

# 杏鲍菇漆酶的诱导及其对染料的脱色降解

李 飞,夏文静,臧 玲

(南京师范大学泰州学院 生物技术与化学工程学院,江苏 泰州 225300)

**摘要:** 为了研究培养条件对杏鲍菇诱导漆酶的影响,进一步开发杏鲍菇漆酶在环境治理中的应用,采用碳源、氮源、不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$ 、香兰素、愈创木酚等诱导物对杏鲍菇产漆酶进行诱导并运用紫外分光光度法探索了反应温度、pH 值、染料浓度和杏鲍菇漆酶用量对 3 种染料(酸性铬兰 K、溴酚蓝、龙胆紫)的降解效果。结果表明:碳源为麦芽糖,氮源为蛋白胨时杏鲍菇产漆酶活力最高,在一定的浓度范围内,不同诱导物能促进漆酶的合成,当  $\text{Cu}^{2+}$  0.2 mmol/L、愈创木酚 0.01 mmol/L、香兰素 0.1~0.5 mmol/L 时对杏鲍菇漆酶的诱导效果最显著。杏鲍菇漆酶对染料具有较好的脱色效果,在 pH 值 5.0、40 ℃ 条件下反应 16 h,酸性铬兰 K、溴酚蓝、龙胆紫的脱色率分别达到 76.9%、69.1%、63.8%,显示杏鲍菇漆酶在处理染料废水方面具有良好的应用前景。

**关键词:** 诱导物;杏鲍菇;漆酶;染料;降解

**中图分类号:** Q814      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2015)10-0136-05

## Induction Production of Laccase from *Pleurotus eryngii* and Dye Decolorization by the Laccase

LI Fei,XIA Wenjing,ZANG Ling

(College of Biochemical Engineering,Taizhou College of Nanjing Normal University,Taizhou 225300,China)

**Abstract:** In order to study the effect of culture conditions on induction of laccase from *Pleurotus eryngii* and explore the application of laccase in environmental governance,the inductive effects of carbon and nitrogen sources,different concentrations of copper ions,vanillin and guaiacol on production of laccase from *Pleurotus eryngii* were studied,and the effect of reaction temperature,pH value,dye concentration and laccase amount on decolorization of acid chrome blue K,bromophenol blue and gentian violet were tested with the method of UV spectrophotometry. The results showed that the laccase activity of *Pleurotus eryngii* reached its maximum when maltose and peptone were used as carbon source and nitrogen source. The inducer in a concentration range could promote laccase production,the highest activity of laccase from *Pleurotus eryngii* was observed at 0.2 mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$ ,0.01 mmol/L guaiacol and 0.1—0.5 mmol/L vanillin. The laccase from *Pleurotus eryngii* had a good effect on decolorizing dye. Under the condition of pH value of 5.0 and temperature of 40 ℃ for 16 h,76.9% ,69.1% ,63.8% of colors were decolored for acid chrome blue K,bromophenol blue and gentian violet,respectively. A practical way using the laccase of *Pleurotus eryngii* to decolorize dye waste water had a good application prospect.

**Key words:** inducer; *Pleurotus eryngii*; laccase; dye; decolorization

工业水体污染是人类社会在 21 世纪面临的突出难题之一,其中纺织工业印染废水的污染最为严重,不仅会影响水体生态环境,而且可通过食物链影

响人体健康,威胁到人类的生存。染料具有结构复杂、难降解、有毒性、难于处理等特点,这些都给染料的处理带来一定的难度<sup>[1-3]</sup>。现有的水体修复技术

有物理、化学和生物等修复方法,其中,生物修复是解决水体污染的最为有效和可靠的方法,具有高效、安全、不产生二次污染、费用低、应用范围广等优点<sup>[3-6]</sup>。

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,广泛分布于植物、昆虫、细菌和真菌特别是白腐真菌中,可催化多种酚类和非酚类化合物氧化,同时将分子氧还原成水<sup>[7-10]</sup>。因其广泛的底物特异性,漆酶可以催化氧化绝大多数染料,大大降低其他方法处理染料废水时对环境造成的污染,因此漆酶在废水处理、染料脱色等领域具有广阔的应用前景,能显著减少排放到环境中的有毒污染物<sup>[11-14]</sup>。

真菌漆酶的合成水平除了决定于菌株本身的产酶能力外,还受到外在条件的影响。碳源、氮源、酚类底物作为底物类似物,可以在一定的程度上诱导漆酶的产生。金属离子尤其是  $\text{Cu}^{2+}$  作为漆酶的辅基能促进漆酶的合成,增强漆酶在细胞外环境中的稳定性,提高漆酶的活性<sup>[11,15-17]</sup>。杏鲍菇是具有较强的木素分解能力的食用菌,有关不同诱导物对杏鲍菇漆酶的诱导合成研究较少,也未见利用杏鲍菇漆酶对染料进行脱色的报道。为进一步开发杏鲍菇漆酶的应用,研究了碳源、氮源及不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$ 、香兰素和愈创木酚对杏鲍菇产漆酶能力的影响。利用杏鲍菇所产发酵漆酶对酸性铬兰 K、溴酚蓝、龙胆紫 3 种染料进行脱色降解试验,旨在为漆酶在工业废水脱色处理中的应用提供重要参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌株和试剂 杏鲍菇菌株 (*Pleurotus eryngii*) 为生物技术与化学工程学院实验室自藏菌株,4 ℃ 保藏于 PDA 培养基。酸性铬兰 K、溴酚蓝、龙胆紫及其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 培养基 菌种保藏和活化培养基 (PDA): 马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L。

发酵产酶培养基:麸皮 20 g/L、葡萄糖 5 g/L、120 mmol/L 酒石酸铵 10 mL/L、200 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液 100 mL/L (pH 值 5.0)、1 mmol/L 愈创木酚溶液 10 mL/L、Kirk Salts 溶液 100 mL/L、Tween80 1 mL/L 及诱导剂。

Kirk Salts 溶液 (pH 值 = 4.5):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.3 g/L、维生素 B1 1 g/L、1 × Kirk Trace elements 100 mL/L。

6 × Kirk Trace elements 溶液 (pH 值 = 4.5):  $\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_3$  9 g/L、 $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.1 g/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot$

$7\text{H}_2\text{O}$  1.1 g/L、 $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.06 g/L、 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0.11 g/L、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.06 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.6 g/L、NaCl 6.0 g/L、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.072 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  18 g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.6 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4.3 g/L。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌株活化 将杏鲍菇菌种接种至 PDA 固体培养基上,28 ℃ 恒温培养 7 d,待用。

1.2.2 诱导产酶培养 用打孔器取 5 块直径 1 cm 的杏鲍菇菌种接种于装有 50 mL 发酵产酶培养基中,28 ℃,180 r/min 培养 10 d。分别添加碳源(葡萄糖、麦芽糖、木糖、蔗糖、可溶性淀粉)、氮源(酒石酸铵、尿素、硝酸铵、牛肉膏、蛋白胨)和不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  (0.1 ~ 0.5 mmol/L)、香兰素 (0.1 ~ 0.75 mmol/L) 和愈创木酚 (0.005 ~ 0.015 mmol/L) 至发酵产酶培养基中诱导杏鲍菇合成漆酶。将得到的发酵液,6 000 r/min,4 ℃ 离心 5 min,上清液即为试验粗酶液。每个条件重复 3 次。

1.2.3 杏鲍菇漆酶活力的测定 以 2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(简称 ABTS)为底物。3 mL 反应体系中含有 1 mmol/L ABTS 底物 1 mL,50 mmol/L pH 值 5.0 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和酶液共计 2 mL,420 nm [ABTS 的  $\varepsilon = 3.6 \times 10^4$  mol/(L · cm)] 下测定反应液 3 min 内的吸光值变化。1 个酶活力单位定义为在当前反应条件下每分钟氧化 1  $\mu\text{mol}$  ABTS 所需的酶量<sup>[18]</sup>。

1.2.4 杏鲍菇漆酶对染料的降解及脱色率的计算

将 3 种染料酸性铬兰 K、溴酚蓝、龙胆紫用紫外分析仪进行 400 ~ 800 nm 波长扫描确定其最大吸收峰。以酸性铬兰 K、溴酚蓝、龙胆紫为漆酶降解对象,探索合适的脱色条件,包括降解温度 (30 ~ 50 ℃,间隔 5 ℃)、pH 值 (3.5 ~ 5.5,间隔 0.5)、染料质量浓度 (龙胆紫和溴酚蓝质量浓度 2.5 mg/L ~ 40 mg/L,酸性铬兰质量浓度 10 ~ 150 mg/L) 和杏鲍菇漆酶用量 (0.1 ~ 0.5 U/mL,间隔 0.1 U/mL)。若无特殊说明,脱色条件采用:5 mL 反应体系含 50 mmol/L pH 值 5.0 柠檬酸-柠檬酸钠、染料(初始质量浓度:酸性铬兰 K 40 mg/L、溴酚蓝 10 mg/L、龙胆紫 10 mg/L)、漆酶 (0.3 U/mL),40 ℃ 脱色降解 16 h 后测定染料最大吸收波长处的吸光度  $A_t$ 。用同样的方法在染料中加入等量的热灭活酶液作为对照,测得其吸光值  $A_0$ 。染料脱色率的计算公式:脱色率 =  $(A_0 - A_t)/A_t \times 100\%$ ,其中,  $A_0$  为脱色反应前溶液的吸光值,  $A_t$  为脱色反应  $t$  时间后溶液的吸光值<sup>[14]</sup>。

2 结果与分析

2.1 诱导物对杏鲍菇漆酶合成的影响

2.1.1 碳源对杏鲍菇漆酶合成的影响 碳源为菌株的生长繁殖和漆酶的积累提供所需的碳成分。在诱导产酶培养基中,选择质量分数均为 0.5% 的葡萄糖、麦芽糖、木糖、蔗糖、可溶性淀粉考察碳源对漆酶合成的影响。结果如图 1 所示,可溶性淀粉、葡萄糖、麦芽糖均能较好地促进杏鲍菇合成漆酶,其中以麦芽糖最有利于杏鲍菇漆酶的分泌,其酶活性最高达到 2 294.4 U/L。

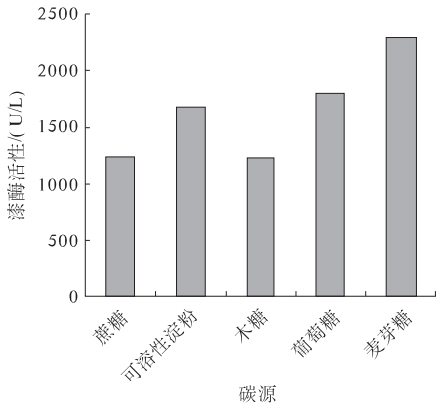


图 1 不同碳源对杏鲍菇漆酶合成的影响

2.1.2 氮源对杏鲍菇漆酶合成的影响 氮源是构成菌株细胞蛋白的物质来源,与培养过程中菌体的正常代谢有关。以葡萄糖为碳源,选择等浓度的有机氮源牛肉膏、蛋白胨和无机氮源尿素、硝酸铵和酒石酸铵考察氮源对漆酶合成的影响。结果如图 2 所示,有机氮源比无机氮源更加有利于漆酶的合成,以蛋白胨为氮源时,杏鲍菇分泌漆酶的能力最高,其酶活力最高达到 2 788.9 U/L。

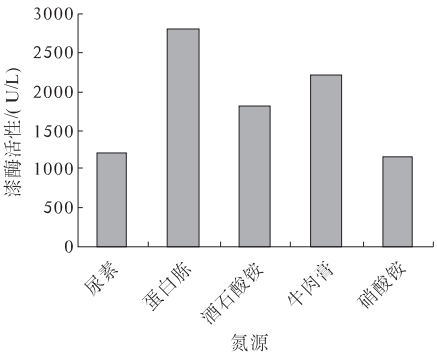


图 2 不同氮源对杏鲍菇漆酶合成的影响

2.1.3  $\text{Cu}^{2+}$  对杏鲍菇漆酶合成的影响 漆酶作为一种含铜的蛋白,它的活性位点由 4 种类型的  $\text{Cu}^{2+}$  组成,试验考察不同浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  对杏鲍菇漆酶的诱导作用,结果如图 3 所示。在一定的浓度范围内,

$\text{Cu}^{2+}$  对漆酶的合成有显著的诱导作用,漆酶活性随  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的增加明显增强,当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度达到 0.2 mmol/L 时漆酶活性达到最大。当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度超过 0.2 mmol/L 时,  $\text{Cu}^{2+}$  对漆酶的促进作用逐渐下降,可能是由于高浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  不利于杏鲍菇菌种的生长。

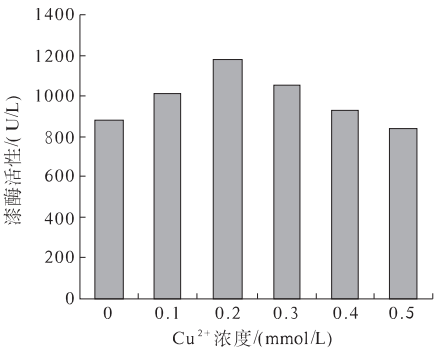


图 3 不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  对杏鲍菇漆酶合成的影响

2.1.4 香兰素对杏鲍菇漆酶合成的影响 考察不同浓度的香兰素对杏鲍菇漆酶的诱导作用,结果如图 4 所示。加入 0.1 ~ 0.5 mmol/L 的香兰素均能促进漆酶的分泌,但是漆酶的合成并不随着香兰素浓度的增加而增强。当香兰素浓度为 0.75 mmol/L 时,杏鲍菇漆酶的分泌受到抑制。

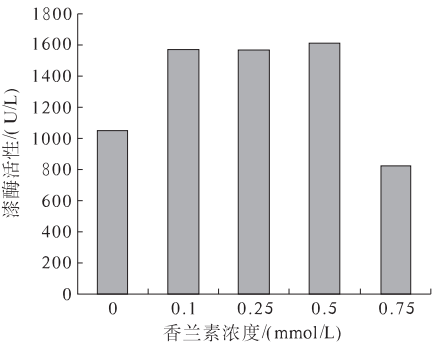


图 4 不同浓度香兰素对杏鲍菇漆酶合成的影响

2.1.5 愈创木酚对杏鲍菇漆酶合成的影响 考察不同浓度的愈创木酚对杏鲍菇漆酶的诱导作用,结果如图 5 所示。愈创木酚能显著促进漆酶的分泌,随着愈创木酚浓度的升高,漆酶活性也逐渐增加,当愈创木酚浓度为 0.01 mmol/L 时,杏鲍菇漆酶活性比对照提高了约 1.8 倍。但浓度过高促进作用反而明显减弱。

2.2 杏鲍菇漆酶对染料的脱色降解

2.2.1 染料最大吸收波长的确定 将酸性铬兰 K (40 mg/L)、溴酚蓝 (10 mg/L)、龙胆紫 (10 mg/L) 用紫外分析仪做 400 ~ 800 nm 的光谱扫描,确定酸性铬兰 K、溴酚蓝及龙胆紫分别在 540 nm、590 nm 及 580 nm 处具有最大吸收波长,且重现性较好。

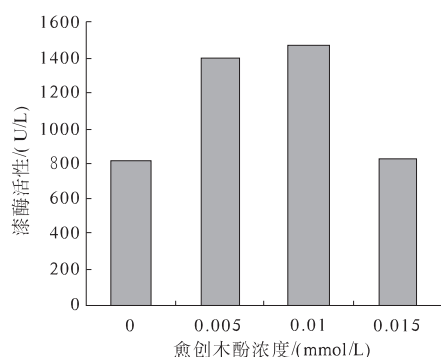


图 5 不同浓度愈创木酚对杏鲍菇漆酶合成的影响

## 2.2.2 反应温度和 pH 值对漆酶脱色染料的影响

将龙胆紫、酸性铬兰 K 和溴酚蓝置于不同温度和 pH 值条件下反应,测定脱色率,探索反应温度和 pH 值对染料脱色的影响,结果如图 6、7 所示。3 种染料的脱色率均随着反应温度和 pH 值的升高呈现先增加后减小的趋势,当温度达到 40 ℃ 时,龙胆紫、酸性铬兰 K、溴酚蓝的脱色率最高,分别达到 63.8%、76.9%、69.1%。龙胆紫最适降解 pH 值为 5.0,而酸性铬兰 K 和溴酚蓝在 pH 值 4.5 ~ 5.0 内具有较好的脱色效果。

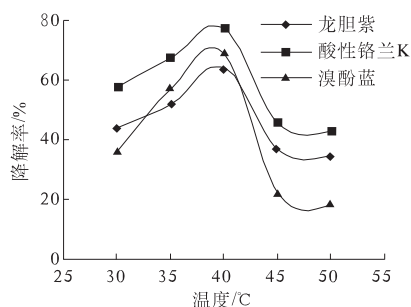


图 6 反应温度对漆酶脱色染料的影响

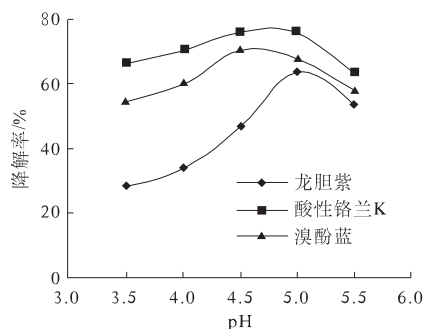


图 7 反应 pH 值对漆酶脱色染料的影响

## 2.2.3 酶用量和染料质量浓度对漆酶脱色染料的影响

在反应体系中添加不同用量的酶和染料,研究不同酶用量和染料质量浓度对染料脱色的影响,结果如图 8、9 所示。3 种染料的脱色效果随着酶用量的增大而增大,在酶用量达到 0.3 U/mL 时,3 种染料的脱色率较高,继续增大酶用量,脱色率增加不

明显。龙胆紫 0 ~ 20 mg/L、溴酚蓝 0 ~ 10 mg/L、酸性铬兰 K 0 ~ 40 mg/L 时,具有较好的脱色效果,脱色率均在 60% 以上。随着染料浓度的继续增加,3 种染料脱色率显著下降。

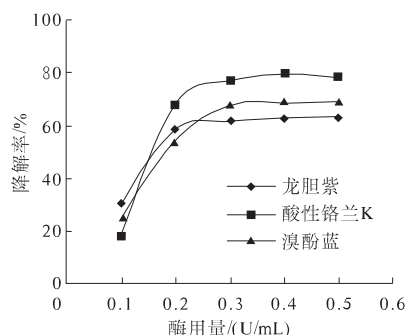


图 8 酶用量对漆酶脱色染料的影响

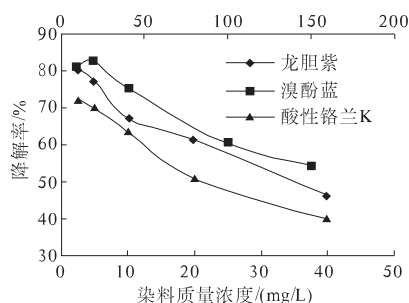


图 9 染料质量浓度对漆酶脱色染料的影响

## 3 结论与讨论

漆酶是公认的木素降解酶之一,主要由白腐真菌分泌,可以通过分子氧使酚化合物氧化,脱除木素,使纸浆造纸、纺织印染工业中排放的废物脱色和降解,显著降低污染。目前,对漆酶的研究主要针对朱红密孔菌<sup>[8]</sup>、杂色云芝<sup>[11,14]</sup>、毛栓菌<sup>[17]</sup>等菌株,杏鲍菇作为一种可食用白腐菌,人们对它的研究主要在于其营养价值,对其分泌漆酶的能力及其应用的研究还未见报道。

白腐真菌产生的漆酶分为诱导型和组成型 2 类,组成型漆酶在菌体初级生长阶段既已生成,一般较少受到诱导物的影响。诱导型漆酶生成于菌体次级生长阶段,酶活水平受到特定化合物诱导<sup>[19]</sup>。大多数真菌漆酶均为诱导型,酶活水平易受到营养条件及某些酚类底物类似物的影响。漆酶是一种含铜的蓝色多酚氧化酶,其活性与  $\text{Cu}^{2+}$  有着密切的关系。培养基中  $\text{Cu}^{2+}$  存在与否及其浓度是影响漆酶合成的重要因素之一。本试验以杏鲍菇为研究对象,探索营养条件及诱导物对杏鲍菇分泌漆酶的影响。结果表明,杏鲍菇合成漆酶的最佳碳源和氮源分别是麦芽糖和蛋白胨,在一定的浓度范围下,  $\text{Cu}^{2+}$  (最佳诱导浓度 0.2 mmol/L)、愈创木酚 (最佳

诱导浓度 0.01 mmol/L) 和香兰素 (0.1 ~ 0.5 mmol/L) 均能较好地诱导漆酶的产生, 诱导物浓度过高则抑制漆酶的产生。漆酶活性的提高, 可能是由于一定浓度的诱导物能诱导杏鲍菇漆酶同工酶的分泌, 由于小分子诱导物通常具有一定的毒性, 当诱导物浓度过高时, 影响菌体的生长, 使得酶活性下降<sup>[19]</sup>。

漆酶由于其独特的作用机制, 在降解合成染料和硝基芳香类物质方面被广泛的应用和深入的研究。试验选择纺织印染工业中常用的染料结晶紫、酸性铬兰 K 和溴酚蓝作为降解对象, 探索影响染料脱色的相关因素。结果表明, 反应温度为 40 ℃ 时, 龙胆紫、酸性铬兰 K 和溴酚蓝的脱色率最高, 分别达到 63.8%、76.9%、69.1%。龙胆紫最适降解 pH 值为 5.0, 酸性铬兰 K 和溴酚蓝在 pH 值 4.5 ~ 5.0 时具有较好的脱色效果。反应温度和 pH 值过高或过低都不利于染料的脱色降解。反应温度过低, 酶活性较低, 反应温度过高, 酶的失活显著都不利于染料的降解。不同 pH 值条件下, 底物与漆酶的结构和稳定性改变, 影响与染料的亲和力, 从而影响脱色效果。最佳酶用量为 0.3 U/mL, 继续增大酶用量, 脱色率增加不显著, 可能是底物与漆酶的活性中心结合已经达到饱和。龙胆紫、溴酚蓝、酸性铬兰 K 质量浓度分别小于 20 mg/L、10 mg/L、40 mg/L 时, 具有较好的脱色效果, 浓度继续增加, 3 种染料脱色率明显下降, 可能是高浓度的染料对漆酶产生了较大的毒性, 大部分漆酶在失活之前没有参与催化反应<sup>[1]</sup>, 因此对染料的脱色效果下降。

由于杏鲍菇漆酶游离酶的不稳定性, 使得染料降解率不高。有文献<sup>[3,20]</sup>报道, 漆酶在一些小分子氧化还原介体的协助下具有更强的催化氧化能力, 从而提高漆酶对染料的脱色效果, 由于这些介体相对来说价格较贵, 限制了其实际应用。本实验室目前正在研究杏鲍菇漆酶的固定化及其对染料脱色的影响, 以期加强漆酶的稳定性和重复利用性, 提高染料脱色率, 促进漆酶在工业废水脱色中的应用等方面提供一定的理论基础和应用参考。

#### 参考文献:

- [1] 湛斌, 赵亮亮, 孙秋芳, 等. 红芝所产漆酶对蒽醌染料的脱色研究[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(11): 50-53.
- [2] 许玫英, 郭俊, 岑英华, 等. 染料的生物降解研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 138-143.
- [3] 朱林, 洪宇植, 方泽民, 等. 真菌漆酶对蒽醌和偶氮类活性染料的脱色[J]. 中国科技论文在线, 2010, 5(3): 224-227.
- [4] Forgacs E, Cserhúti T, Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review[J]. Environment International, 2004, 30(7): 953-971.
- [5] Anjaneyulu Y, Chary N S, Raj D S. Decolourisation of industrial effluents-available methods and emerging technologies—a review[J]. Environmental Science and Biotechnology, 2005, 4(4): 245-273.
- [6] Ahn D, Chang W, Yoon T. Dyestuff wastewater treatment using chemical oxidation, physical adsorption and fixed bed biofilm process [J]. Process Biochemistry, 1999, 34(5): 429-439.
- [7] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(2): 215-242.
- [8] 卢磊, 赵敏, 赵丽艳, 等. 重组血红密孔菌漆酶的纯化、酶学性质及染料脱色研究[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(6): 125-129.
- [9] 姚强, 高兴喜, 宫志远, 等. 灵芝漆酶高产菌株的筛选及产酶诱导[J]. 中国酿造, 2010, 29(11): 29-31.
- [10] Thurston C F. The structure and function of fungal laccase [J]. Microbiology, 1994, 140: 19-26.
- [11] 张玉, 洪枫. 优化彩绒革盖菌产漆酶条件及染料脱色研究[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(3): 41-46.
- [12] Baldrian P. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 63(5): 560-563.
- [13] Wong Y, Yu J. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes [J]. Water Research, 1999, 33(16): 3512-3520.
- [14] 闫世梁, 李培睿, 李宗义, 等. 云芝 *Trametes versicolor* 1126 所产漆酶对靛蓝废水脱色的初步研究[J]. 菌物学报, 2008, 27(2): 309-315.
- [15] 吴丽洁, 林连兵, 陈克利, 等. 不同诱导物对白腐菌 XG8 菌株产漆酶的影响[J]. 昆明理工大学学报: 理工版, 2008, 33(6): 94-97.
- [16] Jiang R W, Ma S C, But P P, et al. Isolation and characterization of spirocaesalmin, a novel rearranged coumarin diterpenoid from *Caesalpinia minax* Hance [J]. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 2001(22): 2920-2923.
- [17] 王宜磊. 毛栓菌漆酶诱导及部分特性研究[J]. 生物技术, 2003, 13(3): 14-16.
- [18] Young L, Yu J. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes [J]. Water Research, 1997, 31(5): 1187-1193.
- [19] 周蕊. 滑菇漆酶的诱导、纯化, cDNA 克隆及表达 [D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- [20] Camarero S, Ibarra D, Martínez M J, et al. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 1775-1784.