

克雷伯氏菌对三苯基锡的酶促降解特性

叶锦韶^{1,2}, 史一枝¹, 尹华^{1*}, 麦碧嫻², 彭辉¹, 秦华明¹, 龙焰¹, 赖新强³

(1. 暨南大学环境工程系, 广州 510632; 2. 中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640; 3. 暨南大学实验技术中心, 广州 510632)

摘要:研究了肺炎克雷伯氏菌对三苯基锡(TPhT)的酶促降解性能,并对酶促反应影响因素的作用机制进行了探讨,以期阐明有机锡的微生物降解机制提供实验依据.研究证明,菌体、分泌物和胞内降解酶均具有降解 TPhT 的能力,在 30℃ 转速为 130 r · min⁻¹ 的摇床中避光处理 2 h 后,对 3 mg · L⁻¹ TPhT 的降解率分别为 10.9%、5.3% 和 47.9%.影响因素实验表明,降解介质、pH、温度、TPhT 浓度和金属离子均会对 TPhT 的酶促降解效果产生影响,其中 TPhT 酶促反应的最适 pH 和温度分别为 8 和 50℃. Mg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 在合适的浓度范围内,均会促进 TPhT 的降解.当 Mg²⁺ 的浓度为 15 mg · L⁻¹ 时,胞内酶对 TPhT 的降解率高达 73.8%.金属离子的促进效果主要与其对酶的激活、作为电子受体或电子供体参与 TPhT 酶促降解等作用有关.TPhT 的降解速率与其浓度呈现理想的线性关系.该反应的 $V_{\max}$ 和 K_m 分别为 0.15 mg · (L · min)⁻¹ 和 47.1 mg · L⁻¹.

关键词:肺炎克雷伯氏菌;三苯基锡;有机锡;降解酶;生物降解

中图分类号:X172 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)02-0459-06

Characteristics of Biodegradation of Triphenyltin by Enzyme Obtained from *Klebsiella pneumoniae*

YE Jin-shao^{1,2}, SHI Yi-zhi¹, YIN Hua¹, MAI Bi-xian², PENG Hui¹, QIN Hua-ming¹, LONG Yan¹, LAI Xin-qiang³

(1. Department of Environmental Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 3. Center of Experimental Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The objective of this study is to illuminate the mechanism of biodegradation of triphenyltin (TPhT). The removal of TPhT by *Klebsiella pneumoniae* was, therefore, investigated through characteristics studies. The influences of the various parameters were also discussed. The results demonstrated that the cell, extracellular secretion and intracellular enzyme were the effective biomasses for the biodegradation of TPhT. At initial concentration of 3 mg · L⁻¹, 10.9%, 5.3% and 47.9% of TPhT could be degraded by these biomasses respectively at 30℃ within 2 hours under an rotary shaker at 120 r · min⁻¹. The experimental results also showed that the enzyme activity could be affected by the buffers, pH, temperature, metals and the concentration of TPhT. The degradation efficiency would reach the highest point at pH 8, and at the optimal temperature of 50℃. Metals including Mg²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ and Fe³⁺ improved the enzyme activity at certain concentrations. In the presence of 15 mg · L⁻¹ of Mg²⁺, the removal percentage of TPhT was up to 73.8%. It suggested that the metals activated the enzyme and interacted with the TPhT enabling its removal during the biodegradation process. Linear plots of removal ratios versus concentrations of TPhT meant that the biodegradation fitted the Michaelis-Menten model. The $V_{\max}$ and K_m of this biodegradation were 0.15 mg · (L · min)⁻¹ and 47.1 mg · L⁻¹, respectively.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; triphenyltin; organotin; degrading-enzyme; biodegradation

有机锡化合物是应用最广泛和排放量最大的有机金属之一^[1~3],具有高毒性、持久性和生物富集性,可导致包括软体动物、鱼类和哺乳动物在内的物种发生性畸变,并会通过食物链的富集影响生态系统^[4~6].三苯基锡(TPhT)和三丁基锡(TBT)还是目前已知内分泌干扰物中仅有的2种有机金属化合物^[7,8],即使处于 ng/L 的极低浓度水平,也会对海洋浮游生物和软体动物等敏感的水生生物产生毒性^[9,10].

某些微生物因对有机锡具有抗性或可以把有机锡作为碳源加以利用,从而成了水体有机锡降解的

主力.现有的研究报道主要侧重于降解菌的菌种筛选和有机锡微生物降解影响因素探讨^[11~13].但是,水体有机锡微生物降解的研究仍处于缓慢渐进的状态,其微生物降解性能研究还鲜见系统报道^[11,14,15],有关有机锡微生物酶促降解方面的研究则更加薄弱.本实验对前期筛选的肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)进行了胞内降解酶的提取,

收稿日期 2009-03-27;修订日期 2009-05-31

基金项目:国家自然科学基金项目(50778081,50278040)

作者简介:叶锦韶(1977~),男,博士研究生,讲师,主要研究方向为水污染控制与修复,E-mail:folaye@126.com

* 通讯联系人,E-mail:zhjgc@jnu.edu.cn

开展了 TPhT 的酶促降解研究,分析了 pH、温度、酶量、底物浓度和金属离子等对 TPhT 酶促降解的影响,以期探明有机锡污染物酶促反应的主要影响因素及其作用机制.研究成果对阐明有机锡的生物降解机制及指导其生物修复具有重要的环境意义.

1 材料与方法

1.1 材料

三苯基氯化锡储备液:用甲醇溶解三苯基氯化锡,配制成 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,4℃ 保存待用;三苯基氯化锡使用液:用储备液配制成 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的使用液;实验菌种:三苯基锡降解菌肺炎克雷伯氏菌(*K. pneumoniae*)由本课题组筛选和保藏;牛肉膏蛋白胨培养液:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,NaCl 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 调节至 7.2~7.4,121℃ 灭菌 30 min.

1.2 方法

1.2.1 TPhT 的酶促降解实验

K. pneumoniae 于牛肉膏蛋白胨培养液中培养 36 h 后,离心得到上清液和菌体细胞.用去离子双蒸水洗涤菌体,收集洗涤液合并上清液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜抽滤后进行 TPhT 降解实验,考察菌体分泌物对 TPhT 的降解效果.

称取干重为 0.015 g 的湿菌体,悬浮于 20 mL 蒸馏水中进行超声波破壁,离心取上清液用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜抽滤后,加入 TPhT 并补充蒸馏水或缓冲液至水样体积为 20 mL,并使 TPhT 的初始浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.在水浴 30℃、 $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下避光处理一定的时间,取出样品萃取并检测 TPhT 浓度,考察菌体胞内酶对 TPhT 的降解效果.

降解率 =

$$\frac{(\text{TPhT 初始浓度} - \text{降解后 TPhT 浓度})}{\text{TPhT 初始浓度}} \times 100\%$$

1.2.2 TPhT 的萃取和检测

降解后,在含有有机锡的样品中加入 100 mg NaCl 和 2 mL 1 mol/L HCl 溶液,将样品的 pH 调至酸性(pH 约为 2),再加入 10 mL 乙酸乙酯,剧烈振荡使其充分混合,然后静置 30 min 使其分层,收集乙酸乙酯有机相.重复上述过程,萃取 2 次,合并 2 次所得有机相,并加入一定量的无水 Na_2SO_4 除去有机相中的水分,在 40℃ 恒温水浴下进行旋转蒸发,将有机相蒸干,最后用流动相将样品从瓶中洗出,定容至 10 mL,利用岛津高效液相色谱仪(Shimadzu, Japan)进行 TPhT 检测.

检测条件:分离柱为 C18 反相柱(150 mm);使

用紫外检测器,检测波长 206 nm;流动相 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}:V_{0.1\% \text{ 三氟乙酸溶液}} = 50:45:5$,流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;分析时间为 10 min;进样量 20 μL .

2 结果与讨论

2.1 *K. pneumoniae* 菌体、分泌物和胞内降解酶对 TPhT 的降解效果

在水浴 30℃ 转速为 $130 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的摇床中,分别避光处理 2 h 和 24 h 后,*K. pneumoniae* 的菌体、分泌物和胞内降解酶对 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhT 的降解效果如图 1 所示.结果表明,胞内酶是 TPhT 降解的主力,处理 2 h 后,对 TPhT 的降解率达 47.9%.菌体分泌物也含有降解酶,但是该酶对 TPhT 的降解效果不佳,2 h 对 TPhT 的降解率仅为 5.3%.分泌物的作用主要是对 TPhT 进行初步的降解,从而降低 TPhT 的毒性,并有利于 TPhT 及其中间产物在菌体细胞内的进一步降解.具备胞外和胞内降解酶的完整菌体对 TPhT 的降解效果,劣于胞内降解酶单独处理 TPhT 的效果,2 h 对 TPhT 的降解率为 10.9%.这主要是由于菌体要通过细胞壁的吸附、跨膜运输等作用才能把 TPhT 积累到细胞内,该运输过程缓慢^[13,16],导致完整细胞内降解酶与 TPhT 接触的机会明显小于离体胞内酶.菌体降解 TPhT 的前 2 h,TPhT 的降解以胞外降解为主,因此降解率较低;24 h 时,降解率显著提高,说明胞内酶在该阶段起了主要作用.对比分泌物和胞内酶在 2 h 和 24 h 降解 TPhT 的结果可知,TPhT 的酶促降解分快速反应期和缓慢期.快速期发生于降解初期,这主要是因为此阶段酶的活性和稳定性优于后期,此外,该阶段 TPhT 的浓度较高,因而反应速率较高;与 2 h 的处

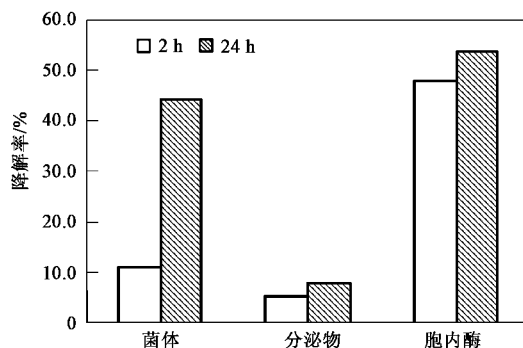


图 1 *K. pneumoniae* 菌体、分泌物和胞内降解酶对 TPhT 的降解

Fig. 1 Degradation of TPhT by cell, extracellular secretion and intracellular enzyme of *K. pneumoniae*

理效果相比 ,24 h 对 TPhT 的降解率增幅不大. 因此 ,以下实验主要研究了胞内酶在 2 h 时对 TPhT 的降解性能.

2.2 降解介质对胞内酶降解 TPhT 的影响

为研究反应体系对该酶促反应的影响情况 ,本实验在去离子蒸馏水、磷酸缓冲液、B&R 缓冲液和 Tris 缓冲液等 4 种介质中 ,研究了胞内酶对 TPhT 的降解效果 ,结果如图 2 所示. 磷酸缓冲液的效果最好 ,蒸馏水的效果与之相差不大 ,这说明该酶促反应前后没有引起体系 pH 发生明显变化. 此外 ,自然水体的 pH 较稳定 ,一般为 6 ~ 8 之间 ,蒸馏水的性质比磷酸缓冲液更接近自然水体. 综合上述原因 ,在以下的实验中采用去离子蒸馏水作为胞内酶促降解介质.

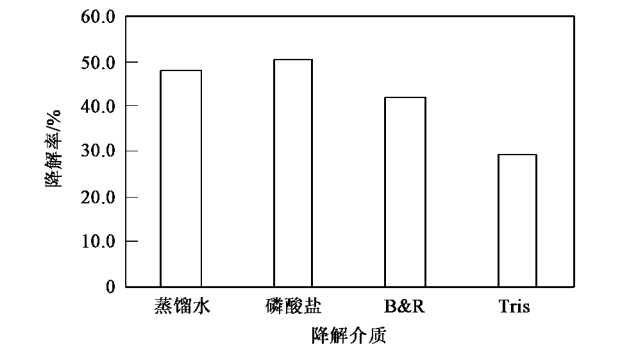


图 2 降解介质对酶促反应效果的影响

Fig.2 Effect of buffers on degradation of TPhT by endoenzyme

2.3 pH 对 TPhT 酶促降解的影响

在 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0 的去离子双蒸水中 ,开展 TPhT 的酶促降解性能实验. 图 3 的变化曲线基本呈对称状 ,总体趋势较平缓 ,没有出现陡峭的升降. 由于 pH 可影响酶活性中心必需基团的解离程度和催化基团中质子供体或受体所需的离子化状态^[17 ,18] ;也可影响有机锡和辅酶的解离程度 ,从而影响酶与有机锡的结合. 因此 ,该降解曲线相对平缓的变化趋势反映了 pH 的变化没有导致降解酶的构型发生突变 ,说明 *K. pneumoniae* 的胞内降解酶对 pH 的适应性较理想 ,该特性有利于降解酶对有机锡的生物降解.

2.4 温度对胞内酶降解 TPhT 的影响

图 4 显示 ,在实验设定的温度范围内 ,TPhT 降解的变化趋势呈倒“ U ”形 ,适宜温度在 40 ~ 50℃ 之间. 与化学反应相似 ,升温会增加分子间的接触机会 ,因而该酶促反应的速率也会随温度的升高而加快. 但是 ,作为生物催化剂 ,酶分子的化学结构决定

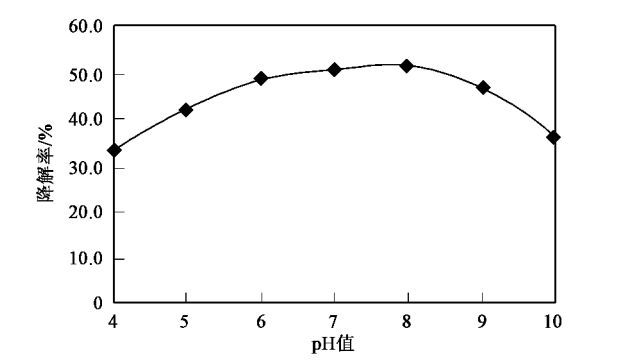


图 3 pH 对胞内酶降解 TPhT 的影响

Fig.3 Degradation of TPhT in different pH by endoenzyme

了其活性 ,温度过高会导致酶构象的破坏 ,从而丧失其原有的生物活性^[19]. 在反应体系的温度低于最适温度时 ,升温的作用以加快酶促反应为主 ,温度高于最适温度后 ,则酶因升温变性造成的活性降低起主导作用 ,从而导致酶促反应速度随温度升高而降低. 最适温度是上述变化的综合结果. 此外 ,最适温度不是酶本身的固有价值 ,而与酶促降解时间的长短有关 ,当时间为 2 h 时 ,该 TPhT 降解酶的最适温度为 50℃ .

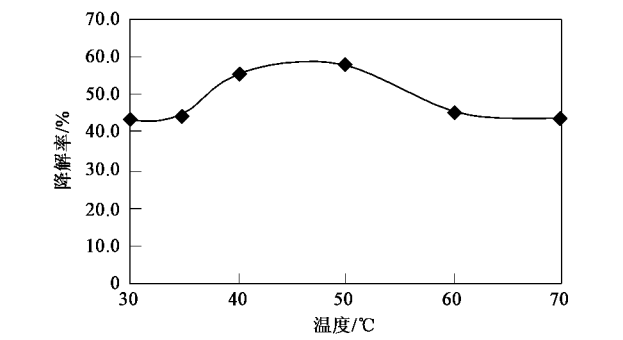


图 4 温度对胞内酶降解 TPhT 的影响

Fig.4 Degradation of TPhT in different temperature by endoenzyme

2.5 胞内酶对不同浓度 TPhT 的降解效果

图 5 显示 ,在底物浓度为 0 ~ 15 mg · L⁻¹ 的范围内 ,TPhT 的降解率随着其浓度的增加而增加 ;当底物浓度超过 15 mg · L⁻¹ 时 ,降解率呈下降的趋势. 但是 ,TPhT 的降解速率在 TPhT 浓度为 0 ~ 150 mg · L⁻¹ 的范围内 ,均呈线性上升的趋势. 该速率变化结果反映了 TPhT 浓度的增加并没有对离体胞内外产生可影响反应活性的毒性. 将米氏方程转变为 :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} = \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

式中 [S]为 TPhT 浓度 ,v 为 TPhT 降解速率 ,V_{max} 为

最大降解速率, K_m 为米氏常数, 以 $\frac{1}{[S]}$ 为横坐标, $\frac{1}{v}$ 为纵坐标对 TPhT 的降解速率进行 Lineweaver-Burk 作图^[20], 结果如图 6 所示. 结果表明, TPhT 的酶促降解速率的双倒数曲线具有非常理想的线性关系, V_{max} 为 $0.15 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$, K_m 为 $47.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 该数值表明 TPhT 的降解是个缓慢的过程. 因为 K_m 是酶反应初速度为 V_{max} 一半时 TPhT 的浓度, 因此, TPhT 的酶促降解反应要接近 V_{max} 时, 所需 TPhT 的浓度会很高^[21].

但是, 环境中 TPhT 的浓度通常较低, 一般不超过 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 此外, 与本实验条件相比, 环境中的降解菌与 TPhT 接触的机会较小. 而且, 与菌体吸附后, TPhT 还要通过缓慢的跨膜运输才能进入细胞内, 被胞内酶进一步地降解. 上述各种因素决定了 TPhT 的降解周期很长, 现有的现场监测结果也表明有机锡的半衰期长达数月, 在沉积物中的半衰期则更长, 可达数年至数十年^[22, 23].

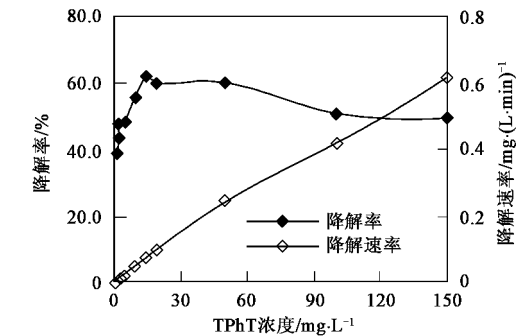


图 5 胞内酶对不同浓度 TPhT 的降解效果
Fig. 5 Degradation of TPhT with different concentration by endoenzyme

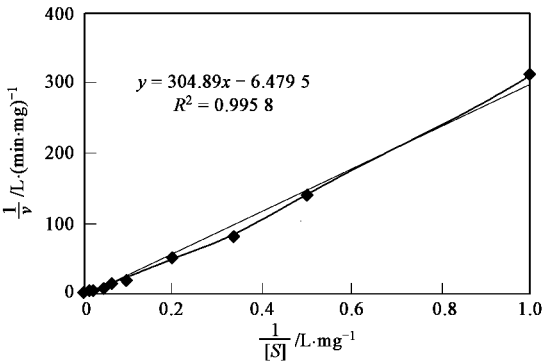


图 6 TPhT 降解速率的 Lineweaver-Burk 图
Fig. 6 Lineweaver-Burk plot of degradation of TPhT

2.6 金属离子对 TPhT 的降解效果的影响

金属离子可以作为酶的辅助因子, 使酶呈现出活性, 或作为酶的激活剂, 提高酶的稳定性和反应活性^[24]. 其中 Mg^{2+} 是 ATP 酶等多种酶的金属辅基, 还可作为变构激活剂, 激活数百种酶, 参与糖代谢、脂肪酸代谢、蛋白质合成和信号转导^[25]. Mn^{2+} 是精氨酸酶、脯氨酸胺酶、丙酮酸羧化酶、RNA 多聚酶和超氧化物歧化酶等酶的成分. 此外, Mn^{2+} 还有激活水解酶、脱羧酶、磷酸化酶和羧化酶等多种酶的作用, 并可能与 Mg^{2+} 相互替代, 成为激活酶的激活剂^[26]. Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 作为微生物细胞色素组成部分, 是生物氧化还原反应中的主要电子载体^[27], 是能量代谢中不可缺少的物质, 已有文献指出细胞色素 P-450 与有机锡的生物代谢有关^[28]. 因此, 本实验考察了 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对该胞内酶降解活性的影响. 图 7 显示, 这 4 种金属离子在合适的浓度范围内, 均会对酶促反应产生促进作用. 其中 Mg^{2+} 和 Fe^{2+} 的作用最明显, 能有效地提高 TPhT 酶促降解的效果; Mn^{2+} 和 Fe^{3+} 的促进作用则相对较小.

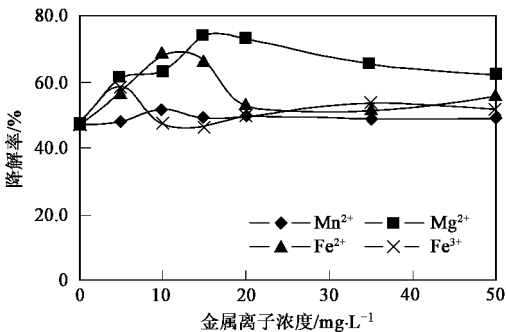


图 7 金属离子对 TPhT 的降解效果
Fig. 7 Degradation of TPhT with different metal by endoenzyme

实验中, Mg^{2+} 显著的促进作用与其对酶的激活能力有关. Fe^{3+} 可以作为电子受体参与 TPhT 的降解反应. 但是, 由于 Fe^{3+} 具有很强的氧化能力, 会催化生物分子中巯基的自氧化并产生自由基, 从而对降解酶产生负面影响. 实验结果表明, 当 Fe^{3+} 浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Fe^{3+} 促进了 TPhT 的降解. 此时, Fe^{3+} 以作为电子受体的促进作用为主. 随着浓度的增加, Fe^{3+} 对酶产生了氧化破坏^[27], 因此, 削弱了其促进作用. 由于氧化能力弱于 Fe^{3+} , 因此, Fe^{2+} 的促进作用优于 Fe^{3+} . 由于 Mn^{2+} 的促进作用不明显, 因此, Mn^{2+} 可能没有激活该降解酶的能力^[29, 30], 而仅仅是在很小的程度上促进了 TPhT 在反应中正确定向.

3 结 论

(1) 肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的菌体、分泌物和胞内降解酶均具有降解 TPhT 的能力 , 在 30℃ 转速为 130 r · min⁻¹ 的摇床中避光处理 2 h 后 , 对 3 mg · L⁻¹ TPhT 的降解率分别为 10. 9% 、 5. 3% 和 47. 9% .

(2) pH、温度、TPhT 浓度和金属离子等环境因素均会对胞内酶降解 TPhT 的效果产生影响. TPhT 的酶促降解速率与 TPhT 浓度呈现理想的线性关系 , 酶促反应的 $V_{\max}$ 和 K_m 分别为 0. 15 mg · (L · min)⁻¹ 和 47. 1 mg · L⁻¹ , 反映了提高降解速率所需的底物浓度过高 , 证明 TPhT 的降解是个缓慢的过程. Mg²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 等金属离子在合适的浓度范围内 , 均会促进 TPhT 的降解. 其中 Mg²⁺ 的作用最明显 , 能有效地提高 TPhT 酶促降解的效果 , 当 Mg²⁺ 的添加浓度为 15 mg · L⁻¹ 时 , 胞内酶对 TPhT 的降解率高达 73. 8% .

参考文献 :

[1] Ilgen G , Glindemann D , Herrmann R , *et al.* Organometals of tin , lead and mercury compounds in landfill gases and leachates from Bavaria , Germany [J]. Waste Management , 2008 , **28** (9) : 1518-1527.

[2] Marcic C , Hecho I L , Denaix L , *et al.* TBT and TPhT persistence in a sludged soil [J]. Chemosphere , 2006 , **65** (11) : 2323-2332.

[3] Diez S , Jover E , Albaigés J , *et al.* Occurrence and degradation of butyltins and wastewater marker compounds in sediments from Barcelona harbor , Spain [J]. Environment International , 2006 , **32**(7) : 858-865.

[4] Micael J , Reis-Henriques M A , Carvalho A P , *et al.* Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin , triphenyltin) and a xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environment International , 2007 , **33**(8) : 1035-1039.

[5] Satone H , Oshima Y , Shimasaki Y , *et al.* Tributyltin-binding protein type 1 has a distinctive lipocalin-like structure and is involved in the excretion of tributyltin in Japanese flounder , *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquatic Toxicology , 2008 , **90**(4) : 292-299.

[6] Yang R Q , Zhou Q F , Liu J Y , *et al.* Butyltins compounds in molluscs from Chinese Bohai coastal waters [J]. Food Chemistry , 2006 , **97**(4) : 637-643.

[7] Pavoni B , Centanni E , Valcanover S , *et al.* Imposed levels and concentrations of organotin compounds (TBT and its metabolites) in *Nassarius nitidus* from the Lagoon of Venice [J]. Marine Pollution Bulletin , 2007 , **55**(10-12) : 505-511.

[8] Chandrinou S , Stasinakis A S , Thomaidis N S , *et al.*

Distribution of organotin compounds in the bivalves of the Aegean Sea , Greece [J]. Environment International , 2007 , **33** (2) : 226-232.

[9] Veltman K , Huijbregts M A J , van den Heuvel-Greve M J , *et al.* Organotin accumulation in an estuarine food chain : Comparing field measurements with model estimations [J]. Marine Environmental Research , 2006 , **61** (5) : 511-530.

[10] Murai R , Sugimoto A , Tanabe S , *et al.* Biomagnification profiles of tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) in Japanese coastal food webs elucidated by stable nitrogen isotope ratios [J]. Chemosphere , 2008 , **73**(11) : 1749-1756.

[11] Cruz A , Caetano T , Suzuki S , *et al.* *Aeromonas veronii* , a tributyltin (TBT)-degrading bacterium isolated from an estuarine environment , Ria de Aveiro in Portugal [J]. Marine Environmental Research , 2007 , **64**(5) : 639-650.

[12] 叶锦韶 , 史一枝 , 尹华 , 等. 三苯基锡吸附降解菌的分离及特性研究 [J]. 环境科学 , 2009 , **30**(8) : 2452-2457.

[13] Mimura H , Sato R , Furuyama Y , *et al.* Adsorption of tributyltin by tributyltin resistant marine *Pseudoalteromonas* sp. cells [J]. Marine Pollution Bulletin , 2008 , **57**(6-12) : 877-882.

[14] Martins J D , Jurado A S , Moreno A J M , *et al.* Comparative study of tributyltin toxicity on two bacteria of the genus *Bacillus* [J]. Toxicology in Vitro , 2005 , **19**(7) : 943-949.

[15] Tsang C K , Lau P S , Tarn N F Y , *et al.* Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chlorella* species [J]. Environmental Pollution , 1999 , **105**(3) : 289-297.

[16] Ganea C , Fendler K. Bacterial transporters : Charge translocation and mechanism [J]. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Bioenergetics , 2009 , **1787**(6) : 706-713.

[17] Feitosa E , Catelam K T , Hasmann F A , *et al.* Phase diagrams of a CTAB/organic solvent/buffer system applied to extraction of enzymes by reverse micelles [J]. Journal of Chromatography B , 2008 , **862**(1-2) : 58-63.

[18] Serebryakova L T , Zorin N A , Karyakin A A. Improvement of hydrogenase enzyme activity by water-miscible organic solvents [J]. Enzyme and Microbial Technology , 2009 , **44** (5) : 329-333.

[19] Pinsach J , de Mas C , Lopez-Santin J , *et al.* Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures [J]. Enzyme and Microbial Technology , 2008 , **43**(7) : 507-512.

[20] Blum P , Hunkeler D , Weede M , *et al.* Quantification of biodegradation for o-xylene and naphthalene using first order decay models , Michaelis-Menten kinetics and stable carbon isotopes [J]. Journal of Contaminant Hydrology , 2009 , **105**(3-4) : 118-130.

[21] Tzafirri A R , Edelman E R. Quasi-steady-state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the Michaelis-Menten constant [J]. Journal of Theoretical Biology , 2007 , **245** (4) : 737-748.

[22] Dubey S K , Roy U. Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria [J]. Applied Organometallic Chemistry ,

- 2003 , **17**(1) : 3-8.
- [23] Tessier E , Amouroux D , Morin A , *et al.* (Tri)Butyltin biotic degradation rates and pathways in different compartments of a freshwater model ecosystem [J]. Science of the Total Environment , 2007 , **388** (1-3) : 214-233.
- [24] Ben-Knaz R , Avnir D. Bioactive enzyme-metal composites : The entrapment of acid phosphatase within gold and silver [J]. Biomaterials , 2009 , **30**(7) : 1263-1267.
- [25] Pauza N L , Cotti M J P , Godar L , *et al.* Disturbances on Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) enzyme activity by Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^{+} , K^{+} and Li^{+} : analysis based on coordination geometry and acid-base Lewis capacity [J]. Journal of Inorganic Biochemistry , 2005 , **99**(2) : 409-414.
- [26] Arantes V , Milagres A M F. The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe^{3+} -reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B [J]. Enzyme and Microbial Technology , 2007 , **42**(1) : 17-22.
- [27] Thariat J , Collin F , Marchetti C , *et al.* Marked difference in cytochrome c oxidation mediated by $HO \cdot$ and/or O^{2-} free radicals *in vitro* [J]. Biochimie , 2008 , **90**(10) : 1442-1451.
- [28] Ohhira S , Enomoto M , Matsui H. *In vitro* metabolism of tributyltin and triphenyltin by human cytochrome P-450 isoforms [J]. Toxicology , 2006 , **228**(2-3) : 171-177.
- [29] Islam N N , Igarashi K , Tachibana T , *et al.* Synthesis and degradation of acyl peptide using enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering , 2008 , **105**(3) : 282-287.
- [30] DeFreitas-Silva G , Reboucas J S , Spasojević I , *et al.* SOD-like activity of Mn (II) β -octabromo-meso-tetrakis (*N*-methylpyridinium-3-yl) porphyrin equals that of the enzyme itself [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics , 2008 , **477**(1) : 105-112.