



石油降解酶的筛选、固定化及添加表面活性剂强化其对石油的降解

杨静^{1,2,3}, 黄青松^{1,2,3}, 姚从禹^{1,2,3}, 时梦^{1,2,3}, 顾磊⁴, 许科伟⁴, 吴敬^{1,2,3*}, 颜正飞^{1,2,3*}

- 1 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122
- 2 江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122
- 3 江南大学 教育部食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122
- 4 中国石化石油勘探开发研究院无锡石油地质研究所, 江苏 无锡 214126

杨静, 黄青松, 姚从禹, 时梦, 顾磊, 许科伟, 吴敬, 颜正飞. 石油降解酶的筛选、固定化及添加表面活性剂强化其对石油的降解[J]. 微生物学报, 2024, 64(6): 1936-1947.

YANG Jing, HUANG Qingsong, YAO Congyu, SHI Meng, GU Lei, XU Kewei, WU Jing, YAN Zhengfei. Petroleum-degrading enzymes: screening and performance improvement by immobilization and surfactants[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(6): 1936-1947.

摘要: 在石油开采和加工过程中产生的含油污泥是石油化工行业中主要的污染源, 会对周边环境造成持续性的危害。生物法降解被认为是一种有效且可持续的技术而备受关注。目前的研究多聚焦在微生物法降解石油, 而酶法降解鲜有报道。【目的】本研究旨在优选石油高效降解酶, 并深入分析其降解特性, 以期构建一套酶法降解石油的体系。【方法】基于分子对接模拟技术, 分析酶与石油类常见底物的结合可能性及结合模式, 通过石油降解实验优选降解酶; 通过添加表面活性剂及酶固定化进一步提高酶对石油的降解效果。【结果】利用分子对接模拟及实验验证获得 5 种具有石油降解能力的生物酶, 其中枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源的漆酶 BsLac 对石油的降解率最高, 72 h 可降解 34.1% 的石油; 进一步研究发现, 表面活性剂的添加均可促进 BsLac 对石油的降解, 其中槐糖脂的促进作用尤为显著。当槐糖脂终浓度为 1 000 mg/L 时, 石油的降解率最高, 为 46.3%; 然而, 2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐的添加对 BsLac 降解石油的促进作用并不明显; 固定化结果表明, 以花生壳为吸附载体固定化的 BsLac 对石油的降解率最高, 为 56.3%。【结论】本研究基于分子对接模拟和实验筛选获得了石油降解酶 BsLac, 固定化的 BsLac

资助项目: 国家自然科学基金(42307279)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42307279).

*Corresponding authors. E-mail: WU Jing, jingwu@jiangnan.edu.cn; YAN Zhengfei, zhengfeiyan@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-10-24; Accepted: 2024-03-12; Published online: 2024-03-28

可实现石油的高效降解, 为生物酶法降解石油的进一步探索奠定了实验和理论基础。

关键词: 石油降解酶; 表面活性剂; 固定化; 漆酶

Petroleum-degrading enzymes: screening and performance improvement by immobilization and surfactants

YANG Jing^{1,2,3}, HUANG Qingsong^{1,2,3}, YAO Congyu^{1,2,3}, SHI Meng^{1,2,3}, GU Lei⁴,
XU Kewei⁴, WU Jing^{1,2,3*}, YAN Zhengfei^{1,2,3*}

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 International Joint Laboratory on Food Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

4 Wuxi Research Institute of Petroleum Geology, Sinopec Petroleum Exploration and Production Research Institute, Wuxi 214126, Jiangsu, China

Abstract: The oily sludge produced in petroleum exploitation and processing is the main pollution source in the petrochemical industry, causing continuous harm to the surrounding eco-environment. Bioremediation as an effective and sustainable technology has attracted much attention. However, the current studies focus on the microbial degradation of petroleum in oily sludge and rarely report enzymatic degradation. **[Objective]** This study aims to screen petroleum-degradation enzymes by computer simulation and experimental techniques and improve the degradation effect by adding surfactants and enzyme immobilization. **[Methods]** Molecular docking was employed to analyze the possibility and mode of binding of target enzymes to common substrates in petroleum and the strongest degrading enzyme was screened out by enzymatic degradation experiments. Furthermore, the degradation conditions of the enzyme screened out were optimized, and the degradation effect on petroleum was further improved by immobilization and addition of surfactants. **[Results]** A total of five petroleum-degrading enzymes were obtained by molecular docking simulation and experimental verification. Among them, *Bacillus subtilis* laccase (BsLac) exhibited the highest degradation rate of petroleum, which reached 34.1% at the time point of 72 h. Surfactants improved the degradation of BsLac on petroleum, and sophorolipid showcased the strongest promoting effect, with the highest degradation rate of 46.3% at the sophorolipid concentration of 1 000 mg/L. However, 2,2'-azinoo-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) did not present promoting effect on BsLac for petroleum degradation. The BsLac immobilized by peanut shell as the adsorption carrier exhibited the highest petroleum degradation rate (56.3%). **[Conclusion]** We screened out the strongest petroleum-degrading enzyme by molecular docking and experimental verification. Furthermore, the immobilization of BsLac can improve the degradation performance on petroleum. The findings lay an experimental and theoretical foundation for further exploring the enzymatic degradation of petroleum.

Keywords: petroleum-degrading enzyme; surfactant; immobilization; laccase

石油作为“工业的血液”已广泛应用于人类社会^[1], 然而其在开采、运输、加工等过程中不可避免地会产生泄漏, 对生态环境造成持续的危害。因此, 石油污染是石油工业可持续发展中最为紧迫的问题之一^[2]。目前, 物理法(焚烧、填埋等)和化学法(溶剂萃取、化学氧化等)修复石油污染技术相对成熟, 但其缺乏有效的生态友好处理工艺, 存在成本高、易造成二次污染、修复不彻底等缺点^[3-4]。生物法被认为是最具前景且绿色可持续的修复技术, 已被广泛研究^[5-6]。

生物法处理石油污染多聚焦于微生物法, 多种微生物均被证实具有石油降解能力^[7], 如假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、枯草芽孢杆菌属(*Bacillus*)等, 并从中鉴定出一系列石油降解酶, 如加氧酶、过氧化物酶、漆酶、细胞色素酶 P450 等^[8]。生物酶多作为补充剂来加速微生物降解石油进程, 如在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源漆酶参与下, 由短芽孢杆菌(*Brevibacillus* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)和申氏不动杆菌(*Acinetobacter schindleri*)组成的菌群对石油的降解速率常数由每天 0.112 提升至每天 0.198^[9]。现阶段, 仅以生物酶降解石油的研究还处于起步阶段, 相关报道相对较少。然而, 生物酶对石油衍生物(塑料与蒽醌)的降解研究已有详细论述, 如漆酶可降解经紫外线预处理的聚乙烯塑料, 重均分子量降低约 40%^[10]; 过氧化物酶可在 108 h 内降解 90% 的蒽醌物质^[11]。相对于微生物具有未知的环境安全问题, 生物酶则不会对环境产生显著影响, 是一个环境友好的石油污染修复过程。

在系列降解酶中, 漆酶因其高热稳定性和对有机物的高耐受性, 在有机污染降解方面具有显著优势^[12-13]。漆酶由于氧化还原电位较低(0.4–0.8 V), 导致其对芳香族和非酚类等有机污染物的降解效果不理想。因此, 可通过添加小分子

化合物, 如 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azinoo-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS]、紫尿酸(5-hydroxyiminobarbituric acid, VIO)、1-羟基苯并三唑(1-hydroxybenzotriazole, HBT)等, 赋予漆酶较高的氧化还原电位来提高其对有机污染物的降解效率^[14-15]。如通过添加终浓度为 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABTS, 漆酶对羟基化多溴联苯醚的降解率可提高 20 多倍^[16]。进一步研究发现, 石油中烷烃的降解需要羟化反应, 其通常是整个降解反应的限速步骤^[17]。细胞色素酶 P450 具有烷烃羟化活性, 可通过氧化断裂石油烃类中的短链烷烃和中链烷烃($\text{C}_5\text{--}\text{C}_{16}$), 从而达到降解的效果^[1,18]。此外, 非特异性过氧化物酶^[19]、橡胶氧化酶^[20]和染料脱色过氧化物酶^[21]等氧化酶系在污染物降解领域也具有广泛的应用潜力。

表面活性剂的添加能够促进生物酶法降解有机污染物, 一是可提高污染物的溶解性与分散性, 大大增加其与酶结合的概率; 二是其可与酶相互作用进而提高酶的催化性能^[22]。Bezza 等^[23]的研究发现, 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) CB1 产生的生物表面活性剂明显提高了本土微生物对多环芳烃的降解效果, 降解率达 86.5%, 显著高于对照组(57.0%); 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)通过提高过氧化物酶(peroxidase)的稳定性来强化其对苯酚类污染物的去除效果^[24]。此外, 生物酶经固定化处理可显著提高其催化能力^[25], 固定化材料作为支持结构可维持酶活性中心结构的刚性, 有助于酶在更大范围的 pH 和温度条件下长时间保持催化活性^[26]。固定化方法一般分为包埋、物理吸附、共价结合和交联四大类, 载体材料因固定化方法的不同而有所差异。如海藻酸钠具有良好的生物兼容性、黏附性和缓释性, 常作为生物酶的包埋载体; 经海藻酸钙包埋的木质素

降解酶与石油污染沉积物混合并堆肥处理 70 d, 沉积物中的碳氢化合物降解菌的丰度显著提高^[27], 与游离酶相比, 固定化酶能够持续发挥催化作用将样品中微生物难以利用的组分降解成可利用的物质。

综上所述, 本研究旨在开展以下工作: (1) 选取枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源漆酶(BsLac) PDB 1gsk、微小杆菌(*Exiguobacterium* sp.) AT1b 来源细胞色素酶(EsP450) PDB 5yhj、辐射小应伞(*Marasmius rotula*)来源非特异性过氧化物酶(MrUPO) PDB 5fuj、鱼腥藻(*Anabaena* sp.) PCC 7120 来源染料脱色过氧化物酶(AsDyPs) PDB 5c2I 和链霉菌(*Streptomyces* sp.) K30 来源橡胶氧化酶(SsLcp) PDB 5o115 种目标酶, 将其与石油的典型成分(2-甲基萘^[28]、偏三甲苯^[29]、正十六烷^[30])进行分子对接模拟分析其降解石油的潜力; (2) 将目标酶在相应的表达宿主中异源表达, 并结合降解实验筛选最优石油降解酶; (3) 探究降解体系中表面活性剂与 ABTS 的添加, 以及固定化酶对石油降解的影响。本研究为生物酶法处理石油污染提供理论基础与技术支持。

1 材料与方 法

1.1 样品和试剂

石油样品由中国石化石油勘探开发研究院无锡石油地质研究所惠赠。其中, 饱和烃含量为 81.38%, 芳香烃含量为 9.19%, 胶质含量为 5.63%, 沥青含量为 3.80%。漆酶 BsLac、细胞色素酶 EsP450、非特异性过氧化物酶 MrUPO、染料脱色过氧化物酶 AsDyPs 和橡胶氧化酶 SsLcp 的编码基因均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。槐糖脂购自山东优索化工科技有限公司; 鼠李糖脂购自西安安瑞科生物科技有限公司; 吐温 80、Triton X-100 及其他常用试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 培养基

LB 培养基^[20]用于大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)的活化、感受态制备及种子液培养。TB 培养基用于 *E. coli* BL21(DE3)的发酵培养。YPD、BMMY、BMGY 培养基^[31]用于毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 的活化、感受态制备、种子液培养及发酵培养。

1.3 分子对接模拟

从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取石油中典型成分的结构式(2-甲基萘、偏三甲苯、正十六烷)。BsLac (PDB 1gsk)、EsP450 (PDB 5yhj)、SsLcp (PDB 5o11)、AsDyPs (PDB 5c2I)、MrUPO (PDB 5fuj)等蛋白质晶体结构来自 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)。采用 Autodock 4.2 软件进行分子对接^[22], 并利用 PILP 网站(<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>)分析疏水作用力, 随后用 PyMOL 软件显示酶和底物的结合位置和方向。

1.4 酶的异源表达及摇瓶发酵

根据酶的来源微生物的不同, 将含有 BsLac、AsDyPs、SsLcp 和 EsP450 编码基因的重组质粒(pET20b-BsLac、pET20b-AsDyPs、pET20b-SsLcp 和 pET20b-EsP450)利用化学转化法^[20]转入 *E. coli* BL21(DE3)进行异源表达; 将含有 MrUPO 编码基因的重组质粒(pPIC9K-MrUPO)利用电穿孔法^[31]转入 *P. pastoris* GS115 进行异源表达。*E. coli* BL21(DE3)和 *P. pastoris* GS115 重组菌发酵产酶及后续酶液的获得与定量按 Shi 等^[20]和袁帅等^[31]所述方法进行。

1.5 生物酶降解石油体系构建

将 3 mg 目的蛋白添加至 50 mL pH 7.0 50 mmol/L 含 0.5% (质量体积分数)石油的磷酸盐缓冲液中, 在 30 °C、180 r/min 条件下反应 72 h。每隔 24 h 补加 1 mg 目的蛋白, 共补加 2 次。以未添加酶液为空白对照组, 每组设置

3个平行。除BsLac外,其他酶(EsP450、MrUPO、AsDyPs和SsLcp)需在H₂O₂的参与下才表现出催化活性,因此在其降解过程中,每隔24h补加一次H₂O₂,使其终浓度维持在1mmol/L。反应结束后,采用重量法测定石油降解率。

1.6 表面活性剂对酶降解石油的影响分析

在1.5小节所述降解体系中分别添加终浓度为100、200、500、1000、1200mg/L的表面活性剂吐温80、Triton X-100、鼠李糖脂和槐糖脂。相同的反应条件下,测定石油的降解率以评估表面活性剂对酶降解石油的影响。

1.7 槐糖脂对酶活性影响测定

BsLac的活性测定采用ABTS法。将终浓度为100、200、500、1000、1200mg/L的槐糖脂与BsLac酶液置于30℃水浴锅中孵育2h,以不添加槐糖脂的酶液为对照组,测定其与ABTS反应后在420nm波长处1min内吸光值的变化。具体反应体系:930μL柠檬酸缓冲液(50mmol/L,pH3.0),20μL ABTS(10mmol/L)溶液及50μL待测酶液。其中每mL溶液每分钟催化氧化1μmol ABTS所需要的酶量为1个酶活单位(U/mL)^[10]。酶活计算如公式(1)所示。

$$\text{酶活(U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_1 \times \text{稀释倍数}}{T \times V_2 \times \varepsilon \times d} \quad (1)$$

式中, V_1 为反应总体积, V_2 为酶液体积, ε 为ABTS摩尔消光系数[36000L/(mol·cm)], d 为比色皿光径(0.5cm), T 为反应时间。

1.8 ABTS对酶降解石油的影响分析

在1.5节所述降解体系中分别添加终浓度为0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00mmol/L的ABTS。相同的反应条件下,测定石油的降解率以评估ABTS对酶降解石油的影响。

1.9 固定化对酶降解石油的影响分析

对BsLac分别进行吸附、吸附-交联、包埋^[32]固定化处理。具体流程如下:以天然且廉价易获得的花生壳为吸附材料,将1g花生壳粉末

与40mL酶液混合,置于25℃、150r/min条件下孵育6h。过滤取沉淀并用50mmol/L磷酸盐缓冲液(pH6.0)洗涤2次,于室温下干燥,即获得吸附型固定化酶。将1g花生壳与40mL酶液置于终浓度为2%(体积分数)的戊二醛溶液中,25℃、150r/min条件下处理6h。过滤取沉淀并用50mmol/L磷酸盐缓冲液(pH6.0)洗涤2次,于室温下干燥,即获得吸附-交联型固定化酶。将质量体积分数2%的海藻酸钠溶液与酶液按1:2的体积比混合,滴入质量体积分数3%的CaCl₂溶液中,在4℃条件下硬化2h。过滤后取颗粒并用去离子水洗涤3次,即获得包埋型固定化酶,将其保存在50mmol/L磷酸盐缓冲液(pH6.0)中备用。

1.10 石油降解率测定

采用重量法^[33]测定石油降解率。具体流程如下:将反应完的降解液转移至分液漏斗中,以等体积的石油醚为萃取剂进行振荡萃取,待静置分层后,取上层萃取液(石油醚层),经无水Na₂SO₄去除水分。萃取液转移至硅酸镁柱中净化,用已恒重的称量瓶承接滤液。将滤液置于通风橱挥发后称重。石油降解率计算如公式(2)所示。

$$\text{石油降解率(\%)} = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100 \quad (2)$$

式中, m_0 为对照组石油质量; m_t 为实验组石油质量。

2 结果与分析

2.1 目标酶与石油典型成分的分子对接分析

目标酶与小分子底物的对接结果如图1所示,其中黄色棒状结构为正十六烷,绿色棒状结构为2-甲基萘,橙色棒状结构为偏三甲苯,玫红色棒状结构为催化残基。目标酶活性区域内氨基酸残基均能够与2-甲基萘、偏三甲苯、

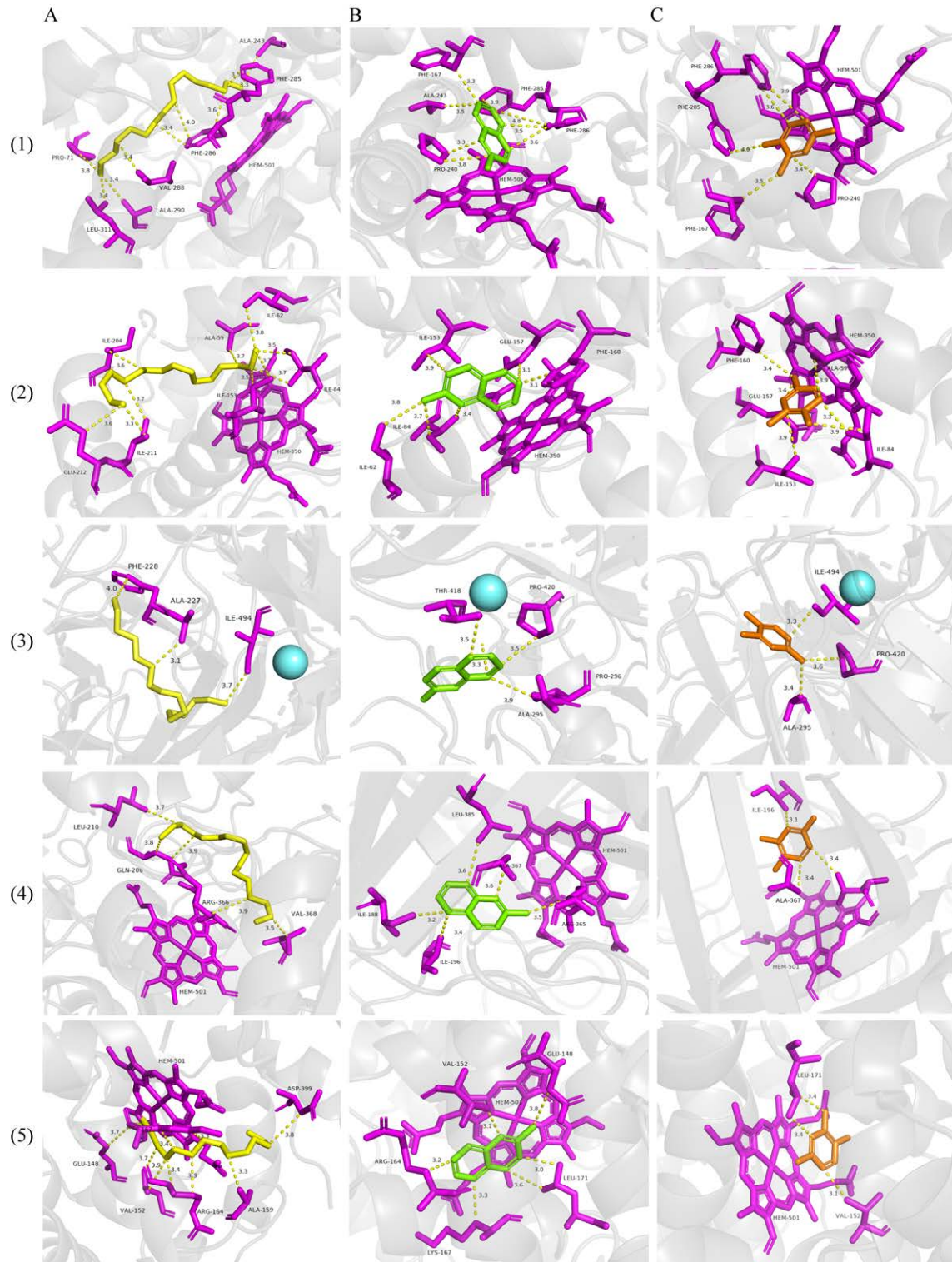


图 1 目标酶与底物的相互作用

Figure 1 Interaction between target enzymes and substrates. A: Molecular docking between n-hexadecane and enzymes. B: Molecular docking between 2-methylnaphthalene and enzymes. C: Molecular docking between 1,2,4-trimethylbenzen and enzymes. (1): EsP450; (2): MrUPO; (3): BsLac; (4): AsDyPs; (5): SsLcp.

正十六烷等石油典型成分相结合,如 BsLac 的 T1 型铜离子($T1Cu^{2+}$, 蓝色小球)周围活性残基通过疏水作用力与底物结合在氧化中心(mononuclear centre, MNC)内。同样地, EsP450、SsLcp、AsDyPs 也通过疏水作用力与底物连接。酶与底物的结合能越小,越有利于酶与底物的结合,越容易降解污染物^[34]。如表 1 所示,目标酶与 2-甲基萘的结合能最小,约-7.76--4.02 kcal/mol,其次是偏三甲苯(-6.86--3.51 kcal/mol)和正十六烷(-5.51--1.68 kcal/mol)。酶与底物的结合能均为负值,说明结合是自发进行的。此外,底物尺寸越大,越难进入酶活性口袋,不利于酶与底物的结合。因此,酶与底物的结合能随底物尺寸的增大而增大。SsLcp 对不同底物的结合能力明显高于其他酶类,为-5.51--7.76 kcal/mol,

其次是 EsP450 (-5.14--6.78 kcal/mol)。上述结果表明所选的目标酶均可以与底物结合,具备降解石油的能力。

2.2 目标酶的异源表达及石油降解作用验证

将按 1.4 所述方法获得的酶液调整至总蛋白浓度为 1 mg/mL 后进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 2A 所示。各泳道内均有明显的条带,并且与理论蛋白分子量大小一致,表明 BsLac、AsDyPs、EsP450、SsLcp 和 MrUPO 均在重组菌中成功异源表达,蛋白浓度分别为 0.44、0.63、1.15、0.47 和 0.24 mg/mL。按 1.5 所述降解体系进行石油降解实验,结果如图 2B 所示。BsLac 对石油的降解率最高,可达 34.1%,其次是 EsP450 (27.2%)、MrUPO (14.9%)。其中, SsLcp

表 1 目标酶与底物的结合自由能

Table 1 Binding energy (kcal/mol) between target enzymes and substrates

Substrates	BsLac	EsP450	SsLcp	AsDyPs	MrUPO
2-methylnaphthalene	-4.02	-6.78	-7.76	-5.33	-6.23
1,2,4-trimethylbenzen	-3.51	-5.83	-6.86	-4.52	-5.36
n-hexadecane	-1.68	-5.14	-5.51	-3.05	-2.69

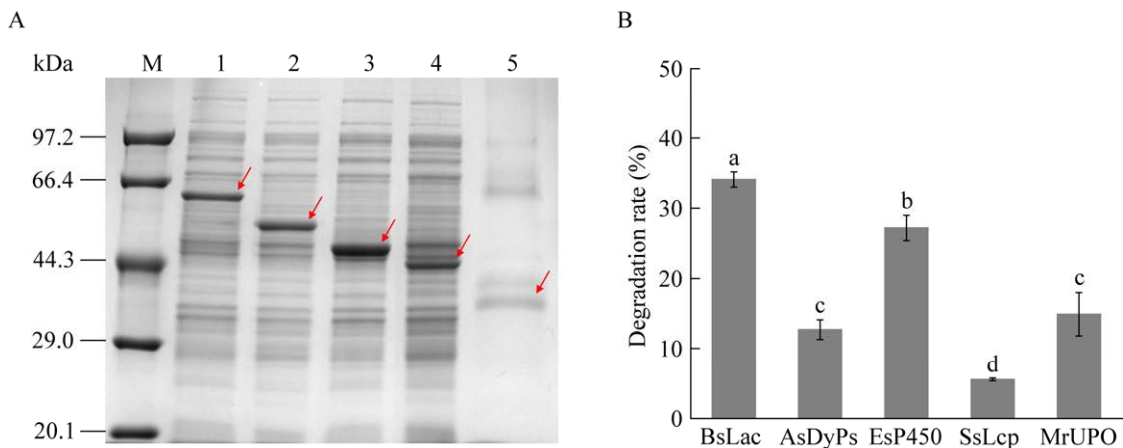


图 2 目标酶的 SDS-PAGE 及石油降解能力分析

Figure 2 SDS-PAGE and petroleum degradation analysis of targeted enzyme. A: SDS-PAGE analysis of targeted enzyme. B: Degradation rate of targeted enzyme on petroleum. 1: BsLac; 2: AsDyPs; 3: EsP450; 4: SsLcp; 5: MrUPO. Each value represents the mean of three independent measurements and bars with different letters on the top are significantly different ($P < 0.05$). The same below.

对石油的降解率仅为 5.5%，无显著降解效果。因此，选取 BsLac 为最优石油降解酶进行后续研究。

2.3 表面活性剂对 BsLac 降解石油的影响分析

石油作为疏水性有机物，其在液体体系中的可溶性是影响 BsLac 催化作用的限制因素之一，因此考虑加入表面活性剂来提高石油的可溶性。如图 3A 所示，当添加化学表面活性剂 Triton X-100 和吐温 80 时，石油降解率随表面活性剂浓度的增加而增加，当终浓度达到 1 000 mg/L 时，BsLac 对石油降解率最高，分别为 43.6% 和 45.9%，当浓度进一步提高至 1 200 mg/L 时，石油降解率不再上升。生物表面活性剂鼠李糖脂和槐糖脂对酶降解石油的影响如图 3B 所示。BsLac 对石油的降解效果随鼠李糖脂浓度升高呈先上升再下降的趋势，当终浓度为 500 mg/L 时，石油降解率最高，为 41.6%。槐糖脂在终浓度为 1 000 mg/L 时，石油降解率最高，为 46.3%，当浓度达到 1 200 mg/L 时，石油降解率显著下降。结果表明，表面活性剂的添加可有效提高石油降解率，其中添加浓度是提高催化效果的关键。随后，探究了槐糖脂对 BsLac 活性的影响，结果如图 3C 所示。当槐糖脂添加浓度为 1 000 mg/L 时，BsLac 的相对酶活最高，为 107.3%。该结果与酶降解石油实验结果基本保持一致。综合考虑，后续均在添加 1 000 mg/L 终浓度槐糖脂的降解体系中进行实验。

2.4 ABTS 对 BsLac 降解石油的影响分析

不同终浓度的 ABTS 对 BsLac 降解石油的影响如图 4 所示。BsLac 降解石油的效果随 ABTS 浓度的增加而提升，当 ABTS 浓度为 0.20 mmol/L 时，BsLac 对石油的降解率最高，达到 52.1%，是对照组(0 mmol/L)的 1.12 倍。当 ABTS 浓度进一步增加时，石油降解率则呈

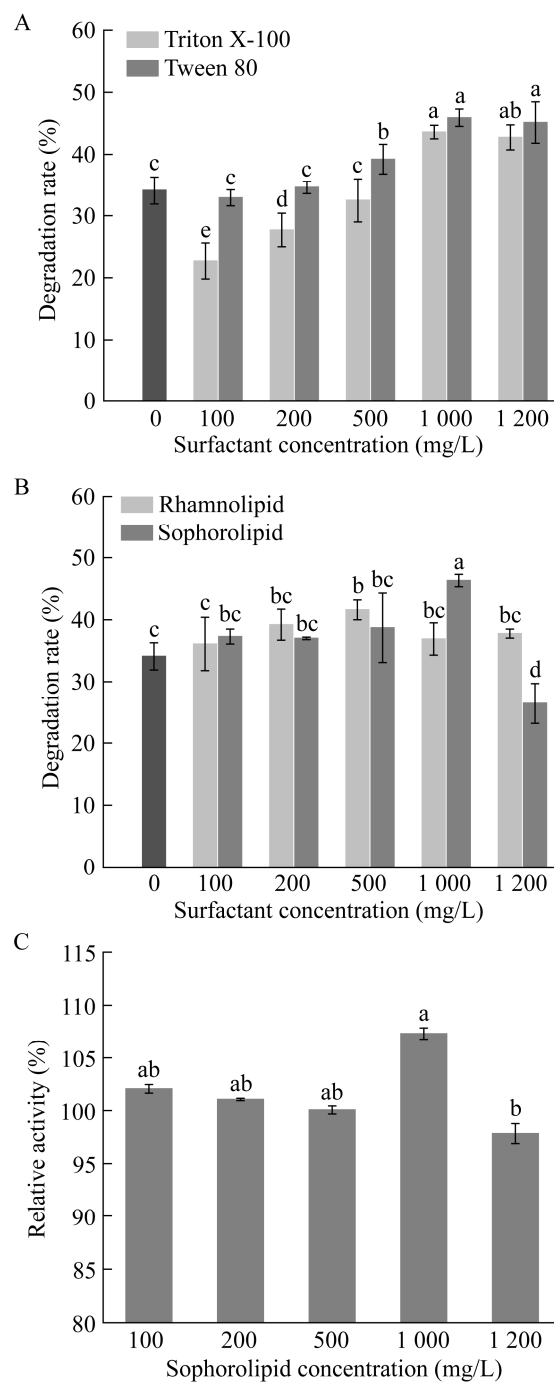


图 3 表面活性剂对 BsLac 降解石油的影响

Figure 3 Effect of surfactant on petroleum degradation by BsLac. A: Effects of Triton X-100 and Tween 80 on petroleum degradation. B: Effects of rhamnolipid and sophorolipid on petroleum degradation. C: Effect of sophorolipid on enzyme activity.

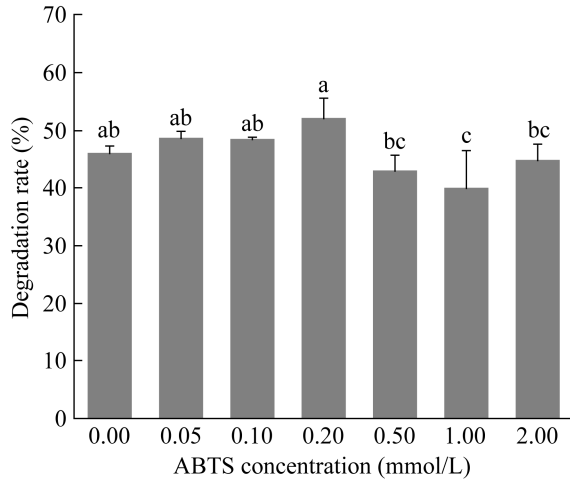


图 4 ABTS 对 BsLac 降解石油的影响

Figure 4 Effect of ABTS on petroleum degradation by BsLac.

现出下降的趋势，表明高浓度 ABTS 可能会抑制石油降解反应的进行。研究表明 ABTS 的添加可使漆酶对四环素类抗生素的清除率由原来的 17.4% 提高到 64.4%^[35]。然而，本研究中 ABTS 的添加对 BsLac 降解石油的影响并不显著，可能是漆酶/ABTS 系统的催化能力取决于所使用的底物的类型^[36]。与其他有机污染物相比，BsLac 的低氧化还原电位不是限制其降解石油的决定性因素。

2.5 固定化对 BsLac 降解石油的影响分析

为进一步提升 BsLac 降解石油的效率，将其分别进行吸附、吸附-交联和包埋固定化处理。如图 5A 所示，固定化工艺的差异显著影响 BsLac 对石油的降解效率。其中，BsLac 经包埋固定化后，对石油的降解能力明显下降，降解率仅为 32.5%。吸附型固定化 BsLac 对石油的降解率显著提升，是游离酶的 1.22 倍，达到 56.3%。吸附型固定化 BsLac 经交联处理后，对石油降解率略有下降，为 51.8%。因此，吸附固定化工艺能够显著提升 BsLac 对石油的降解效果。随后测定了吸附型固定化 BsLac 对不

同浓度石油的降解效率，结果如图 5B 所示。吸附型固定化 BsLac 对石油降解率随着石油浓度的增加而降低，当石油浓度达到 3% 时，石油的降解率仅为 9%。这可能是由于：(1) 受 BsLac 初始浓度的限制；(2) 在高浓度石油条件下，生物酶存在底物抑制效应^[37]。

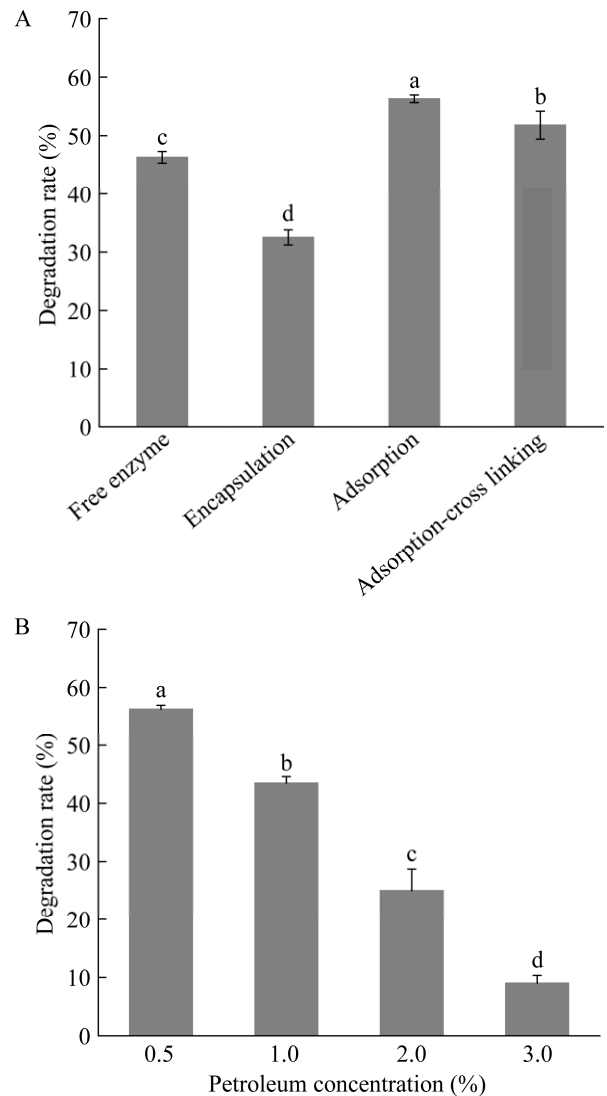


图 5 固定化对 BsLac 降解石油的影响

Figure 5 Degradation effect of immobilized BsLac on petroleum. A: Immobilization effect of BsLac on petroleum degradation. B: Degradation effect of adsorbed bound immobilized BsLac on petroleum at different concentrations.

3 讨论与结论

石油类污染物是环境中常见的有机污染物,目前研究多集中于利用微生物降解其中的石油^[6-7]。然而,许多因素能够影响微生物的降解效率,如微生物在极端环境中的适应力、与环境中土著微生物的竞争能力等。此外,有毒副产物的产生及外源微生物的引入对生态环境的影响也不可忽视^[38]。生物酶法降解是一种绿色且有价值的替代方案,可有效清除石油污染物中的石油且不会产生二次污染,避免外来或转基因生物释放到环境中。

本研究选取的 5 种目标酶与石油典型成分(2-甲基萘、偏三甲苯、正十六烷)间的相互结合均通过疏水作用力实现,这一结果表明疏水作用力可能作为主要作用力方式促进了石油的降解。此外,酶与底物的结合能也表明,底物的大小显著影响其与酶活性中心的结合,从而影响底物的降解。上述目标酶均表现出石油的降解能力,其中, BsLac 对石油的降解效率最为显著,而与底物结合能最高的 SsLcp 对石油的降解效果并不显著。这可能是由于分子对接模拟仅是结构互作分析,提供了受体与底物结合的理论依据,并未考虑到酶自身活力、环境 pH、底物浓度等实际条件,因而计算机模拟结果无法真实反映酶的实际应用效果。

本研究进一步发现表面活性剂的添加可促进 BsLac 对石油的降解。其中, 1 000 mg/L 终浓度的槐糖脂可将石油降解率由 34.1%提升至 46.3%,但 ABTS 的添加却对 BsLac 降解石油无显著促进作用。本研究结果与文献报道^[16,35]相矛盾,这表明 ABTS 对漆酶的作用可能取决于所反应的底物的类型。同时,底物的尺寸、结合方向及结合位点的疏水性也影响着其与酶的结合^[36]。固定化酶的催化性能受到固定化材料与

工艺的影响^[37],其中,经花生壳吸附固定化后, BsLac 对石油的降解率达到 56.3%,远高于其他固定化工艺。包埋和交联固定化工艺不仅易使酶失活,并且传质受限,由于石油高度疏水,其传质受限现象尤为突出。相对而言,吸附固定化工艺操作简单、成本低,在石油降解酶固定化方面具有明显的优越性与竞争力。

本研究通过计算机模拟和实验筛选联用获得具有高效降解石油的 BsLac。随后从表面活性剂、ABTS 和固定化工艺角度优化,进一步提高 BsLac 对石油的降解效率,实现单酶即可高效降解石油的目标,证实酶法降解石油是一种行之有效的策略。本研究为进一步研究石油类污染物的酶法修复提供了实验参考。然而,目前还有许多工作需要进一步完善,如提高酶的催化效率、降低酶的生产成本等。

参考文献

- [1] 刘晓林,崔庆锋,杨正明,魏士平,张群. 石油中长链烷烃微生物降解及分子机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1559-1575.
LIU XL, CUI QF, YANG ZM, WEI SP, ZHANG Q. Microbial degradation and molecular mechanism of medium and long-chain alkanes in petroleum: a review[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1559-1575 (in Chinese).
- [2] VARJANI SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons[J]. Bioresource Technology, 2017, 223: 277-286.
- [3] ALFAIFY AM, AHMAD MIR M, ALRUMMAN SA. *Klebsiella oxytoca*: an efficient pyrene-degrading bacterial strain isolated from petroleum-contaminated soil[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(5): 248.
- [4] HUANG X, WANG J, MA CY, MA LY, QIAO C. Diversity analysis of microbial communities and biodegradation performance of two halotolerant and thermotolerant *Bacillus licheniformis* strains in oilfield-produced wastewater[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2019, 137: 30-41.
- [5] CHEN XQ, GUO ZY, WANG L, YAN ZF, JIN CX, HUANG QS, KONG DM, RAO DM, WU J.

- Directional-path modification strategy enhances PET hydrolase catalysis of plastic degradation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 433: 128816.
- [6] KE CY, CHEN LY, QIN FL, SUN WJ, WANG SC, ZHANG QZ, ZHANG XL. Biotreatment of oil sludge containing hydrocarbons by *Proteus mirabilis* SB[J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 23: 101654.
- [7] ZHANG T, LIU YY, ZHONG S, ZHANG LS. AOPs-based remediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soils: efficiency, influencing factors and environmental impacts[J]. *Chemosphere*, 2020, 246: 125726.
- [8] GANESAN M, MANI R, SAI S, KASIVELU G, AWASTHI MK, RAJAGOPAL R, AZELEE NIW, SELVI PK, CHANG SW, RAVINDRAN B. Bioremediation by oil degrading marine bacteria: an overview of supplements and pathways in key processes[J]. *Chemosphere*, 2022, 303(Pt 1): 134956.
- [9] DAI XL, LV J, WEI WX, GUO SH. Effects of adding laccase to bacterial consortia degrading heavy oil[J]. *Processes*, 2021, 9(11): 2025.
- [10] YAO CY, XIA W, DOU MD, DU YY, WU J. Oxidative degradation of UV-irradiated polyethylene by laccase-mediator system[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 440: 129709.
- [11] EIBES G, MOREIRA MT, FEIJOO G, LEMA JM. Enzymatic degradation of low soluble compounds in monophasic water: solvent reactors. Kinetics and modeling of anthracene degradation by MnP[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 100(4): 619-626.
- [12] ZHANG Y, LIN DF, HAO J, ZHAO ZH, ZHANG YJ. The crucial role of bacterial laccases in the bioremediation of petroleum hydrocarbons[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(8): 116.
- [13] JANUSZ G, PAWLIK A, ŚWIDERSKA-BUREK U, POLAK J, SULEJ J, JAROSZ-WILKOŁAZKA A, PASZCZYŃSKI A. Laccase properties, physiological functions, and evolution[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(3): 966.
- [14] QIU X, WANG SS, MIAO SS, SUO HB, XU HJ, HU Y. Co-immobilization of laccase and ABTS onto amino-functionalized ionic liquid-modified magnetic chitosan nanoparticles for pollutants removal[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401: 123353.
- [15] HUANG YX, LIN JB, ZOU J, XU JX, WANG MY, CAI HH, YUAN BL, MA J. ABTS as an electron shuttle to accelerate the degradation of diclofenac with horseradish peroxidase-catalyzed hydrogen peroxide oxidation[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 798: 149276.
- [16] 张司雨, 董仕鹏, 高士祥, 卢坤. 漆酶/ABTS 介体系统催化氧化羟基化多溴联苯醚[J]. *环境化学*, 2022, 41(12): 3855-3865.
- ZHANG SY, DONG SP, GAO SX, LU K. Transformation of hydroxylation polybrominateddiphenyl ethers in laccase-ABTS system[J]. *Environmental Chemistry*, 2022, 41(12): 3855-3865 (in Chinese).
- [17] LIU J, ZHAO B, LAN YZ, MA T. Enhanced degradation of different crude oils by defined engineered consortia of *Acinetobacter venetianus* RAG-1 mutants based on their alkane metabolism[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 327: 124787.
- [18] PARTHIPAN P, PREETHAM E, MACHUCA LL, RAHMAN PKSM, MURUGAN K, RAJASEKAR A. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 193.
- [19] OLMEDO A, del RÍO JC, KIEBIST J, ULLRICH R, HOFRICHTER M, SCHEIBNER K, MARTÍNEZ AT, GUTIÉRREZ A. Fatty acid chain shortening by a fungal peroxygenase[J]. *Chemistry*, 2017, 23(67): 16985-16989.
- [20] SHI M, KONG DM, ZHANG H, RAO DM, ZHAO TL, YANG J, LIU ZZ, CHEN S, ZHANG FS, WU J, WANG L. Enhancing the heterologous expression of latex clearing protein from *Streptomyces* sp. strain K30 in *Escherichia coli* through fermentation condition optimization and molecular modification[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 254(Pt 3): 127995.
- [21] KADRI T, ROUISSI T, KAUR BRAR S, CLEDON M, SARMA S, VERMA M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: a review[J]. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 2017, 51: 52-74.
- [22] ZHANG Y, ZENG ZT, ZENG GM, LIU XM, LIU ZF, CHEN M, LIU LF, LI JB, XIE GX. Effect of Triton X-100 on the removal of aqueous phenol by laccase analyzed with a combined approach of experiments and molecular docking[J]. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2012, 97: 7-12.
- [23] BEZZA FA, CHIRWA EM. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic

- hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 635-644.
- [24] QUINTANILLA-GUERRERO F, DUARTE-VÁZQUEZ MA, GARCÍA-ALMENDAREZ BE, TINOCO R, VAZQUEZ-DUHALT R, REGALADO C. Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(18): 8605-8611.
- [25] ZDARTA J, JESIONOWSKI T, PINELO M, MEYER AS, IQBAL HMN, BILAL M, NGUYEN LN, NGHIEM LD. Free and immobilized biocatalysts for removing micropollutants from water and wastewater: recent progress and challenges[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344(Pt B): 126201.
- [26] 张璟灏, 高兵兵, 何冰芳. 生物催化中的酶固定化研究进展[J]. *生物加工过程*, 2022, 20(1): 9-19, 40. ZHANG JX, GAO BB, HE BF. Research progress of enzyme immobilized in biocatalysis[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2022, 20(1): 9-19, 40 (in Chinese).
- [27] KUCHARZYK KH, BENOTTI M, DARLINGTON R, LALGUDI R. Enhanced biodegradation of sediment-bound heavily weathered crude oil with ligninolytic enzymes encapsulated in calcium-alginate beads[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 357: 498-505.
- [28] MECKENSTOCK RU, SAFINOWSKI M, GRIEBLER C. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 49(1): 27-36.
- [29] 袁国民, 从海峰, 李鑫钢. 重芳烃轻质化与分离研究进展[J]. *化学工业与工程*, 2022, 39(3): 60-72. YUAN GM, CONG HF, LI XG. Research progress in conversion to light aromatics and separation of heavy aromatics[J]. *Chemical Industry and Engineering*, 2022, 39(3): 60-72 (in Chinese).
- [30] 王崇, 王亭, 黄素秀, 李昕卉. 贝莱斯芽孢杆菌 12-5B 的石油烃降解特性研究[J]. *绿色科技*, 2023, 25(12): 194-198. WANG D, WANG T, HUANG SX, LI XH. Study on petroleum hydrocarbon degradation characteristics of *B. velezensis* 12-5B[J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2023, 25(12): 194-198 (in Chinese).
- [31] 袁帅, 陈晓倩, 吴敬, 宿玲恰, 颜正飞. *Aspergillus oryzae* RIB40 氨肽酶(AoAPase)异源表达及在鳕鱼肽脱苦中的应用[J]. *微生物学报*, 2022, 62(12): 4943-4952. YUAN S, CHEN XQ, WU J, SU LQ, YAN ZF. Heterologous expression of aminopeptidase (AoAPase) from *Aspergillus oryzae* RIB40 and the application in debittering cod peptides[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4943-4952 (in Chinese).
- [32] DAÂSSI D, RODRÍGUEZ-COUTO S, NASRI M, MECHICHI T. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioliopsis gallica* into Ca-alginate beads[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 90: 71-78.
- [33] REHMAN R, ALI MI, ALI N, BADSHAH M, IQBAL M, JAMAL A, HUANG ZX. Crude oil biodegradation potential of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Meyerozyma* sp.[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 418: 126276.
- [34] LIU HY, ZHANG ZX, XIE SW, XING H, ZHU YN, LI HY, YI ZS. Study on transformation and degradation of bisphenol A by *Trametes versicolor* laccase and simulation of molecular docking[J]. *Chemosphere*, 2019, 224: 743-750.
- [35] WANG XT, MENG FP, ZHANG B, XIA YF. Elimination of tetracyclines in seawater by laccase-mediator system[J]. *Chemosphere*, 2023, 333: 138916.
- [36] SAHA R, MUKHOPADHYAY M. Time-dependent electrochemical characteristics of a phenolic and non-phenolic compound in the presence of laccase/ABTS system[J]. *PLoS One*, 2022, 17(9): e0275338.
- [37] YAASHIKAA PR, DEVI MK, KUMAR PS. Advances in the application of immobilized enzyme for the remediation of hazardous pollutant: a review[J]. *Chemosphere*, 2022, 299: 134390.
- [38] PEIXOTO RS, VERMELHO AB, ROSADO AS. Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects[J]. *Enzyme Research*, 2011, 2011: 475193.