

介孔泡沫对芥子气降解酶 DhaA 的吸附研究

郑 禾, 钟近艺, 刘景全, 张 哲, 崔 燕, 郑永超

(军事科学院 防化研究院, 国民核生化灾害防护国家重点实验室, 北京 102205)

摘 要: 以聚乙二醇-聚丙二醇-聚乙二醇三嵌段共聚物(P123)为模板剂, 1,3,5-三甲苯(TMB)为扩孔剂, 正硅酸乙酯(TEOS)为硅源, 采用水热合成法制备了三维连通笼状介孔泡沫(MCF)。N₂ 吸脱附等温实验发现 MCF 最大孔径尺寸 17.3 nm, 窗口尺寸 8.2 nm, 比表面积 770.3 m²/g, 孔容可达 2.3 cm³/g。以 MCF 为载体, 考察了 MCF 对芥子气降解酶 DhaA 的吸附作用, 发现 pH 为 6.5 时, DhaA 在 MCF 上的饱和吸附量最大, 吸附动力学满足 Elovich 动力学模型, DhaA 在 MCF 孔道中的内扩散过程是吸附的限速步骤, 吸附等温线符合 Sips 模型。MCF 吸附后 DhaA 的活性和构象均发生明显改变, DhaA 酶活残留 12.4%, 本征荧光光谱发生红移。研究结果表明: 大孔径、大孔容和三维笼状孔道等结构特征使 MCF 有利于吸附 DhaA, 静电排斥作用影响吸附过程, DhaA 构象改变是造成 DhaA 催化活性降低的主要因素。

关 键 词: 介孔泡沫; 芥子气降解酶; 吸附; 构象

中图分类号: TQ174 **文献标识码:** A

Adsorption of Enzyme for Sulfur Mustard Decontamination by Mesocellular Foam

ZHENG He, ZHONG Jin-Yi, LIU Jing-Quan, ZHANG Zhe, CUI Yan, ZHENG Yong-Chao

(State Key Laboratory of NBC Protection for Civilian, Research Institute of Chemical Defense, Academy of Military Science, Beijing 102205, China)

Abstract: With polyoxyethylene-polyoxypropylene-polyoxyethylene (P123) as template, 1,3,5-trimethylbenzene (TMB) as swelling agent and tetramethoxysilane (TEOS) as silica source, mesocellular foam (MCF) with three dimensional (3D) cage-like mesopores linked by windows was successfully synthesized by hydrothermal method. N₂ isothermal adsorption characterization indicated that the largest pore size was 17.3 nm, and the other structural parameters as window size, specific surface area and pore volume were 8.2 nm, 770.3 m²/g, 2.3 cm³/g, respectively. MCF was employed as carrier for adsorption of DhaA which is an enzyme for sulfur mustard decontamination. The effect of pH to saturated adsorption capacity of DhaA in MCF was studied and the results showed that the largest loading amount of DhaA was achieved at pH 6.5. The adsorption kinetics followed Elovich kinetic model very well, and rate-determining step of this adsorption process was intraparticle diffusion. Adsorption isotherm curve of DhaA matched Sips model. The catalytic activity and conformation of DhaA changed obviously after being adsorbed in MCF. The residual activity of DhaA was 12.4% after being adsorbed, and the intrinsic fluorescence spectrum was found red shift. From the experimental results it can be observed that the big pore size, large specific surface area, and 3D cage-like structure of MCF facilitated the adsorption of DhaA, The electrostatic repulsion between DhaA and MCF influenced the adsorption process, and the conformation change of DhaA was the major factor of the de-

creased catalytic activity.

Key words: mesocellular foam; enzyme for sulfur mustard decontamination; adsorption; conformation

DhaA 属于烷基卤脱卤酶(EC3.8.1.5, Haloalkane dehalogenases, HLDs), 可以通过水解反应将芥子气(HD, $LD_{50}=17\text{ mg/kg}$)水解为无毒产物硫二甘醇(TDG, $LD_{50}=6.61\text{ g/kg}$), 避免了中等毒性氧化产物芥子亚砷($LD_{50}=339.9\text{ mg/kg}$)和芥子砷($LD_{50}=300\text{ mg/kg}$)的产生, 有望成为芥子气绿色洗消的关键活性组分^[1-4]。但是, DhaA 在实际应用中稳定性不够, 在 pH、温度、变性剂和有机溶剂等影响下易丧失催化反应能力^[5-6]。因此, 如何提高 DhaA 环境耐受性是当前急需解决的问题。采用载体吸附进行固定化是一个重要的研究方向, Diaz 等^[7]首先报道了球形蛋白质分子在 MCM-41 上的负载, 发现载体孔径的尺寸对吸附过程起关键作用。当载体孔径尺寸小于生物酶尺寸时, 吸附仅仅发生在载体外表面; 当载体孔径尺寸超过生物酶尺寸时, 生物酶分子可以自由进入载体孔道, 吸附效率提高^[8-11]。与此同时, 载体的孔道结构也影响生物酶的吸附, 三维无序孔道比二维有序孔道更有利于生物酶分子的吸附^[12-13]。因此, 具有更大孔径尺寸和不同孔维度材料的出现, 大幅提升了生物酶的负载量, 并促进了该领域的研究。介孔泡沫(MCF)是一种具有三维连通笼状孔道结构的载体材料, 其孔径尺寸分布在 10~40 nm 之间, 孔之间通过 8~20 nm 的窗口连接, 孔容为 1~2.4 cm³/g, 属于介孔材料中孔径最大的一类载体^[14]。相对于较小孔径的二维孔道介孔材料 SBA-15, MCF 的大孔径、大孔容以及三维笼状结构有望提高 DhaA 的吸附量和吸附效率。目前 DhaA 在 MCF 中吸附固定化以及吸附过程的研究还未见文献报道。

本工作通过水热法制备了介孔泡沫 MCF, 借助 N₂ 吸脱附实验、透射电镜进行了初步表征。考察了在特定 pH 缓冲溶液中, MCF 对 DhaA 的吸附量变化情况, 结合 MCF 对 DhaA 的吸附动力学, 推算出吸附过程中的限速步骤, 从而获得 MCF 吸附对 DhaA 酶活的影响, 并对造成影响的原因进行了分析。

1 实验方法

1.1 实验试剂与仪器

聚乙二醇-聚丙二醇-聚乙二醇三嵌段共聚物(P123, 平均分子量 5800, Aldrich 公司); 正硅酸乙酯(TEOS, 分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 盐酸(HCl, 分析纯, 北京化工厂); 1,3,5-三甲苯(TMB, 分

析纯, 成都格雷西亚化学技术有限公司); 磷酸一氢钠、磷酸氢二钠、考马斯亮蓝 G-250 均为国药分析纯, DhaA 由实验室提供。使用 ASAP 2020 物理吸附仪(美国 Micromeritics 公司)进行 N₂ 吸脱附实验, BET 法测算样品的比表面积, BJH 法分析其孔结构。采用透射电子显微镜 JEOL-100CX(日本电子株式会社)对样品形貌结构进行观察, 采用 Infinite F50 酶标仪(奥地利 Tecan 公司)测定 DhaA 浓度, 采用 F-4600 型荧光光谱仪(日本日立公司)测定 DhaA 构象。

1.2 实验方法

1.2.1 MCF 制备

将模板剂 P123 和扩孔剂 TMB 溶于一定浓度的盐酸水溶液, 按照物质的量比 $n_{\text{TEOS}}:n_{\text{P123}}=1:0.0168$ 加入一定量的 TEOS, 充分混合, 转入水热反应釜, 100℃ 下反应 24 h。收集产物过滤, 洗涤清除模板剂, 将滤渣在 550℃ 马弗炉中煅烧 5 h, 得到 MCF 系列载体。将物质的量比($n_{\text{TMB}}:n_{\text{TEOS}}$)为 0:1、0.15:1、0.35:1、0.5:1、1:1、2:1、4:1 条件下合成的载体分别命名为 MCF_x($x=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6$)。

1.2.2 DhaA 吸附动力学测定

将纯化好的 DhaA 用 pH6.5 的 PB 缓冲液稀释至 1.0 mg/mL 待用。取 10 mg 制备好的载体加入 pH 6.5 的磷酸(PB)缓冲液超声分散, 10000 r/min 离心 3 min 后倒出上清液, 重复清洗 2 次后, 在 20℃ 下加入不同浓度的 DhaA 溶液重悬吸附。不同时间间隔取样, 测定此时上清液中的 DhaA 浓度, 计算 DhaA 在载体中的吸附量。

1.2.3 pH 对 DhaA 吸附量影响测定

采用磷酸二氢钠、磷酸氢二钠配制 pH 6.0~8.0 的缓冲溶液, 采用 Tris-HCl 配制 pH 8.5 和 pH 9.0 的缓冲体系。在不同 pH 缓冲溶液中重复 1.2.2 步骤, 考察吸附达到平衡时 DhaA 在载体中的吸附量。

1.2.4 DhaA 解吸附量测定

选择 pH 6.5 缓冲溶液中 DhaA 吸附达到平衡的体系, 10000 r/min 离心 3 min 后倒出上清, 测定上清中 DhaA 含量, 再次加入 pH 6.5 缓冲溶液重悬 2 min, 重复上述步骤 3 次, 将上清液中测定的 DhaA 含量加和, 得到 DhaA 的解吸附量。

1.2.5 DhaA 吸附等温线测定

方法步骤同 1.2.2, 初始 DhaA 蛋白浓度从 0.25 mg/mL 增大到 1.5 mg/mL, 测定吸附达到平衡

时 DhaA 在 MCF5 中的吸附量。

1.2.6 DhaA 酶活测试

分别取 200 μL 蛋白浓度相同的游离 DhaA 和载体吸附 DhaA, 加入 10 mmol/L 芥子气模拟剂双(2-氯乙基)醚, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h。加入 50 μL 体积比 30% 的硝酸中止反应, 随后加入 55 μL 硫氰化汞和 110 μL 硫酸铁铵^[15]。取 200 μL 溶液加入 96 孔板, Infinite F50 型酶标仪测定 460 nm 下的吸收强度, 计算 CI⁻浓度, 定义该条件下 1 min 内每毫克 DhaA 降解底物产生 1 nmol CI⁻为一个活力单位(U/min)。根据 CI⁻浓度计算 DhaA 酶活。

1.2.7 DhaA 构象测定

分别取蛋白浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ 的游离 DhaA 和载体吸附 DhaA 加入石英比色皿, 放入 F-4600 型荧光光谱仪, 固定狭缝宽度 5.0 nm, 激发波长 280 nm, 扫描范围 300~400 nm, 扫描速度 1000 nm/min, 测定荧光发射光谱, 分别扣除不含 DhaA 的水溶液和载体空白对照的荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 MCF 系列载体的结构表征

图 1 为 MCF 系列载体的 N₂ 吸脱附等温线, 可以看出, 该系列材料具有典型的 IV 类等温线和 H1 型滞后环, 表明载体均属于介孔材料。随着扩孔剂使用量加大, MCF 载体的孔径尺寸增大, 孔容也随之增大。

从透射电镜(TEM)照片(图 2)可以看出, MCF0 是高度有序的二维六方相介孔材料, 在垂直孔道方向上孔径分布均一, 孔道长程有序(图 2(a)); 在平行孔道方向上, MCF0 具有典型的蜂窝状六方有序结构。在合成过程中加入 TMB 后, 原先有序均一的孔结

构被破坏, 制备的 MCF5 中出现了大量的三维笼状无序孔结构。

MCF 系列载体的 BET 测试结果(表 1)表明, 通过控制 TMB 的加入量, MCF 系列载体的孔径分布可以控制在 6.8~17.3 nm 之间。其中, MCF0 平均孔径最小(6.8 nm), 孔容为 1.2 cm³/g; MCF5 的孔结构尺寸最大, 可达 17.3 nm, 窗口尺寸 8.2 nm, 孔容 2.3 cm³/g, 较 MCF0 均有明显增大。

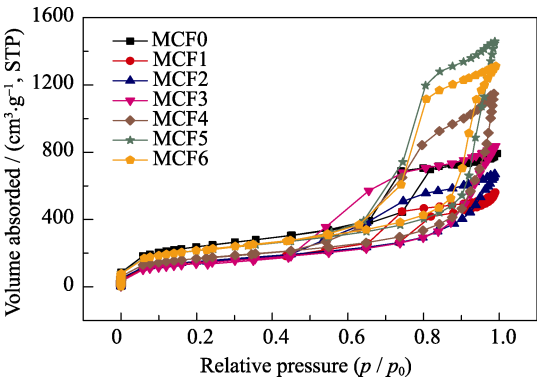


图 1 MCF 系列材料 N₂ 吸脱附曲线图
Fig. 1 N₂ adsorption-desorption isotherms of MCF serial materials

表 1 MCF 系列载体的 BET 测试结果
Table 1 BET results of MCF serial materials

Sample	BET surface area/(m ² ·g ⁻¹)	Pore size /nm	Window size/nm	Pore volume /(cm ³ ·g ⁻¹)
MCF0	858.2	6.8	6.6	1.2
MCF1	538.4	8.5	6.8	0.9
MCF2	544.3	11.0	6.0	1.1
MCF3	507.3	12.9	4.9	1.3
MCF4	606.7	16.6	7.7	1.8
MCF5	770.3	17.3	8.2	2.3
MCF6	779.5	14.1	8.4	2.1

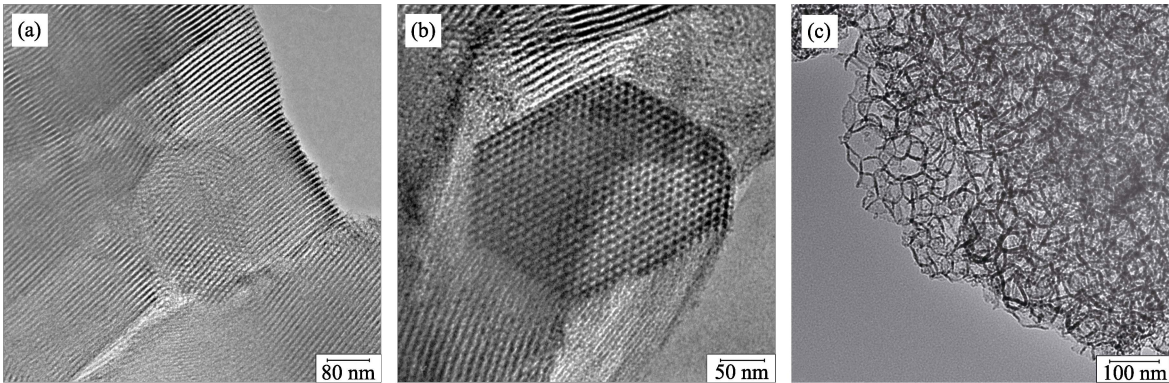


图 2 MCF0 和 MCF5 的 TEM 照片
Fig. 2 TEM imgs of MCF0 and MCF5
(a) MCF0 in 2D array; (b) MCF0 in 1D channel; (c) MCF5

2.2 不同条件下 DhaA 在载体中的吸附情况

DhaA 分子尺寸(4.3 nm×4.4 nm×4.6 nm)小于 MCF5 和 MCF0 的孔径尺寸,在两种载体中均能进行孔道内吸附。DhaA 在载体中的吸附曲线如图 3(a)所示(其中 q_t 表示单位质量载体对 DhaA 的吸附量(mg/g)),从中可以看到,DhaA 的吸附量在前 60 min 迅速增加,而后逐渐达到平衡。在吸附平衡状态下,MCF5 对 DhaA 的饱和吸附量高于 MCF0,说明 MCF5 独特的孔结构更有利于 DhaA 吸附。赵渊中等^[16]发现为了维持 DhaA 的结构稳定,溶液 pH 应保持在 6.0~9.0 之间,但是 DhaA 等电点 $pI=5.12$,MCF5 和 MCF0 两种载体表面带有丰富的羟基,等电点在 3 左右^[17]。因此,在这个 pH 范围内,DhaA 和载体表面均带有负电荷,相互之间存在静电排斥作用,此时 pH 对 DhaA 在载体中饱和吸附量的影响见图 3(b)。可以看到,pH 6.0 和 6.5 情况下,DhaA 在 MCF5 和 MCF0 两种载体中的饱和吸附量最高,当溶液 pH 逐渐增大时,由于远离 DhaA 和载体的等电点,DhaA 与载体表面的静电排斥作用增强,导致吸附量迅速降低。在 pH 8.5 条件下,两种载体又出现了 DhaA 吸附量的增加,这是由于更换缓冲体系造成的。整体来看,由于 MCF5 孔径和孔容比 MCF0 更大,因此不同 pH 条件下 DhaA 在 MCF5 中的吸附量均高于 MCF0。

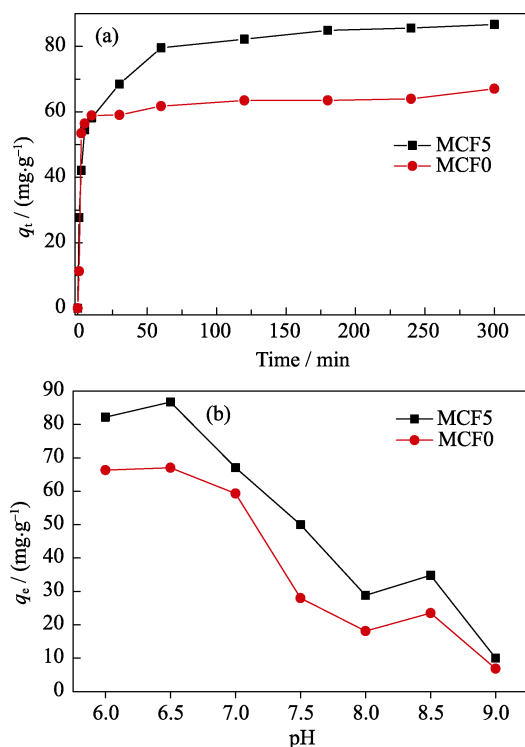


图 3 DhaA 在 MCF5 和 MCF0 中的吸附

Fig. 3 Adsorption of DhaA in MCF5 and MCF0

(a) Adsorption kinetics; (b) Effect of pH on saturated adsorption capacity

2.3 DhaA 吸附/解吸附情况

图 4 显示的是在 pH 6.5 条件下,DhaA 在 MCF5 和 MCF0 两种载体吸附后的吸附量和解吸附量。可以看到,MCF5 对 DhaA 的吸附和解吸附性能均优于 MCF0。MCF5 中大孔径和大孔容有利于 DhaA 的大量吸附,吸附量从 66.7 增加到 82.3 mg/g,比 MCF0 提高了 23.4%。而 MCF5 在合成过程中形成的三维笼状无序结构则有效抑制了 DhaA 的泄漏,DhaA 的解吸附量从 42.7 减小到 33.3 mg/g,比 MCF0 降低了 22.0%。

2.4 DhaA 在 MCF5 中的吸附动力学

分别利用准一级吸附、准二级吸附以及 Elovich 动力学模型对 DhaA 在 MCF5 中的吸附曲线进行拟合,相关模型公式和拟合结果如表 2 所示。其中,准一级吸附模型假设吸附过程受溶液扩散控制^[18],准二级吸附模型假设吸附过程包含化学吸附过程^[19],Elovich 动力学模型更适合非均相扩散过程^[20]。

在三种动力学模型中,DhaA 在 MCF5 中的吸附动力学曲线与 Elovich 动力学模型拟合效果较好(决定系数 $R^2=0.9860$),而且均方根误差 RMSE 最小,表明该模型模拟结果与实验数据接近。模拟结果显示 DhaA 在 MCF5 吸附过程中存在吸附不均匀的情况^[21]。

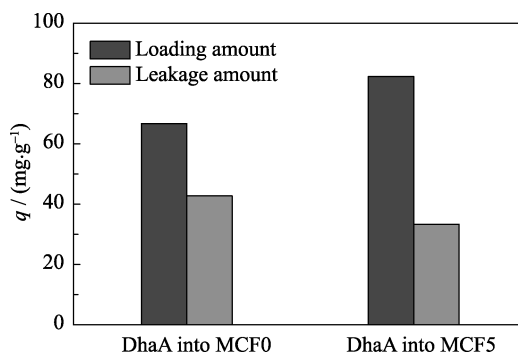


图 4 DhaA 在 MCF5 和 MCF0 中的吸附和解吸附

Fig. 4 Adsorption and desorption of DhaA in MCF5 and MCF0

表 2 动力学模拟拟合结果

Table 2 Fitting of adsorption kinetic curve

Kinetic model	Equation	Parameters
Pseudo-first-order	$\ln(q_e - q_t) = \ln(q_e) - k_1 t$	$q_e=79.58(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$, $k_1=0.25(\text{min}^{-1})$, $R^2=0.9300$, RMSE=7.38
Pseudo-second-order	$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}$	$q_e=83.41(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$, $k_2=0.01(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$, $R^2=0.9773$, RMSE=4.10
Elovich	$q_t = \frac{\ln(\alpha\beta)}{\beta} + \frac{\ln t}{\beta}$	$\alpha=33.52(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1})$, $\beta=9.99(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$, $R^2=0.9860$, RMSE=3.18

2.5 DhaA 在 MCF5 中的扩散机制

非均相吸附可以分为三个过程: 首先, 吸附分子扩散到载体外表面富集(属于外扩散过程); 然后, 被富集吸附分子在载体孔道内扩散到达吸附位点(属于内扩散过程); 最后, 吸附分子与孔道内的吸附位点结合达到平衡。一般情况下, 最后阶段的速率非常快, 吸附过程的限速步骤常常与外扩散和内扩散有关。依据 Weber-Morris 扩散模型^[22]($q_t = kt^{1/2} + C$), 吸附动力学曲线可以分为三个线性区域(见图 5), 分别对应外扩散、内扩散和最后的平衡过程。由于外扩散过程的拟合线可以近似认为通过原点, 表明 DhaA 在 MCF5 外表面的吸附速率相对较快, 而 DhaA 在 MCF5 孔道内扩散是吸附过程的限速步骤。

MCF5 窗口尺寸远超过 DhaA 分子大小, 而在 pH 6.5 条件下 MCF 与 DhaA 均带负电荷, 因此 MCF 孔道内表面与 DhaA 的静电排斥作用可能是影响内扩散的主要因素。

2.6 DhaA 在 MCF5 中的吸附等温线

吸附等温线可以反映吸附平衡时 DhaA 在 MCF5 中的分布情况, 目前比较典型的有五种吸附等温模型: Langmuir 模型^[23]基于单分子层吸附而建立; Freundlich 模型^[24]则是基于大量实验总结的多分子层吸附经验公式; Tempkin 模型^[25]引入了吸附过程中吸附分子之间的相互作用; Sips 模型^[26]和 Redlich-Peterson 模型^[27]都是结合了 Langmuir 模型和 Freundlich 模型的经验公式。DhaA 在 MCF5 中的吸附等温线及拟合曲线如图 6 所示, 可以看到 MCF5 的 DhaA 吸附等温线与 Sips 模型拟合度最高($R^2=0.9844$)(见表 3)。

结果表明, 当 DhaA 浓度低时, DhaA 在 MCF5 中依照 Freundlich 模型进行多分子层吸附; 当 DhaA 浓度高时, DhaA 在 MCF5 中依照 Langmuir 模型进行单分子层吸附^[28]。

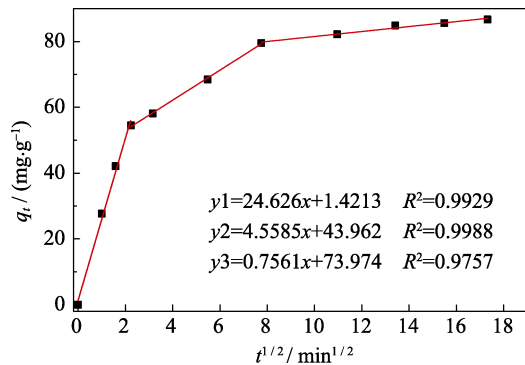


图 5 DhaA 吸附过程的 Weber-Morris 扩散模型
Fig. 5 Weber-Morris diffusion model of adsorption of DhaA

2.7 MCF5 吸附对 DhaA 酶活影响

酶活测试发现, 游离态 DhaA 对芥子气模拟剂双(2-氯乙基)醚的酶活为 21 U/min, 吸附后 DhaA 残留酶活 2.6 U/min, 活性残留率 12.4%, MCF5 吸附后 DhaA 的酶活衰减明显。Takimoto 等^[8]、Zivkovic 等^[29]和 Dreifke 等^[30]在研究中同样发现了载体吸附后生物酶活性降低的现象, 吸附后生物酶的残留活性分别为游离酶的 67.5%、20.8%和 27%, 但上述研究均未分析活性衰减的原因。

本研究采用荧光光谱对 DhaA 吸附前后的三级构象进行了分析(见图 7), 结果发现, MCF5 吸附后的 DhaA 发生了构象改变, 荧光发射峰明显红移, 说明 DhaA 的疏水活性中心结构遭到了破坏, 疏水结构暴露在极性环境中。

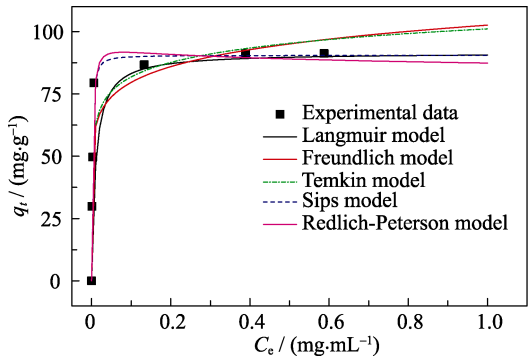


图 6 DhaA 在 MCF5 中的吸附等温线
Fig. 6 Adsorption isotherm curves of DhaA in MCF5

表 3 吸附等温线拟合结果
Table 3 Fitting of adsorption isotherm curve

Isotherm model	Equation	Parameters
Langmuir	$q_e = \frac{q_{\max} \times C_e}{K_l + C_e}$	$q_{\max}=91.49(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$, $K_l=0.01(\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1})$, $R^2=0.9800$, $\text{RMSE}=4.68$
Freundlich	$q_e = K_f \times C_e^{1/n}$	$K_f=102.58(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$, $n=0.11$, $R^2=0.9436$, $\text{RMSE}=10.94$
Tempkin	$q_e = \frac{RT}{b_T} \times \ln(A_T \times C_e)$	$A_T=175388.80(\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1})$, $b_T=295.93(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1})$, $R^2=0.9119$, $\text{RMSE}=9.8$
Sips	$q_e = \frac{K_s C_e^{\beta_s}}{1 + \alpha_s \times C_e^{\beta_s}}$	$K_s=236338.20(\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1})$, $\beta_s=1.26$, $\alpha_s=2612.06$, $R^2=0.9844$, $\text{RMSE}=4.13$
Redlich-Peterson	$q_e = \frac{K_R \times C_e}{1 + \alpha_R \times C_e^g}$	$K_R=39323.82(\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1})$, $\alpha_R=449.02(\text{mg}^{-1})$, $g=1.03$, $R^2=0.9832$, $\text{RMSE}=4.28$

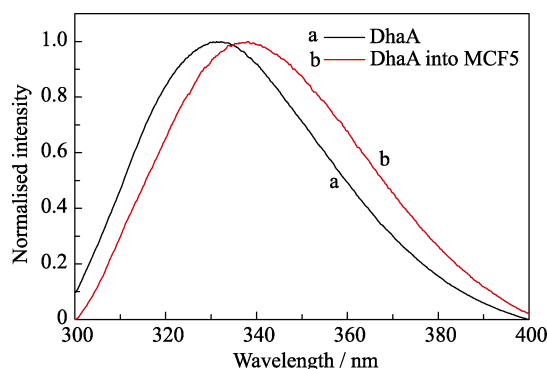


图 7 DhaA 吸附前后的荧光光谱图

Fig.7 Fluorescence emission spectra of soluble DhaA and adsorbed DhaA

结合上面提到的 DhaA 吸附动力学研究, 可以认为在吸附过程中, DhaA 分子主要通过氢键、范德华力等物理作用吸附在 MCF5 孔道中, 部分 DhaA 分子为了减小静电排斥作用, 通过构象改变来与 MCF5 孔道内表面结合, 造成了吸附不均匀, 并且导致吸附后 DhaA 催化活性的丧失。

3 结论

以 TEOS 和 P123 为反应物, TMB 为扩孔剂水热法制备了三维连通笼状孔道结构的 MCF, 其中 MCF5 的孔结构尺寸最大, 达到 17.3 nm, 窗口尺寸 8.2 nm, 孔容 $2.3 \text{ cm}^3/\text{g}$ 。在 pH 6.5 条件下, MCF5 对 DhaA 的吸附量最大, 其吸附动力学满足 Elovich 动力学模型, DhaA 在 MCF5 孔道内扩散过程是吸附的限速步骤, 吸附后 DhaA 活性降低, DhaA 的构象发生改变。

研究结果表明: 具有独特的三维连通笼状孔道结构的 MCF 能够大量吸附 DhaA, 并有效降低 DhaA 的解吸附, 比二维有序孔道结构的介孔材料吸附性能更好。但在 DhaA 吸附过程中, 静电排斥作用影响吸附过程, 造成部分 DhaA 构象发生改变, 导致催化活性降低。进一步采用官能团修饰的方式对 MCF 进行改性, 减小静电排斥或增大静电吸引作用, 将有助于增强 MCF 对 DhaA 的吸附, 并且有望维持 DhaA 构象和催化活性。

参考文献:

[1] GUO N, ZHAO Y Z, ZHONG J Y, *et al.* Efficient expression and fermentation conditions optimization of mustard gas hydrolase. *Research Progress on Chemical Problems in Public Security*, 2015, **273**–280.

[2] GUO N, DONG L, LIU J Q, *et al.* Catalytic hydrolysis of sulfur mustard by haloalkane dehalogenases. *Environmental Chemistry*, 2015, **34**(7): 1363–1370.

[3] ZHAO Y Z, ZHONG J Y, GUO N, *et al.* Improvement in the thermostability and activity of DhaA against sulfur mustard by multi-point mutagenesis. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2017, **23**(4): 714–718.

[4] ZHAO Y Z, YU W L, ZHENG H, *et al.* PEGylation with the thiosuccinimido butylamine linker significantly increases the stability of haloalkane dehalogenase DhaA. *Biotechnology Journal*, 2017, **254**: 25–33.

[5] NAGATA Y, OHTSUBO Y, TSUDA M. Properties and biotechnological applications of natural and engineered haloalkane dehalogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, **99**(23): 9865–9881.

[6] STEPANKOVA V, DAMBORSKY J, CHALOUPKOVA R. Organic co-solvents affect activity, stability and enantioselectivity of haloalkane dehalogenases. *Biotechnology Journal*, 2013, **8**: 633–752.

[7] DIAZ J F, BULKUS K J. Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1996, **2**(2/3): 115–126.

[8] TAKIMOTO A, SHIOMI T, INO K, *et al.* Encapsulation of cellulase with mesoporous silica (SBA-15). *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, **116**(1): 601–606.

[9] VINU A, GOKULAKRISHNAN N, BALASUBRAMANIAN V V, *et al.* Three-dimensional ultralarge-pore Ia3d mesoporous silica with various pore diameters and their application in biomolecule immobilization. *Chemistry-A European Journal*, 2008, **14**(36): 11529–11538.

[10] WEBER E, SIRIM D, SCHREIBER T, *et al.* Immobilization of P450 BM-3 monooxygenase on mesoporous molecular sieves with different pore diameters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, **64**(1/2): 29–37.

[11] AGUILA S, VAZQUEZ-DUHALT R, COVARRUBIAS C, *et al.* Enhancing oxidation activity and stability of iso-1-cytochrome c and chloroperoxidase by immobilization in nanostructured supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, **70**(3/4): 81–87.

[12] WASHMON-KRIEL L, JIMENEZ V L, BALKUS K J. Cytochrome c immobilization into mesoporous molecular sieves. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, **10**(5): 453–469.

[13] SERRA E, MAYORAL A, SAKAMOTO Y, *et al.* Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: effect of textural and structural parameters. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008, **114**(1): 201–213.

[14] SCHMIDT-WINKEL P, LUKENS W W, ZHAO D Y, *et al.* Mesoporous siliceous foams with uniformly sized cell and windows. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, **121**(1): 254–255.

[15] IWASAKI I, UTSUMI S, HAGINO K, *et al.* A new spectrophotometric method for the determination of small amounts of chloride using the mercuric thiocyanate method. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1956, **29**(8): 860–864.

[16] 赵渊中. 脱卤酶对芥子气的催化活性和稳定性研究. 北京: 防化研究院硕士学位论文, 2016.

[17] ROSENHOLM J M, CZURYSZKIEWICZ T, KLEITZ F, *et al.* On the nature of bronsted acidic groups on native and functionalized mesoporous siliceous SBA-15 as studied by benzylamine adsorption from solution. *Langmuir*, 2007, **23**(8): 4315–4323.

[18] LAGERGREN S, SVENSKA B K. On the theory of so-called adsorption of materials. *Swedish Academy of Science*, 1898, **24**: 1–13.

[19] HO Y S, MCKAY G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, 1999, **34**(5): 451–465.

[20] AHARONI C, UNGARISH M. Kinetics of activated chemisorp-

- tions. Part I: The non-Elvichian part of the isotherm. *Journal of Chemical Society Faraday Transactions*, 1976, **72**: 265–268.
- [21] MARTINS A C, PEZOTI O, CAZRTTA A L, *et al.* Removal of tetracycline by NaOH-activated carbon produced from macadamia nut shells: kinetic and equilibrium studies. *Chemical Engineering Journal*, 2015, **260**: 291–299.
- [22] WEBER W J, MORRIS J. Kinetics of adsorption on carbon from solution. *ASCE Sanitary Engineering Division Journal*, 1963, **1(2)**: 1–2.
- [23] LANGMUIR I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 1916, **38(11)**: 2221–2295.
- [24] FREUNDLICH H M F. Over the adsorption in solution. *Journal of Physical Chemistry*, 1906, **57**: 385–471.
- [25] TEMPKIN M I, PYZHEV V. Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalyst. *Acta Physico-Chimica USSR*, 1940, **12**: 327–356.
- [26] SIPS R. Combined form of Langmuir and Freundlich equations. *Journal of Chemical Physics*, 1948, **16**: 490–495.
- [27] REDLICH O, PETERSON D L. A useful adsorption isotherm. *Journal of Physical Chemistry*, 1959, **63(6)**: 1024–1026.
- [28] FOO K Y, HAMEED B H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*, 2010, **156(1)**: 2–10.
- [29] ZIVKOVIC L T I, ZIVKOVIC L S, BABIC B M, *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption onto biosafe meso/macroporous silica and zirconia. *Biological Engineering Journal*, 2015, **93**: 73–83.
- [30] DREIFKE M, FRIED D I, BRIELER F J, *et al.* Kinetic investigations of 6-phosphogluconate dehydrogenase confined in mesoporous silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, **132**: 5–15.