剂与方法

1.1 材料及试剂

溶菌酶(LSZ)购自美国 Sigma 公司,纯度 99%。实验中用到的考马斯亮蓝 G-250、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 KMnO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、 H_2SO_4 、HAc、NaAc、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 NaN_3 、 H_3PO_4 和 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 等均为分析纯试剂。溶液用去离子水配制。

1.2 蛋白质溶液的配制

用缓冲溶液配制浓度均为 1mg/ml 的各种 LSZ 贮备液。其中,pH 为 3.8、4.6 时使用 0.05 mol/L 的醋酸/醋酸钠缓冲液配制;pH 为 6.3、7.1、8.0 时使用 0.05 mol/L 的磷酸氢二钠/磷酸二氢钠缓冲液配制;pH 为 10.8 时使用 0.05mol/L 的碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液配制。实验时用相应的缓冲溶液稀释至不同的浓度使用。为防止生物污染,LSZ 贮备液中加入 0.02% 的迭氮化钠,同时保存在 4℃ 的冰箱中。蛋白浓度采用 Bradford 法测定。

1.3 α - MnO_2 的制备

参照文献^[18],将 4g 的 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 10ml 1mol/L 的 H_2SO_4 溶液加入到 70ml 水中,加热至沸腾,搅拌下加入 9g $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 固体,继续搅拌 30min,停止加热并静置陈化 5h,再离心(5000r/min,15min)及用适量的去离子水分散洗涤 5 次。最后,用去离子水配制成 4g/L 的贮备液备用。

对合成的 α - MnO_2 进行 XRD 表征和 SEM 电镜观察,证明制备的吸附剂与文献一致。 α - MnO_2 颗粒呈针状,粒子的平均大小约为 800 nm \times 15 nm(长轴 \times 短轴),BET 比表面积为 31.12m²/g。使用 Zetasizer 3000 型 Zeta 电位测定仪(法国 Malvern 公司)测定 α - MnO_2 表面电位性质。

1.4 吸附、脱附、 ζ 电位的测定和红外光谱分析

1.4.1 吸附实验

在一系列的 10ml 离心管中,加入 2ml 吸附剂颗粒物悬浮液,然后分别加入 pH 为 3.8、4.6、6.3、7.1、8.0、10.8 的 0.3ml LSZ 贮备液,最后,补加相应的缓冲液至总体积为 4ml。将反应样品于 20℃,100r/min 条件下恒温振荡 24h,使达到吸附平衡。8000r/min 离心 15min,分离上清液,测定 LSZ 浓度,用差减法计算吸附量。这

一实验用来研究 pH 对 LSZ 吸附的影响。

研究离子强度对吸附的影响时,在 10ml 离心管中加入 2ml 吸附剂颗粒物悬浮液,取 pH4.6 的 0.3ml LSZ 贮备液,在缓冲液中加入 NaCl 使其最终浓度分别为 0、0.03 和 0.2mol/L,进行对比实验。本实验为研究离子种类对蛋白质吸附的影响,分别选取 NaCl、CaCl₂ 和 MgCl₂ 作为支持电解质,以便分别提供 Na⁺、Ca²⁺ 和 Mg²⁺。在 pH4.6 条件下进行吸附实验,然后计算蛋白吸附率,比较影响效果。

以上实验处理均重复 3 次。

1.4.2 脱附实验

对上述在不同 pH 下进行的实验样品,离心分离后仔细取出 2ml 上清液,然后加入 2ml 相应 pH 的空白缓冲溶液,在 20℃ 下 100r/min 恒温振荡 24h,使达到脱附平衡。8000r/min 离心 15min 分离上清液,测定 LSZ 浓度,用差减法计算脱附率。该实验同样处理 3 次。

1.4.3 吸附剂颗粒物 ζ 电位的测定

用相应的缓冲溶液配制固体浓度为 60mg/L 的 α -MnO₂ 悬浮液,平衡 24h 后使用 Zetasizer 3000 型 Zeta 电位测定仪(法国 Malvern 公司)测定颗粒物的 ζ 电位;LSZ 吸附实验后对矿物样品也进行同样的 ζ 电位测定,实验物质比例为 LSZ/ α -MnO₂ = 1/1.3(m/m)。每个试样均处理 3 次。

1.4.4 红外光谱分析

使用 8900 型 FTIR 光谱仪(日本岛津公司)对样品进行检测。为便于检测,特增大 LSZ 的初始浓度(500 μ g/mL)。吸附实验结束后,将待测的实验样品在 35℃ 下真空干燥 9h, KBr 提前在 120℃ 下烘干 2h,以消除游离水产生的干扰。检测时采用 KBr 压片法测定,波长范围为 350 ~ 3500cm⁻¹,样品/KBr = 1/40(m/m)。

2 结果与讨论

2.1 pH 对 LSZ 吸附性能的影响

图 1 表示体系 pH 对 LSZ 吸附性能的影响。由图可知,溶液 pH 值对 LSZ 在 α -MnO₂ 表面的吸附有较大影响。在 pH3.8 ~ 10.8 范围内,LSZ 的吸附率随着溶液 pH 值的升高而大致呈上升趋势。

静电作用是蛋白质发生吸附的主要机制之一^[19]。因此,本文测定了 pH 对颗粒物带电性质的影响,以研究介质的 pH 对颗粒物表面荷电性质的影响。图 2 为 α -MnO₂ 在吸附 LSZ 前后的 ζ 电位变化情况。由图可见,供试体系中 α -MnO₂ 表面带有负电荷,而 LSZ 的等电点 pI 值为 11.1^[20],在供试溶液条件下分子表面带有正电荷,即与 α -MnO₂ 表面带有相反电荷。 α -MnO₂ 的电荷零点(PZC)为 pH2^[21],吸附带有异种电荷的 LSZ 后其等电点有变大趋势。这种现象与 LSZ 对羟基铝包被二氧化硅颗粒物的影响趋势相似^[22]。实际上,Ding 等^[23]研究 LSZ 在二氧化硅纳米管上的吸附行为时发现,供试材料吸附 LSZ 后的 PZC 值升高并且随吸附蛋白量的

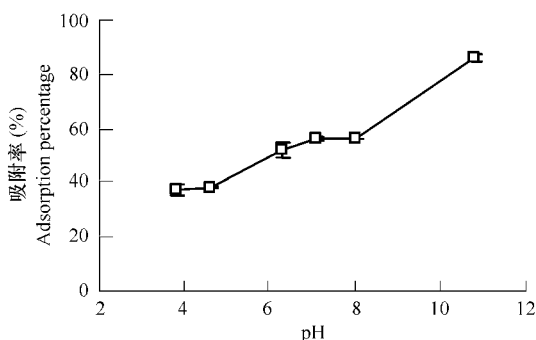


图 1 pH 对 LSZ 在 α -MnO₂ 上吸附的影响

Fig. 1 Effect of pH on the adsorption of LSZ onto the surface of α -MnO₂

LSZ 初始浓度 75 μ g/ml, 20℃ Initial concentration of LSZ 75 μ g/ml, 20℃

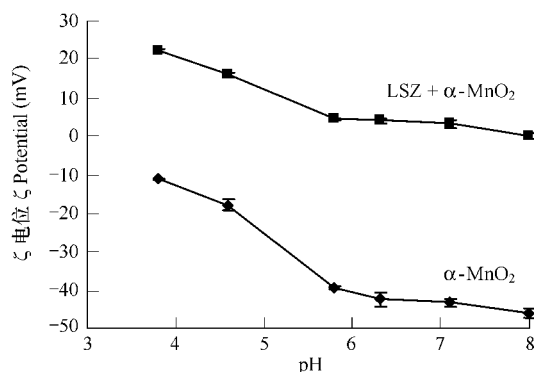


图 2 ζ 电位随 pH 变化情况

Fig. 2 Effect of pH on the ζ potentials of α -MnO₂ before and after LSZ adsorption

增加而增大,并认为静电作用力是主要作用机制。本实验在后面的 FTIR 检测中发现,尽管 LSZ 是一种硬蛋白,内部结构稳定性比较高,但是吸附反应后其空间结构仍有所改变。而吸附态 LSZ 在二氧化硅纳米管表面却能够保留较为完整的二级结构^[23]。这说明,除静电作用力外蛋白质的构象变化在本实验中可能具有一定作用。

2.2 pH 对 LSZ 脱附性能的影响

图 3 表示 pH 对 LSZ 自 α -MnO₂ 表面脱附的影响。由图可见,在 pH3.8 ~ 10.8 范围内 LSZ 的脱附率均较低。pH7.1 时达到最大值,仅为 18.6%,这说明 α -MnO₂ 与 LSZ 的结合力较强,它们之间的吸附反应具有较高的不可逆性。这与软蛋白 BSA 在 α -MnO₂ 上的吸附情况类似^[14]。pH3.8 时吸附在 α -MnO₂ 表面的 LSZ 则几乎不发生脱附。这表明此时 α -MnO₂ 与 LSZ 的结合力很强,吸附反应几乎是不可逆的。

体系 pH 变化对吸附态 LSZ 的脱附有一定影响。在较低 pH 值范围内 (pH < 7.1), LSZ 的脱附率随 pH 的升高而锐增,吸附态 LSZ 的脱附对这一区间段内 pH 的变化敏感;在较高 pH 值范围内 (pH > 7.1), LSZ 的脱附率随 pH 的升高而略微下降。

2.3 离子强度对 LSZ 吸附性能的影响

本文以蛋白质的初始浓度为 75 μ g/ml,在 pH = 4.6 时的吸附体系为例,测定了无 NaCl、NaCl 浓度为 0.03 和 0.2 mol/L 条件下,LSZ 在 α -MnO₂ 表面上的吸附率 (图 4)。由图可见,LSZ 在 α -MnO₂ 上的吸附率均随 NaCl 浓度 (即离子强度) 的增大而增大,这与以往对软蛋白类进行的研究情况恰好相反^[14]。

离子强度可以通过改变静电作用力而影响蛋白质的吸附情况。增加离子强度可减少带有同种电荷物质间的静电斥力,也可以减弱带有异种电荷物质间的静电引力^[19]。蛋白质吸附在带有相反电荷的矿质颗粒物表面时,吸附量应该随离子强度的增加而减少。LSZ 的等电点 pI = 11.1^[24],在本实验条件下 LSZ 带有正电荷,然而它在 α -MnO₂ 表面的吸附率却随离子强度的升高出现增大趋势,这说明可能存在其它非静电引力作用参与反应过程,而静电引力并不主导蛋白质在供试矿物上的吸附。实际上,LSZ 在甲基丙烯酸羟乙酯 (2-hydroxyethyl methacrylate) 表面的吸附也出现过类似变化^[25],可能是由于盐的加入导致蛋白分子构象发生改变造成的^[26]。尽管离子强度对 LSZ 与 BSA 两类蛋白质吸附率的影响不同,但是蛋白质本身的构象变化均是重要原因^[14]。

2.4 离子种类对 LSZ 吸附性能的影响

2.4 离子种类对 LSZ 吸附性能的影响

图 5 表示溶液 pH4.6 条件下不同离子对 LSZ 在 α -MnO₂ 上的吸附率影响效果 (LSZ 初始浓度 75 μ g/ml)。添加 CaCl₂ 和 MgCl₂ 后, Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 这两种二价阳离子并未改变 LSZ 在 α -MnO₂ 表面的吸附率。

通常认为,高价离子比单价离子更容易压缩有机质空间结构,使有机分子尺寸变小,单位矿物表面容纳的有机质分子数增加^[27]。Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 可能通过静电作用力在吸附态蛋白与金属钛表面之间建立盐桥,因此比

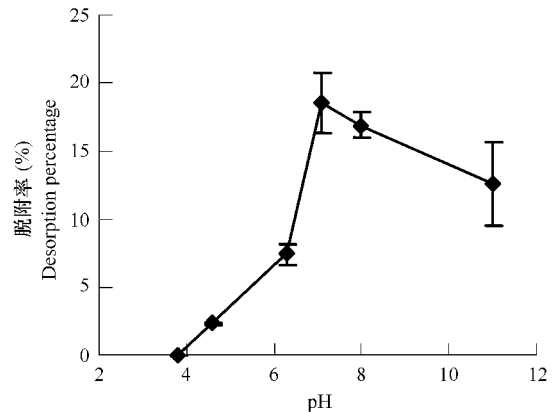


图 3 pH 对 LSZ 在 α -MnO₂ 上脱附的影响

Fig. 3 Effect of pH on the desorption of LSZ onto the surface of α -MnO₂

LSZ 初始浓度 75 μ g/ml, 20 $^{\circ}$ C Initial concentration of LSZ 75 μ g/ml, 20 $^{\circ}$ C

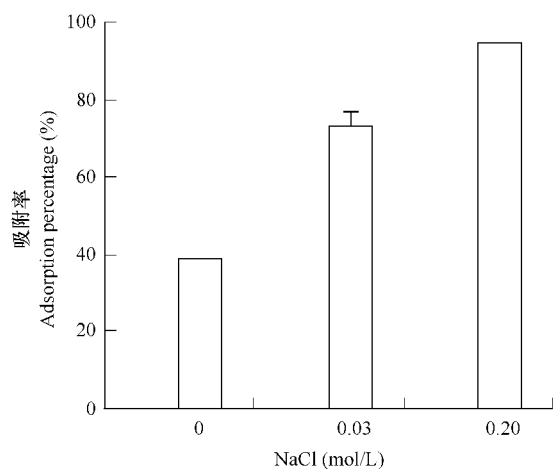


图 4 NaCl 浓度对蛋白质吸附的影响

Fig. 4 Effect of NaCl concentration on protein adsorption

单价阳离子更易提高人免疫球蛋白 IgG 在钛表面的吸附^[28]。然而, Duinhoven 等^[29]认为, 二价阳离子对蛋白质分子本身有屏蔽作用, 同时对矿物表面性质也有一定影响, 所以有时也会降低蛋白质吸附量。本实验中 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对 LSZ 吸附既没有起到促进作用, 也没有减弱功能, 这可能是由于上述两种作用力之间达到了平衡状态。

2.5 LSZ 在 $\alpha\text{-MnO}_2$ 表面的等温吸附

图 6 表示 LSZ 在 $\alpha\text{-MnO}_2$ 表面的等温吸附曲线。根据 Giles 的等温吸附曲线分类^[30], 该种等温吸附曲线属于 L 型, 即 LSZ 吸附量随体系中蛋白质浓度的增加而缓慢上升, 并逐渐趋于饱和吸附。

Langmuir 方程式在有机质吸附研究中应用较为广泛^[25, 31~33]。公式为:

$$Q = Q_{\max} KC / (1 + KC) \quad (1)$$

式中, Q 和 C 分别表示蛋白质吸附量及蛋白质平衡浓度, Q_{\max} 代表最大吸附量, K 为吸附常数。

本实验数据经上述方程拟合, 得到 Q_{\max} 和 K 值分别为 $51.282 \mu\text{g}/\text{mg}$, $0.053 \text{ ml}/\mu\text{g}$ 。相关系数 $R^2 > 0.99$, 这说明用 Langmuir 方程可以很好地描述 LSZ 在 $\alpha\text{-MnO}_2$ 表面的吸附过程。

2.6 FTIR 光谱研究

图 7 表示 LSZ 在 $\alpha\text{-MnO}_2$ 表面吸附后各物质的 FTIR 谱图。从纯 LSZ 的红外光谱图中可以看出, 1643 cm^{-1} 为酰胺 I 带的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动, 1535 cm^{-1} 为酰胺 II 带反式 NH 面内变形振动峰。 1238 cm^{-1} 与酰胺 III 带中 νCN 、 δNH 、 νCC 和 δCH_2 有关^[13]。 3412 、 3069 cm^{-1} 和 $2963 \sim 2876 \text{ cm}^{-1}$ 间的吸收峰分别由 νNH 、 νOH 和 νCH 造成。 1450 cm^{-1} 与对称 COO^- 伸缩和 $\nu(\text{CN})$ 有关, 1400 cm^{-1} 为 $-\text{OH}$ 的伸缩振动^[34]。 1169 cm^{-1} 可能是由于 CO 的伸缩振动造成^[35]。 932 cm^{-1} 和 618 cm^{-1} 均表示 CH 与 CH_2 的弯曲振动。此外, 由于大气中 CO_2 干扰, LSZ 的红外光谱图中也出现 2361 cm^{-1} 处的吸收峰。

在 $\alpha\text{-MnO}_2$ 的红外光谱图中, 3414 cm^{-1} 出现 $\text{O}-\text{H}$ 的伸缩振动, 1638 cm^{-1} 和 1616 cm^{-1} 处的吸收峰则对应 $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ 键的弯曲振动, 这些峰同时出现表明其表面含有结合水^[36~38]。 1400 cm^{-1} 为 $-\text{OH}$ 的伸缩振动^[34, 39], 在 525 cm^{-1} 处出现的吸收峰是由 MnO_2 晶胞中 $\text{Mn}-\text{O}$ 键振动造成的。

通过比较各种物质的谱图可知, 吸附 LSZ 后, $\alpha\text{-MnO}_2$ 上的本体羟基峰降低了 37 个波数 ($3414 \text{ cm}^{-1} \rightarrow 3377 \text{ cm}^{-1}$), 这表明 LSZ 上的功能基团与 $\alpha\text{-MnO}_2$ 的表面羟基发生了氢键合作用; 1616 cm^{-1} 处 $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ 键的弯曲振动峰消失, 1400 cm^{-1} 处 $-\text{OH}$ 的伸缩振动峰无明显变化 ($1400 \text{ cm}^{-1} \rightarrow 1398 \text{ cm}^{-1}$); $\alpha\text{-MnO}_2$ 的吸收峰中增

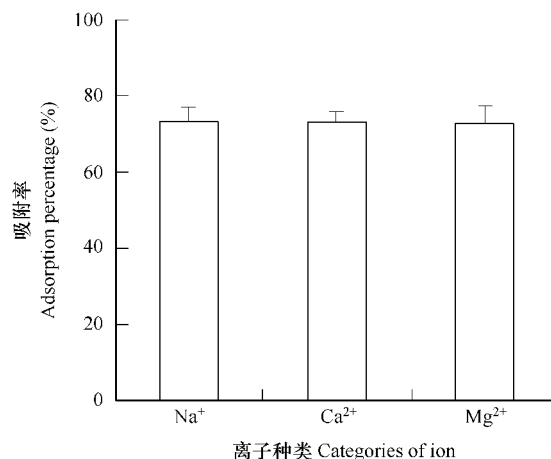


图 5 离子种类对蛋白质吸附性能的影响

Fig. 5 Effect of categories of ion on protein adsorption

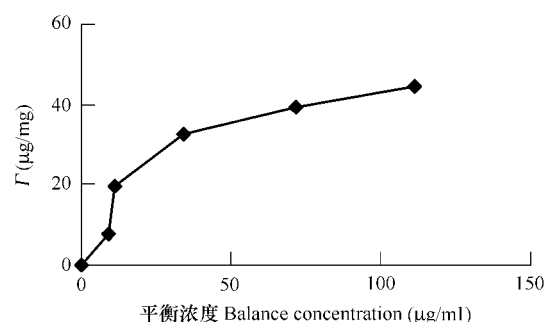


图 6 蛋白质在 $\alpha\text{-MnO}_2$ 表面的等温吸附曲线 (pH4.6, 20°C)

Fig. 6 Adsorption isotherms of proteins on $\alpha\text{-MnO}_2$ (pH4.6, 20°C)

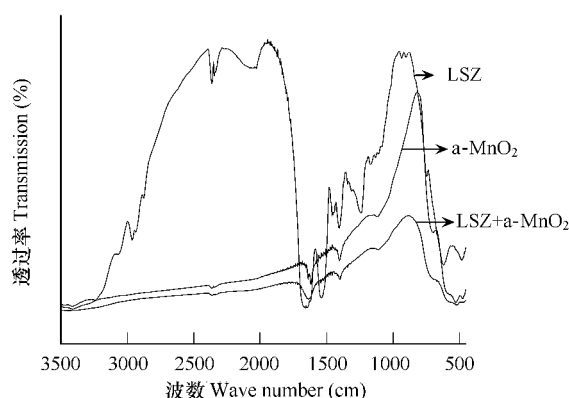


图 7 LSZ 在 $\alpha\text{-MnO}_2$ 表面吸附的 FTIR 谱图

Fig. 7 FTIR spectra of the LSZ- MnO_2 complex formed from the $\alpha\text{-MnO}_2$

加了 1339cm^{-1} 处 C—H 的弯曲振动,以及酰胺 III 带中 1319cm^{-1} 处 $\nu(\text{NH})$ 和 $\delta(\text{NH})$ 的混合振动,这些峰均来自 LSZ 分子,证明确有蛋白质吸附在矿物表面。原 LSZ 谱图中 1238cm^{-1} 和 1169cm^{-1} 处振动峰消失,说明吸附态 LSZ 分子的空间构象发生了一定程度的变化。

2.7 结论

(1) LSZ 在 α - MnO_2 表面的吸附深受溶液 pH 值的影响。在供试 pH 值范围内 ($\text{pH} = 3.8 \sim 10.8$), LSZ 的吸附率随着溶液 pH 值的升高而增大。同时,体系 pH 变化对 LSZ 自 α - MnO_2 表面的脱附也有一定影响。但是,LSZ 的脱附率均处在较低水平,说明吸附反应的不可逆性较高。

(2) LSZ 在 α - MnO_2 表面的亲和力和吸附量受到体系中离子强度的显著影响。非静电引力作用在这一过程中占有重要地位。此外本实验发现,单价和二价阳离子 (Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 对 LSZ 在 α - MnO_2 表面的吸附量无差别。

(3) LSZ 在 α - MnO_2 表面的等温吸附曲线符合 Langmuir 方程式,其形状属于 L 型。

(4) FTIR 表明,LSZ 在 α - MnO_2 表面吸附后其空间构象发生了一定程度的改变。

References:

- [1] Siegel B Z. Plant peroxidases: an organism perspective. *Plant Growth Regulation*, 1993, 12: 303 — 312.
- [2] Gramss G, Voigt K D, Kirsche B. Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. *Chemosphere*, 1999, 38(7): 1481 — 1494.
- [3] Burns R G. Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. *Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*, Huang P M, Schnitzer M, Madison, WI: Soil Science Society of America, 1986. 429 — 451.
- [4] Magnuson T S, Crawford D L. Comparison of extracellular peroxidase-and esterase-deficient mutants of *Streptomyces viridosporus* T7A.. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(3): 1070 — 1072.
- [5] Ilyina A V, Tatarinova N Y, Varlamov V P. The preparation of low-molecular-weight chitosan using chitinolytic complex from *Streptomyces kurssanovii*. *Process Biochemistry*, 1999, 34(9): 875 — 878.
- [6] Ishimoto R, Sugimoto M, Kawai F. Screening and characterization of trehalose-oleate hydrolyzing lipase. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 195(2): 231 — 235.
- [7] De Cristofaro A, Violante A. Effect of hydroxy-aluminium species on the sorption and interlayering of albumin onto montmorillonite. *Applied Clay Science*, 2001, 19: 59 — 67.
- [8] Peter S N, Robert J Z. Importance of Mn (III) Availability on the Rate of Cr (III) Oxidation on δ - MnO_2 . *Environmental Science & Technology*, 2000, 34: 3363 — 3367.
- [9] Pan G, Li X L, Qin Y W, *et al.* EXAFS studies on adsorption desorption mechanism of Zn at δ - MnO_2 - water interface. *Environmental Science*, 2003, 24(4): 454 — 459.
- [10] Dixon J B, Skinner H C W. Manganese minerals in surface environments. *Biomining Processes of Iron and Manganese-Modern and Ancient Environments*, Skinner H C W, Itzpatrick R W, Cremling: Catena Verlag, 1992. 31 — 50.
- [11] Murray J W. The interaction of metal ions at the manganese dioxide-solution interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1975, 39: 505 — 519.
- [12] Randall S R, Sherman D M, Ragnarsdottir K V. An extended X-ray absorption fine structure spectroscopy investigation of cadmium sorption on cryptomelane ($\text{KMn}_8\text{O}_{16}$). *Chemical Geology*, 1998, 151: 95 — 106.
- [13] Naidja A, Liu C, Huang P M. Formation of Protein-Birnessite Complex: XRD, FTIR, and AFM Analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, 251(1): 46 — 56.
- [14] The adsorption of BSA on the surfaces of α - MnO_2 and δ - MnO_2 . *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(10): 4240 — 4246.
- [15] Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(3): 233 — 244.
- [16] Baron M H, Revault M, Servagent-noinville S, *et al.* Chymotrypsin Adsorption on Montmorillonite: Enzymatic Activity and Kinetic FTIR Structural Analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1999, 214(2): 319 — 332.
- [17] Saklyama T, Tanino K, Urakawa M, *et al.* Characteristics of tryptic fragments of bovine β -lactoglobulin on a stainless steel surface. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 88: 536 — 541.
- [18] Parida K M, Kanungo S B, Sant B R. Studies on MnO_2 I. Chemical composition, microstructure and other characteristics of some synthetic MnO_2 of various crystalline modifications. *Electrochimica Acta*, 1981, 26(3): 435 — 443.
- [19] Van Der Veen M, Norde W, Stuart M C. Electrostatic interactions in protein adsorption probed by comparing lysozyme and succinylated lysozyme.

- Colloids And Surfaces B-Biointerfaces, 2004, 35(1): 33–40.
- [20] Peng Z G, Hidajat K, Uddin M S. Selective and sequential adsorption of bovine serum albumin and lysozyme from a binary mixture on nanosized magnetic particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 281(1): 11–17.
- [21] McKenzie R M. The adsorption of lead and other heavy metals on oxides of manganese and iron. *Australian Journal of Soil Research*, 1980, 19: 41–50.
- [22] Rezwan K, Meier L P, Gauckler L J. Lysozyme and bovine serum albumin adsorption on uncoated silica and AlOOH-coated silica particles; the influence of positively and negatively charged oxide surface coatings. *Biomaterials*, 2005, 26(21): 4351–4357.
- [23] Ding H M, Shao L, Liu R J, *et al.* Silica nanotubes for lysozyme immobilization. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 290(1): 102–106.
- [24] Hur J, Schlautman M A. Molecular weight fractionation of humic substances by adsorption onto minerals. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, 264(2): 313–321.
- [25] Moradi O, Modarress H, Noroozi M. Experimental study of albumin and lysozyme adsorption onto acrylic acid (AA) and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004, 271(1): 16–19.
- [26] Retailleau P, Ries-kautt M, Ducruix A. No salting-in of lysozyme chloride observed at low ionic strength over a large range of pH. *Biophysical Journal*, 1997, 73(4): 2156–2163.
- [27] Li A M, Ran W, Dai J Y. Advances in the study of adsorption of natural organic material on minerals and its environmental effects. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 2005, 24(6): 671–680.
- [28] Jansson E, Tengvall P. Adsorption of albumin and IgG to porous and smooth titanium. *Colloids And Surfaces B-Biointerfaces*, 2004, 35(1): 45–51.
- [29] Duinhoven S, Poort R, Van V G, *et al.* Driving Forces for Enzyme Adsorption at Solid-Liquid Interfaces: 2. The Fungal Lipase Lipolase. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1995, 170(2): 351–357.
- [30] Giles C H, Macewan T H, Nakhwa S N. Studies in adsorption Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface area of solids. *Journal of the Chemical Society*, 1960, 111(10): 3973–3993.
- [31] Gitlesen T, Bauer M, Adlercreutz P. Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1345(2): 188–196.
- [32] Oliva F Y, Avallé L B, Camara O R, *et al.* Adsorption of human serum albumin (HSA) onto colloidal TiO₂ particles, Part I. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, 261(2): 299–311.
- [33] Lei J, Fan J, Yu C, *et al.* Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2004, 73(3): 121–128.
- [34] Fan Y T, L B L, X J, *et al.* Adsorption of uranium on manganese dioxide in aqueous solution. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1999, 19(1): 42–46.
- [35] Bystrom A, Bystrom A M. The crystal structure of hollandite, the related manganese oxide minerals, and α -MnO₂. *Acta Crystallographica*, 1950, 3: 146–154.
- [36] Bischof J C, Wolkers W F, Tsvetkova N M, *et al.* Lipid and protein changes due to freezing in dunning AT-1 cells. *Cryobiology*, 2002, 45(1): 22–32.
- [37] Liu R P, Yang Y L, Xia S J, *et al.* Surface chemistry of hydrous manganese dioxide characterization and its effectiveness of removing pollutants. *Environmental Chemistry*, 2005, 24(3): 338–341.
- [38] Parida K M, Dash S S, Mallik S, *et al.* Effect of heat treatment on the physico-chemical properties and catalytic activity of manganese nodules leached residue towards decomposition of hydrogen peroxide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 290(2): 431–436.
- [39] Diamantidis G, Effosse A, Potier P, *et al.* Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoderum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32: 919–927.

参考文献:

- [14] 蔡爱军, 马子川, 刘敬泽. BSA 与 α -MnO₂ 及 δ -MnO₂ 间的界面吸附作用. *生态学报*, 2007, 27(10): 4240–4246.
- [27] 李爱民, 冉炜, 代静玉. 天然有机质与矿物间的吸附及其环境效应的研究进展. *岩石矿物学杂志*, 2005, 24(6): 671–680.
- [34] 樊耀亭, 吕秉玲, 徐杰, 等. 水溶液中二氧化锰对铀的吸附. *环境科学学报*, 1999, 19(1): 42–46.
- [37] 刘锐平, 杨艳玲, 夏圣骥, 等. 水合二氧化锰界面特性及其除污染效能. *环境化学*, 2005, 24(3): 338–341.