

DOI: 10.12264/JFSC2025-0085

南极磷虾胰蛋白酶基因克隆、异源表达及其降解塑化剂研究

邹华英¹, 谭佳豪¹, 王芳^{2*}, 宋佳³, 陈梦瑶¹, 徐甲坤^{2*}

1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部极地渔业可持续利用重点实验室, 山东 青岛 266071;

3. 青岛科技大学生物工程学院, 山东 青岛 266061

摘要: 本研究旨在从南极磷虾中筛选克隆获得胰白蛋白酶基因(*EsTRY*), 构建重组表达载体 *EsTRY*-pCold-SUMO, 在大肠杆菌中实现高效异源表达, 研究该酶对邻苯二甲酸酯类化合物(PAEs)的降解活性。南极磷虾胰蛋白酶(*EsTRY*)的基因长 1350 bp, 编码 449 个氨基酸, 理论分子量(MW)为 47040.35 Da, 理论等电点(pI)为 4.90。结构分析表明, *EsTRY* 含有典型的催化三联体(Asp/Glu-Ser-His)及一个底物特异性结合位点, 属于丝氨酸蛋白酶家族。*EsTRY* 的酯酶活性达到 18973 U/mL, 比酶活为 5802.15 U/mg。最适反应温度为 25 °C, 最适 pH 为 7.0。酶催化降解实验表明, *EsTRY* 对 PAEs 有较强的降解能力, 15 min 内分别降解 13.2%、34.4%、63.5%、48.9%的 1 mmol/L DMP、DEP、DPRP、DBP; 5 h 内降解率分别达到 39.4%、62.7%、86.8%、98.7%。本研究发现 *EsTRY* 对 PAEs 具有降解活性, 为塑化剂污染的生物治理提供了新的潜在工具, 同时也为南极磷虾的高效利用与高值开发提供了科学依据。

关键词: 南极磷虾; 胰蛋白酶; 异源表达; PAEs; 降解; 塑化剂

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2025)06-0729-13

南极磷虾(*Euphausia superba*)是南极海洋生态系统中的关键基石物种, 其生物量估计为 3 亿~5 亿吨, 是地球上数量最庞大的动物种群之一。南极磷虾广泛参与南极海洋生态系统的物质与能量流动, 并在全球生物地球化学循环中发挥着重要作用^[1]。南极海域独特的环境条件塑造了南极磷虾酶高活性和耐低温的特性^[2]。南极磷虾酶资源的开发利用是突破传统低效利用模式的关键, 已在食品、医药、洗涤等诸多领域展现出广阔的应用前景。目前针对南极磷虾来源酶的开发利用仍处于初级阶段, 已有研究主要集中于蛋白酶^[3-7]、羧肽酶^[8]、谷氨酰胺转氨酶^[9]、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶^[10]、几丁质去乙酰化酶^[11]等, 这些酶在低温条件下表现出较高的催化活性, 为探索极端环境下的生物催化机制提供了新思路与研究方向。

胰蛋白酶(trypsin, EC 3.4.21.4)是一种丝氨酸蛋白酶, 能够特异性水解精氨酸(Arg)和赖氨酸(Lys)的羧基末端肽键, 并参与酶原激活的级联反应^[12-14]。胰蛋白酶不仅能够催化肽键水解, 还能水解上述碱性氨基酸羧基末端形成的酰胺键和酯键, 其对不同化学键的水解效率由高到低依次为酯键、酰胺键、肽键, 因此通常采用酰胺酶活性和酯酶活性两种方法来评估胰蛋白酶的酶活性(图 1、图 2)^[15]。胰蛋白酶的催化活性中心依赖于其活性中心的催化三联体(His、Asp、Ser), 其中 Asp 残基通过静电作用决定底物特异性, 胰蛋白酶通过共价催化(酰基-酶中间体的形成)、过渡态稳定及酸碱催化(His 质子转移)实现高效、特异性的肽键水解^[16]。

胰蛋白酶已在多个领域展现了广泛的应用潜

收稿日期: 2025-03-28; 修订日期: 2025-04-11.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC2807500).

作者简介: 邹华英(2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向为酶催化. E-mail: 15865788376@163.com

通信作者: 徐甲坤, 研究员, 研究方向为生物催化与转化. E-mail: xujk@ysfri.ac.cn; 王芳, 副研究员, 研究方向为海洋生物学. E-mail: wangfang@ysfri.ac.cn

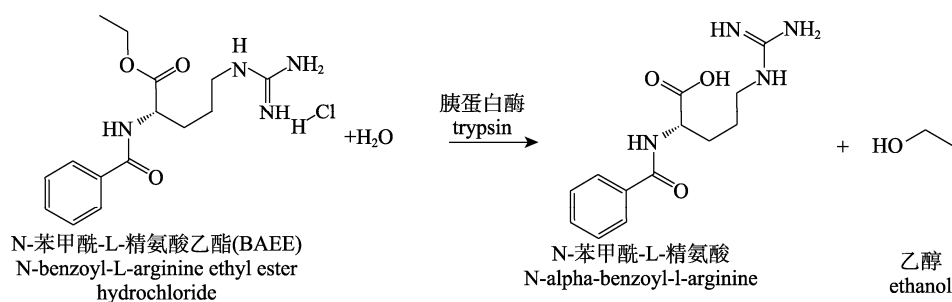


图 1 南极磷虾胰蛋白酶(EsTRY)酯酶活测定原理

Fig. 1 Principle of esterase activity assay for EsTRY

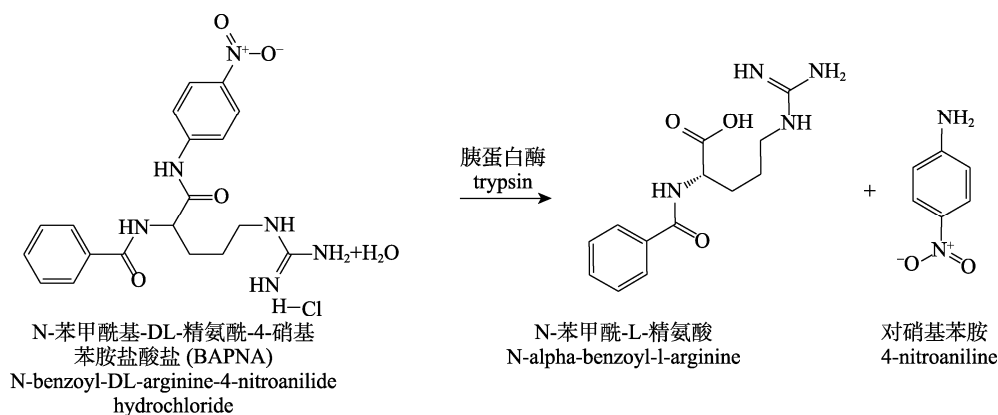


图 2 南极磷虾胰蛋白酶(EsTRY)酰胺酶活测定原理

Fig. 2 Principle of amidase activity assay for EsTRY

力, 如食品加工(如蛋白质水解和脂质提取^[17-21])、医药研发(如胰岛素的生产^[22-23]、抗冻肽制备^[24-25]和伤口愈合^[26-28])以及环境技术(如生物修复^[29-30])等。Chi 等^[31]研究表明邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs)对胰蛋白酶具有荧光猝灭作用, PAEs 与胰蛋白酶主要通过疏水相互作用形成胰蛋白酶-PAEs 复合物。胰蛋白酶可以水解羧基形成的酯键, 具有降解 PAEs 的潜能。探究南极磷虾来源的胰蛋白酶对 PAEs 的降解能力, 可为海洋、土壤等环境中塑化剂的生物修复提供新策略。

塑化剂主要用于高分子量聚合物材料, 以增强其可塑性和柔韧性, 因此广泛应用于个人护理产品、化妆品、卫生产品、塑料薄膜、染料、黏合剂、包装材料、医疗设备、建筑材料等多个领域^[32]。其中, 邻苯二甲酸酯类(phthalic acid esters, PAEs)是应用最为广泛的增塑剂, 约占全球塑化剂总产量的 80%^[33]。由于塑化剂在环境中难以自然分解, 并易通过生物链累积, 其在生态系统和人体健康方面的潜在风险已引起广泛关注。研究

表明, PAEs 污染物已在人类社区的 40 种不同的人类生活环境介质(空气、污泥、食物和饮用水)中被检测到, 其中在地表水中的残留浓度高达 500 mg/L^[34]。在现有的降解方法中, 生物降解因其高效、安全、清洁和环保的特点被认为是一种理想的解决方案^[35]。相比传统的微生物降解方法(通常受限于环境适应性和降解率低等因素), 酶降解方法因技术的不断改进(如异源表达系统的创建)而展现出显著的优势。本研究基于南极磷虾基因组和蛋白转录组生物信息学分析, 筛选并鉴定了一种南极磷虾胰蛋白酶基因(*EsTRY*), 并在大肠杆菌 BL21 中实现了可溶性活性表达, 进一步探究其酶学性质和对酯键类塑化剂的降解能力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所使用的南极磷虾于 2022 年 10 月在南极海域捕捞, 采用 -80 °C 超低温冷冻贮存。

1.2 试剂和化学品

限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、2×Taq Mix DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶均购自宝日医生物技术(北京)有限公司。*N*-α-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐购自上海麦克林生化科技股份有限公司。*N*-α-苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。邻苯二甲酸二甲酯(DMP)和邻苯二甲酸二丙酯(DPRP)均购自上海源叶生物科技有限公司。邻苯二甲酸二乙酯(DEP)和邻苯二甲酸二丁酯(DBP)均购自国药集团化学试剂有限公司。动物组织总 RNA 提取试剂盒购自成都福际生物技术有限公司。FastKing cDNA 第一链合成试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。质粒快速提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自 Omega Bio-Tek 公司。所有其他化学品均为分析级。

1.3 仪器

ZQZY-C8V 恒温震荡培养箱(知楚仪器有限公司)、SHP-250 生化恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司)、071-851 定性梯度 PCR 仪(德国 Biometra 公司)、GS-680J 凝胶成像分析仪(上海培青科技有限公司)、G154DS 高压蒸汽灭菌锅(厦门致微仪器有限公司)、CR21G III 大型高速离心机(日本 Hitachi 株式会社日立制作所)、VCF-1500 超声破碎仪(Sonics 索尼克斯公司)、CHB-100 恒温金属浴(杭州博日科技有限公司)、ORION Model 818 pH 计(美国奥立龙公司)、UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司)、LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

1.4 胰蛋白酶基因 DNA 的克隆与重组载体构建

1.4.1 南极磷虾 RNA 提取 采用 FOREGENE 动物组织总 RNA 提取试剂盒, 按照其操作手册的标准步骤提取南极磷虾的总 RNA。

1.4.2 南极磷虾 cDNA 合成 根据天根 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒的步骤合成南极磷虾 cDNA。

1.4.3 *EsTRY* 基因克隆 以南极磷虾总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA, 并进行转录组测序。根据测序结果拼接胰蛋白酶的基因序列, 并在 NCBI 库进行序列比对, 获得南极磷虾 *EsTRY* 的

完整基因序列。以南极磷虾 cDNA 为模板, 依据转录组测序数据分别设计正向引物(5'-GATCCCATCATCACCATCATCA-3')和反向引物(5'-AGCTTTTAATGGTGATGATGATGG-3'), 进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 通过凝胶成像系统观察目标条带。从琼脂糖凝胶中切下单一 DNA 条带并进行 DNA 胶回收, 随后对回收产物进行基因序列验证。

1.4.4 *EsTRY* 重组载体构建 选择 pCold-SUMO 为表达载体, 根据大肠杆菌的密码子偏好性对目的基因进行密码子优化。随后构建质粒图谱, 并在 *Bam*H I 和 *Hind* III 限制性内切酶位点之间插入目的基因片段, 得到命名为 *EsTRY*-pCold-SUMO 的重组质粒。

1.5 重组载体的表达

1.5.1 质粒提取 从合成的重组菌中提取 *EsTRY*-pCold-SUMO 质粒, 对其进行验证和表达。质粒提取按照 Omega 快速质粒提取试剂盒的说明进行操作。

1.5.2 转化表达 将提取的质粒进行序列测定, 并通过琼脂糖凝胶电泳验证其构建正确性。采用热休克法将确认后的质粒转化入大肠杆菌感受态细胞 RTS BL21 (DE3) *chaprone* 中。将携带重组质粒 *EsTRY*-pCold-SUMO 的转化子接种于含有 100 μg/mL 氨苄霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 °C、200 r/min 条件下培养, 直到菌体密度 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8。随后加入 0.55 mol/L IPTG, 在 15 °C 诱导表达 24 h。

1.6 胰蛋白酶粗酶液的制备

收集诱导表达的大肠杆菌, 在 8000 r/min、4 °C 离心 20 min 后回收菌体, 使用 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0) 洗涤 3 次并重悬。超声裂解 20 min, 破碎后的菌液于 4 °C、10000 r/min 离心 90 min, 去除沉淀, 收集上清液。所得上清经 0.22 μm 滤膜过滤后即粗酶液。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析蛋白质的分子质量。蛋白浓度采用 Bradford 法测定。

1.7 胰蛋白酶酶活测定

重组胰蛋白酶的酯酶活性检测^[36]如下: 将 100 μL 样品溶液与 900 μL 底物溶液[67 mmol/L,

pH 7.6 磷酸钠缓冲液, 含 0.25 mmol/L N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯(N-Benzoyl-L-Arginine-Ethylester, BAEE)]在 25 °C 下混合在石英试管中。反应 5 min 后, 用分光光度法监测 253 nm 处的吸光度变化。一个酯酶活性单位(U)定义为每分钟使 A₂₅₃ 增加 0.001 的酶量。

重组胰蛋白酶的酰胺酶活性测定^[36]如下: 将 100 μ L 样品溶液与 800 μ L 检测缓冲液[50 mmol/L, pH 8.0 Tris-HCl 和 100 μ L 10 mmol/L N-苯甲酰基-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐(N-benzoyl-DL-arginine-4-nitroanilide hydrochloride BAPNA)溶于二甲基亚砜(DMSO)]。在 40 °C 反应 5 min, 用分光光度法监测在 410 nm 处的吸光度变化, 以空载体表达的粗酶液作为对照。一个酰胺酶活性单位(U)定义为每分钟使 A₄₁₀ 增加 0.1 的酶量。

1.8 生化特性

为了检测温度对 EsTRY 活性的影响, 将底物溶液在 15~40 °C 温度范围下预孵育 5 min, 随后加入酶液启动反应。每个温度设定 3 个平行实验, 测定相对酶活, 以 25 °C 所测的最大酶活设为 100%进行相对酶活计算。为评估 pH 对 EsTRY 活性的影响, 在 25 °C 下, 分别于 pH 4.0~11.0 的缓冲液中检测酶反应 5 min。每个 pH 条件做 3 个平行实验, 测定相对酶活, 并以 pH 为 7.0 条件下的最大酶活设为 100%计算相对酶活。

1.9 EsTRY 降解 PAEs

1.9.1 底物浓度影响 分别配置浓度为 100 mmol/L 的 4 种邻苯二甲酸酯(PAEs)溶液, 包括邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丙酯(DPRP)和邻苯二甲酸二丁酯(DBP)。在 1 mL 反应体系中分别添加终浓度为 1 mmol/L 和 2 mmol/L 的目标底物, 在 45 °C、pH 9.0 条件下反应 5 h, 每隔 1 h 取样一次, 采用高效液相色谱(HPLC)检测 PAEs 的浓度变化。每种底物设置 3 个平行实验, 并以空载体表达的酶液作为对照组, 测定各底物的降解率。

1.9.2 温度对降解率的影响 将终浓度为 1 mmol/L 的 DMP、DEP、DPRP、DBP 分别在 25 °C、35 °C、45 °C, pH 9.0 条件下反应 5 h, 每隔 1 h 取样检测 PAEs 浓度。每组底物设置 3 个平行实验, 并以空

载体酶液作为对照组, 测定降解率。

1.10 液相检测

通过 HPLC 检测 DMP、DEP、DPRP 和 DBP 在反应体系中的残余量。色谱柱使用 Thermo-C18 (150×4.6 mm), 紫外检测波长为 254 nm, 柱温为 30 °C, 进样体积为 10 μ L。流动相为乙腈和纯水。DMP 和 DEP 的洗脱条件为: 40%乙腈, 流速 1 mL/min; DPRP 和 DBP 的洗脱条件为: 60%乙腈, 流速 1 mL/min。

2 结果与分析

2.1 胰蛋白酶基因的克隆和生物信息学分析

以南极磷虾 cDNA 为模板, 成功克隆并验证了 *EsTRY* 基因。经琼脂糖凝胶电泳验证(图 3), 在 1400 bp 左右检测到明显条带, 与预测片段大小相符。*EsTRY* 全长 1350 bp, 编码 449 个氨基酸, 分子量为 47040.35 Da, 理论等电点为 4.90。449 个氨基酸包括 38 个带正电荷残基(Asp+Glu), 28 个带负电荷残基(Arg+Lys)。生物信息学分析显示, 不稳定指数(II)为 34.14 (<40), 表明 EsTRY 是稳定蛋白。脂肪族指数为 66.97, 表明其可溶于脂类。ProtScale 蛋白质疏水分析表明, EsTRY 亲水性残基多于疏水残基, 总平均亲水性为 -0.112, 因此推测 EsTRY 具有较强的亲水性。糖基化分析显示, EsTRY 具有 17 个 O-糖基化位点, 分别位于

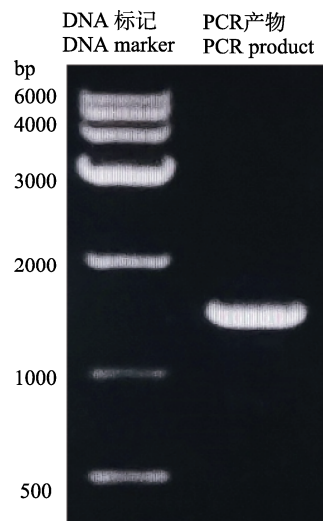


图 3 PCR 扩增条带

Fig. 3 PCR amplification bands

59、104、159、161、162、164、165、170、171、176、177、182、183、188、189、194、440 位, 但无 N-糖基化位点。利用 NCBI Blast 比对发现, EsTRY 与挪威明虾来源的胰蛋白酶相似性最高(72.69%), 其次依次为美洲螯虾来源的胰蛋白酶(54.75%)、印度对虾来源的胰蛋白酶(51.02%)、斑节对虾来源的胰蛋白酶(50.00%)和南美白对虾来源的胰蛋白酶(49.21%) (图 4)。SOPMA 预测蛋白

二级结构表明, EsTRY 包含 7.57%的 α -螺旋和 21.60%的 β -折叠以及 70.82%的无规卷曲。CD-Search 蛋白结构预测表明, EsTRY 具有丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸组成的催化三联体。组氨酸残基作为酸碱催化剂, 通过其咪唑环进行质子转移, 使活性中心的丝氨酸残基的羟基氧原子质子化, 从而增强其亲核性。根据蛋白家族分类标准, EsTRY 属于丝氨酸蛋白酶家族 (图 5)。

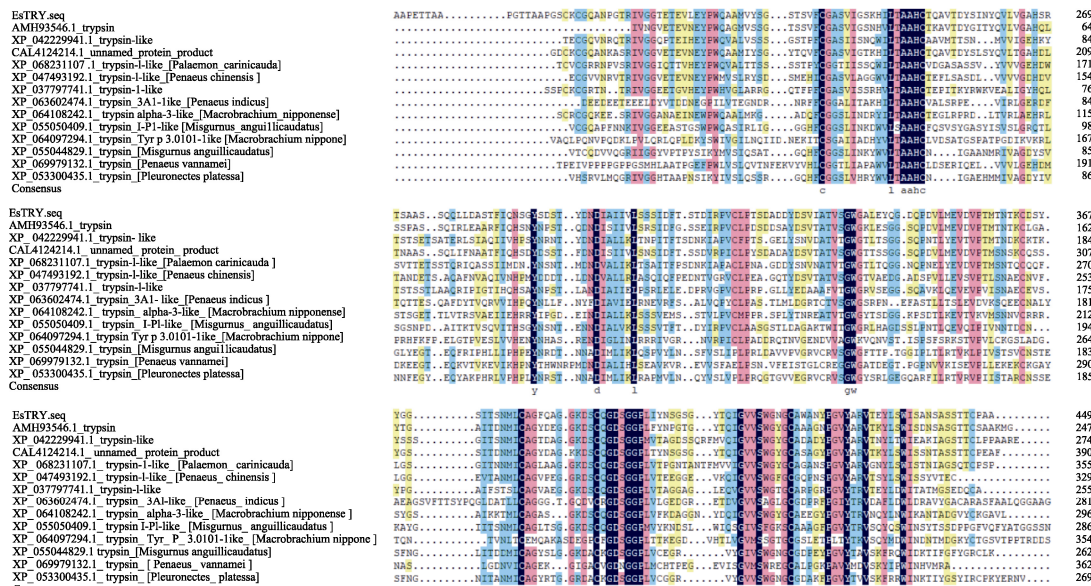


图 4 南极磷虾胰蛋白酶(EsTRY)与其他物种的氨基酸序列对比

Fig. 4 Amino acid sequences of *Euphausia superba* tryptic albuminase (EsTRY) compared with other species

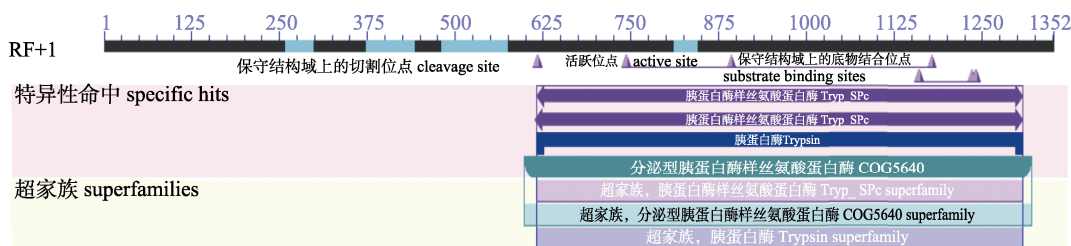


图 5 南极磷虾胰蛋白酶(EsTRY)保守结构域分析

Fig. 5 Conserved domain analysis of *Euphausia superba* tryptic albuminase (EsTRY)

2.2 重组表达载体构建表达

通过密码子优化平台对 *EsTRY* 基因序列进行适应性改造, 将宿主大肠杆菌低频密码子置换为优势密码子。采用分子克隆技术构建重组表达系统, 将 *EsTRY* 基因与 pCold-SUMO 原核表达载体进行重组, 构建大肠杆菌特异性表达载体 EsTRY-pCold-SUMO。随后, 将 EsTRY-pCold-SUMO 重组

质粒转化至大肠杆菌 RTS BL21 (DE3) Chaprone。采用 pCold-SUMO 载体配套引物进行菌落 PCR 鉴定, 结果显示载体引物序列扩增的长度为 294 bp, 插入目的基因片段为 1410 bp, 两者合计 1704 bp。经凝胶电泳确认目标条带大小与理论值一致(图 6), 最终获得重组工程菌 EsTRY-pCold-SUMO-RTS BL21。

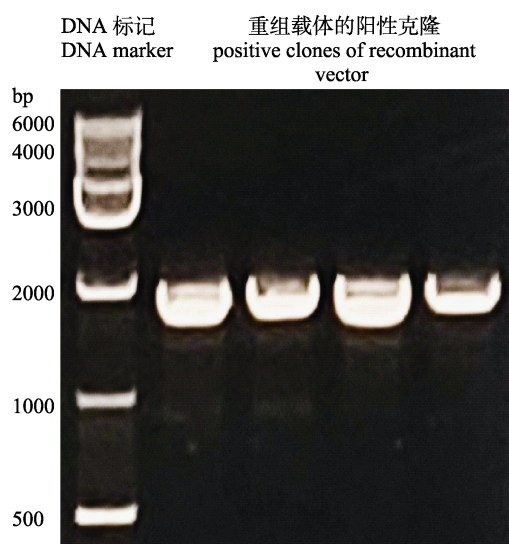


图 6 琼脂糖凝胶验证重组表达结果
Fig. 6 Validation of recombinant expression results on agarose gels

将 EsTRY-pCold-SUMO-RTS BL21 工程菌扩大培养, 在 15 °C 低温条件下诱导培养 24 h, 获得粗酶液。通过 SDS-PAGE 对蛋白进行检测。结果显示, EsTRY 的理论分子量为 60.62 kDa, 电泳图显示在 60 kDa 附近存在特异性条带, 其迁移距离与预测值一致(图 7), 表明成功实现了 EsTRY 蛋白的可溶性表达。

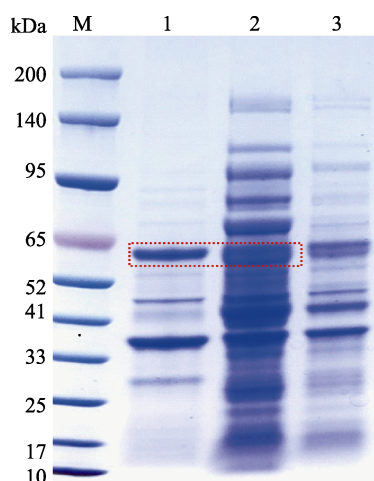


图 7 诱导后南极磷虾胰蛋白酶(EsTRY)的 SDS-PAGE 蛋白电泳图

M: 蛋白 marker; 泳道 1: EsTRY 裂解后沉淀; 泳道 2: EsTRY 裂解后上清; 泳道 3: pCold-SUMO 空载体裂解后上清。

Fig. 7 SDS-PAGE protein electrophoresis of *Euphausia superba* tryptic albuminase (EsTR) after induction
M: protein marker; lane 1: precipitation after EsTRY lysis; lane 2: supernatant after EsTRY lysis; lane 3: supernatant after pCold-SUMO empty vector lysis.

2.3 EsTRY 酶活测定

重组酶 EsTRY 的酯酶活性为 18973 U/mL, 比酶活性为 5802.15 U/mg; 酰胺酶活性为 120.5 U/mL, 比酶活性为 36.85 U/mg。与其他来源的胰蛋白酶相比, 南极磷虾来源 EsTRY 酶活性处于中等偏上水平。例如, 链霉菌胰蛋白酶 GM2938 的酯酶活性为 1622.2 U/mL, 酰胺酶活性为 33.8 U/mL^[36]; 灰色链霉菌胰蛋白酶(SGT)的酰胺酶活性为 (177.85±2.83) U/mL^[37], 而南极磷虾来源胰蛋白酶 EsTrypsin-1 酰胺酶活为 0.101 U/mL^[38]。人源胰蛋白酶的酯酶酶活为 400 U/mL^[39]。重组表达于毕赤酵母 GS115 的弗氏链霉菌胰蛋白酶酰胺水解比活性为 39.39 U/mg^[40]。南极磷虾来源冷适应胰蛋白酶 OUC Pp 20 酯酶活性为 (21.46±3.02) U/mg, 酰胺酶酶活为 (2.40±0.35) U/mg^[41]。

2.4 EsTRY 基础酶学性质研究

在 15~40 °C 的温度范围内, 测定温度对 EsTRY 酶活性的影响。结果表明, 在 15~25 °C 区间内, EsTRY 的催化效率随温度升高呈现逐渐增强, 并在 25 °C 时达到最优。当温度超过 25 °C 后, 酶活随温度上升显著降低(图 8a)。与其他来源的胰蛋白酶相比, EsTRY 的最适温度明显偏低。例如, 人源胰蛋白酶最适温度为 20 °C, 牛源胰蛋白酶最适温度为 35 °C, 虾源胰蛋白酶最适温度为 40 °C, 弗氏链霉菌源胰蛋白酶和日本鳀源胰蛋白酶的最适温度均为 45 °C^[40-41]; 虹鳟、鲮和远东拟沙丁鱼胰蛋白酶的最适温度分别为 60 °C、55 °C 和 50 °C^[3]; Xin 等^[3]在南极磷虾基因组中克隆了一种低温胰蛋白酶 OUC-Pp-20, 并在毕赤酵母中表达, 最适反应温度为 25 °C。EsTRY 的最适温度较常见胰蛋白酶低, 显示其在低温环境中具有较高活性, 表明其为一类典型的低温适应型胰蛋白酶, 具有良好的冷适应特性。

在最适温度 25 °C 下, 研究 pH (4.0~11.0) 对 EsTRY 酶活性的影响。结果显示, EsTRY 的催化效能具有明显的 pH 依赖性。在中性条件(pH=7.0)时, 该酶的活性达到最高。然而在碱性条件(pH=7.0~11.0)下, 随 pH 升高, 其生物催化能力呈现显著减弱趋势(图 8b), 推测与酶蛋白构象的稳定性变化密切相关。例如, 人源胰蛋白酶最适 pH

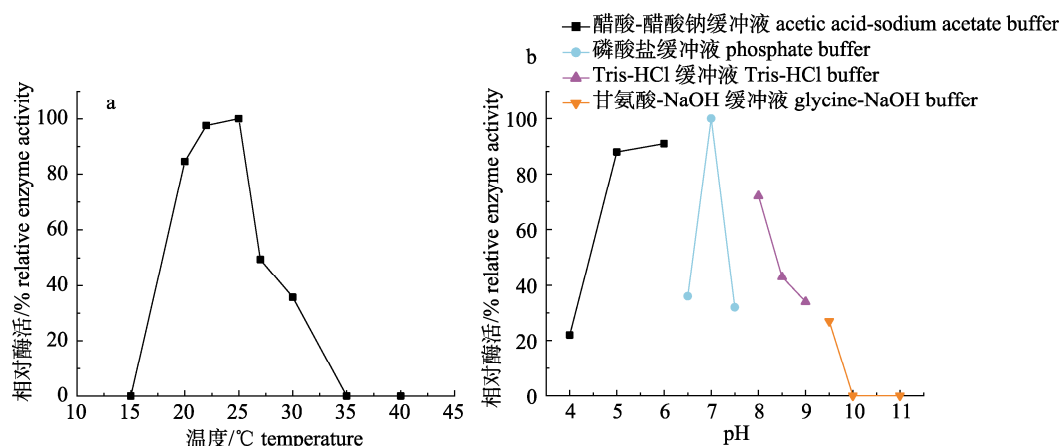


图 8 南极磷虾胰蛋白酶(EsTRY)最适反应温度和 pH

a. 最适反应温度; b. 最适反应 pH.

Fig. 8 Optimum reaction temperature and pH of *Euphausia superba* tryptic albuminase (EsTRY)

a. Optimum reaction temperature; b. Optimum reaction pH.

为 9, 牛源胰蛋白酶最适 pH 为 8.5, 虾源胰蛋白酶最适 pH 为 8.5, 弗氏链霉菌源胰蛋白酶最适 pH 为 9^[40], 南极磷虾低温胰蛋白酶 OUC-Pp-20 最适 pH 为 8^[3]。多数胰蛋白酶的最适 pH 值集中在 8 左右, 说明 EsTRY 的最适 pH 接近中性, 归类为中性蛋白酶。

2.5 EsTRY 对 PAEs 的水解活性验证

2.5.1 液相检测 通过 HPLC 定量分析各底物在反应体系中的浓度变化。在 45 °C、pH 为 9 的条件下, 检测 EsTRY 对 1 mmol/L DMP、DEP、DPRP、DBP 的降解效果。DMP、DEP、DPRP、DBP 的保留时间分别为 7.412、8.006、8.726 和 9.764 min。反应 1 h 后, 四种底物的峰面积出现不同程度的下降, 浓度分别降低了 16.2%、46.8%、69.8%和 63.6% (图 9), 表明 EsTRY 能够有效催化 DMP、DEP、DPRP 和 DBP 的降解反应。

2.5.2 底物浓度影响 底物浓度(1 mmol/L 和 2 mmol/L)对于 EsTRY 降解 DMP、DEP、DPRP、DBP 的效率存在一定影响。在相同反应温度和反应时间下, 重组酶 EsTRY 处理 1~5 h 后, 1 mmol/L 底物浓度下各 PAEs 的降解率普遍略高于 2 mmol/L 的底物浓度。尽管在总降解量上, 2 mmol/L 的底物浓度更高, 但在反应初期(15 min 内), 1 mmol/L 浓度表现出更高的降解效率。具体而言, 在反应开始 15 min 内, 1 mmol/L DMP、DEP、DPRP 和 DBP 的降解率分别为 13.2%、34.4%、60.8%和

42.2%; 而 2 mmol/L 4 种底物的降解率分别为 16.3%、32.8%、55.0%和 38.9%。在 1 h 内, 1 mmol/L 4 种底物的降解率分别提升 16.2%、46.8%、69.8%和 63.6%, 2 mmol/L 4 种底物的降解率分别为 25.6%、49.6%、61.1%和 59.0%。在 5 h 内, EsTRY 对于 1 mmol/L PAEs 的降解率分别为 39.4%、62.7%、76.5%和 76.7%; 2 mmol/L PAEs 的降解率分别为 37.1%、58.0%、74.3%和 76.1% (图 10)。综合而看, 虽然较高底物浓度(2 mmol/L)最终降解量更大, 但低浓度底物在初期反应中具有更高的降解效率, 可能与酶-底物结合效率及酶的饱和度有关。随着反应时间的延长, 酶活性逐渐增强, 较高浓度底物有助于提升总体降解量。此外, Chi 等^[31]研究表明胰蛋白酶-PAEs 复合物的形成遵循 DMP>DEP>DBP 的亲合力顺序, 与侧链长度的顺序相反。EsTRY 对 PAEs 的降解亦符合此规律。

2.5.3 温度影响 温度对 EsTRY 催化不同底物的降解活性具有显著影响。在 1 mmol/L 底物浓度下, 对于 DMP 和 DEP, EsTRY 在 45 °C 下降解效果最为显著, 反应 15 min 降解率分别达到 13.2%和 34.4%, 1 h 降解率分别为 16.2%和 46.8%, 5 h 降解率进一步分别达到 39.4%和 62.7%。EsTRY 在 35 °C 时对 DPRP 降解率最高, 反应 15 min 降解率达到 63.5%, 1 h 降解率为 69.8%, 5 h 降解率进一步达到 76.5%。对于 DBP, EsTRY 在 25 °C 降解率最高, 反应 15 min 降解率为 48.9%, 反应 1 h

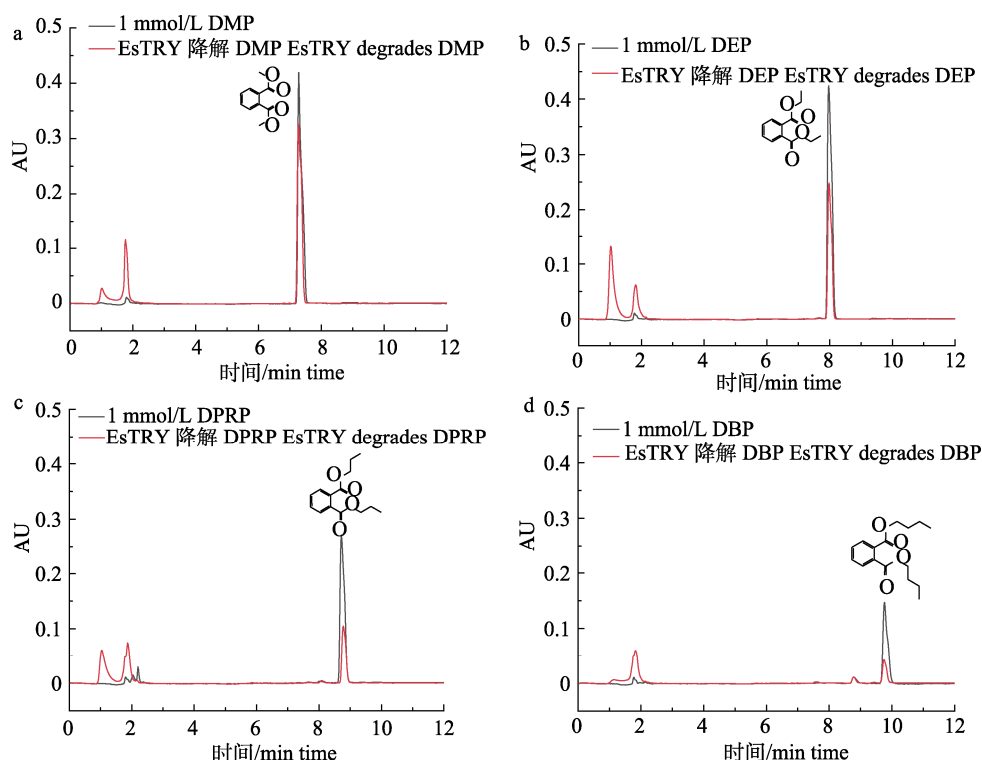


图 9 在 45 °C, pH 为 9 条件下 EsTRY 降解 1 mmol/L DMP、DEP、DPRP、DBP 1 h 的液相图
a. EsTRY 降解 1 mmol/L DMP 1 h 的液相图; b. EsTRY 降解 1 mmol/L DEP 1 h 的液相图; c. EsTRY 降解 1 mmol/L DPRP 1 h 的液相图; d. EsTRY 降解 1 mmol/L DBP 1 h 的液相图。

Fig. 9 Liquid phase diagram of EsTRY degradation of 1 mmol/L DMP, DEP, DPRP, DBP for 1 h at 45 °C, pH 9
a. Liquid phase diagram of EsTRY degradation of 1 mmol/L DMP for 1 h; b. Liquid phase diagram of EsTRY degradation of 1 mM DEP for 1 h; c. Liquid phase diagram of EsTRY degradation of 1 mmol/L DPRP for 1 h; d. Liquid phase diagram of EsTRY degradation of 1 mmol/L DBP for 1 h.

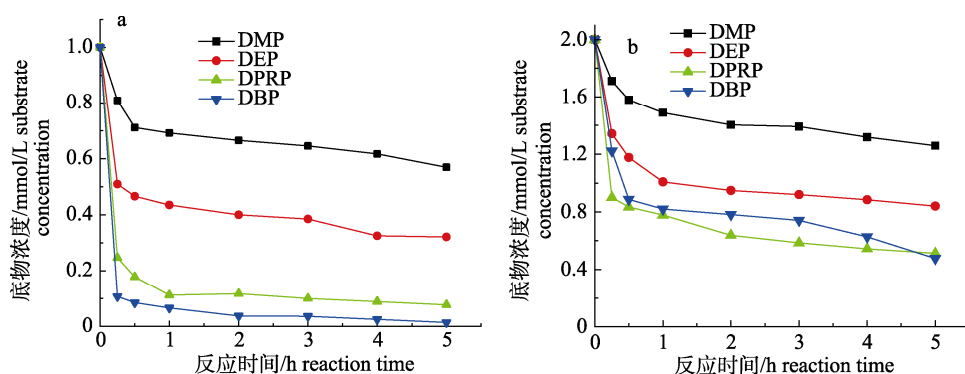


图 10 EsTRY 对于 1 mmol/L、2 mmol/L 底物的降解曲线

a. EsTRY 对于 1 mmol/L 底物的降解曲线; b. EsTRY 对于 2 mmol/L 底物的降解曲线。

Fig. 10 Degradation profiles of EsTRY for 1 mmol/L, 2 mmol/L substrates

a. Degradation curve of EsTRY for 1 mmol/L substrate; b. Degradation curve of EsTRY for 2 mmol/L substrate.

达到 79.9%, 反应 5 h 降解率高达 98.7%。对于 DPRP 和 DBP, 较低温度(如 25 °C 和 35 °C)反而更有利于其降解, 这与 EsTRY 的低温酶学特性相一致, 进一步印证了其在低温条件下具有较高催

化活性(表 1~表 4、图 11)。表明在某些环境条件下(如低温环境), EsTRY 可能在特定污染物的生物降解中发挥更大作用, 具有在水产养殖和生态修复等领域的应用潜力。

表 1 不同温度下 EsTRY 对 DMP 的降解率
Tab. 1 Degradation rates of EsTRY for DMP at different temperatures

温度/℃ temperature	反应时间/h reaction time						
	0.25	0.5	1	2	3	4	5
25	1.0	3.1	4.3	5.0	7.3	8.4	14.3
35	0.9	2.9	3.1	5.9	8.1	9.1	15.8
45	13.2	14.8	16.2	17.7	26.5	29.3	39.4

表 2 不同温度下 EsTRY 对 DEP 的降解率
Tab. 2 Degradation rates of EsTRY for DEP at different temperatures

温度/℃ temperature	反应时间/h reaction time						
	0.25	0.5	1	2	3	4	5
25	35.2	43.6	44.9	46.3	47.1	50.6	56.9
35	33.6	42.3	47.2	49.1	50.0	51.6	56.4
45	34.4	42.4	46.8	51.6	58.7	60.3	62.7

表 3 不同温度下 EsTRY 对 DPRP 的降解率
Tab. 3 Degradation rates of EsTRY for DPRP at different temperatures

温度/℃ temperature	反应时间/h reaction time						
	0.25	0.5	1	2	3	4	5
25	58.3	66.0	69.3	72.2	73.3	75.6	79.5
35	63.5	73.9	74.6	77.2	80.2	84.9	86.8
45	60.8	67.6	69.8	70.7	72.4	74.6	76.5

表 4 不同温度下 EsTRY 对 DBP 的降解率
Tab. 4 Degradation rates of EsTRY for DBP at different temperatures

温度/℃ temperature	反应时间/h reaction time						
	0.25	0.5	1	2	3	4	5
25	48.9	67.0	79.9	82.1	86.1	98.1	98.7
35	47.5	66.4	70.6	75.6	84.9	87.8	91.0
45	42.2	59.4	63.6	67.7	69.5	74.2	76.6

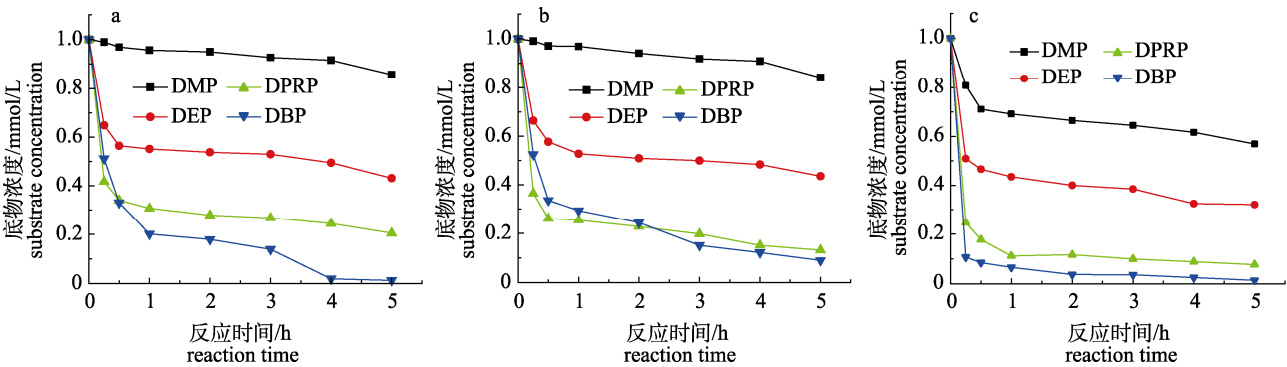


图 11 EsTRY 在 25 °C、35 °C、45 °C 下对 PAEs 的降解曲线

a. EsTRY 在 25 °C 下对 PAEs 的降解曲线; b. EsTRY 在 35 °C 下对 PAEs 的降解曲线;
c. EsTRY 在 45 °C 下对 PAEs 的降解曲线.

Fig. 11 Degradation profiles of PAEs by EsTRY at 25 °C, 35 °C, 45 °C

a. Degradation curve of EsTRY on PAEs at 25 °C; b. Degradation curve of EsTRY on PAEs at 35 °C;
c. Degradation curve of EsTRY on PAEs at 45 °C.

3 讨论

由于塑化剂通常不与聚合物基质发生化学键合, 随着塑料产品的老化和降解, 塑化剂容易从这些产品中逸出, 进入空气、水、土壤、污泥、废水、生物群和食物链中, 尤其容易富集于高脂肪含量的介质中, 从而成为广泛存在的污染物^[42]. PAEs 在环境中难以自然分解, 容易通过生物链蓄积, 对生态环境及人体构成潜在威胁. 环境中的 PAEs 会影响水生和陆生动物的繁殖, 导致其发育

和遗传异常^[43]. 目前, PAEs 被认定为第四类毒性化学物质, 并且在我国的环境优先污染物黑名单中列出了 DMP、DBP 和 DOP 三种 PAEs 化合物^[44]. 多种微生物如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)等都能降解 PAEs, 其降解效率受 PAEs 侧链长度、环境温度、pH 和污染物等因素影响^[45-47]. Tang 等^[48]分离出根瘤菌(*Rhizobium* sp.) LMB-1, 能够有效降解 PAEs, 该菌株在 45 h 内完全降解 DMP、DEP、DMP 和 MEP, 具有良好的土壤修复潜力.

Shariati 等^[49]分离出恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) ShA, 能够在 pH 7.0, 30 °C 下 22 h 内完全降解 0.9 mmol/L 的 DEP。枯草芽孢杆菌属(*Bacillus*) 菌株 LUNF1 在 pH 8.0、30 °C 下 7 d 内对 0.5 mmol/L DBP、DEP 的降解率约为 90.0%和 14%^[50]。假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) DNE-S1 在 pH 7.0、35 °C 下 24 h 内对 2.25 mmol/L DEP 降解率达 97.8%^[51]。GRAS 枯草芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) BJQ0005 在 pH 7.5、37 °C 下 12 h 内对 0.72 mmol/L DBP 的降解率约 98.0%, 其半衰期为 4.58 h, 该菌株在 5 d 能够降解 90%的 4.5 mmol/L DEP、DBP^[52]。尽管微生物降解塑化剂的研究取得了一定的进展, 但整体降解过程通常较为缓慢, 且受微生物种类、底物结构及环境条件等多因素制约。

除了微生物能够降解塑化剂外, 酶催化降解由于其高度特异性和高效能, 在 PAEs 降解领域具有广阔的应用前景。例如, 从戈登氏菌属(*Gordonia*) 放线菌中克隆并获得的脂酶 GoEst15, 在 pH 7.0、30 °C 条件下, 1 h 内可降解 80%的 DBP (5 mmol/L)^[53]。从毛豆腐宏基因组中筛选出的低温适应性酯酶 Est1260, 在 pH 8.5, 0 °C 下, 5 h 内可完全降解 5 mmol/L 的 DMP、DEP 和 DBP^[54]; 菌株 PAE-1 产生的水解酶在 30 °C 和 pH 8.0 下 12 h 内对 5 mmol/L 的 DBP 的降解率达到 98%^[55]。硫酸还原菌(sulfate-reducing bacteria)来源的酯酶 DeEst 在 pH 8.0, 55 °C 下, 1 h 内能够将 2 mmol/L DEP 水解 94.6%^[56]。冷活性水解酶 DphB, 在 10 °C 下, 8 h 内降解完全 0.1 mmol/L DMP 和 DEP^[57]; 嗜热放线菌来源羧酸酯酶 TfCa, 在 50 °C 下孵育 1 h 后, 完全降解 5 mmol/L 的 DEP^[58]。来源于贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的羧酸酯酶分别与 1 mmol/L DMP、DEP、DPRP 和 DBP 在 pH 7.0、37 °C 下作用 5 h 后, 降解率分别达到 25%、50%、94.8%和 88.4%^[59]。相比之下, 南极磷虾来源 EsTRY 对于 DMP、DEP、DPRP 和 DBP 的降解率和速率处于中上水平, 显示出良好的 PAEs 降解能力, 具备在污染环境修复方面的重要应用潜力。

本研究成功实现了南极磷虾来源胰蛋白酶

EsTRY 在大肠杆菌中的可溶性表达。EsTRY 具有较低的最适温度, 表明该酶在低温下具有较高的活性。EsTRY 能有效降解 PAEs, 为开发新型、高效且环保的塑化剂降解生物技术提供了理论支持和实验依据。

参考文献:

- [1] Grynbaum M D, Hentschel P, Putzbach K, et al. Unambiguous detection of astaxanthin and astaxanthin fatty acid esters in krill (*Euphausia superba* Dana)[J]. Journal of Separation Science, 2005, 28(14): 1685-1693.
- [2] Bergami E, Manno C, Cappello S, et al. Nanoplastics affect moulting and faecal pellet sinking in Antarctic krill (*Euphausia superba*) juveniles[J]. Environment International, 2020, 143: 105999.
- [3] Xin S L, Zhang H Y, Sun J N, et al. Characterization and hydrolysis mechanism analysis of a cold-adapted trypsin-like protease from Antarctic krill[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(17): 9955-9966.
- [4] Sjö Dahl J, Emmer Å, Vincent J, et al. Characterization of proteinases from Antarctic krill (*Euphausia superba*)[J]. Protein Expression and Purification, 2002, 26(1): 153-161.
- [5] Chen X. Purification and characterization of protease and lipase from Antarctic krill[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019. [陈昕. 南极磷虾蛋白酶和脂肪酶的分离纯化及性质研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.]
- [6] Hellgren L, Mohr V, Vincent J. Proteases of Antarctic krill—a new system for effective enzymatic debridement of necrotic ulcerations[J]. Experientia, 1986, 42(4): 403-404.
- [7] Wu Z Q, Wang J R, Shang X M, et al. Purification and characterization of cold adapted trypsins from Antarctic krill (*Euphausia superba*)[J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2014, 20(4): 531-543.
- [8] Rong Y L. Purification, enzymatic properties and mechanism of cold-adaption of carboxypeptidase from *Euphausia superba* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [荣雅利. 南极磷虾羧肽酶的分离纯化、酶学性质及适冷性机制研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [9] Zhang Y, He S D, Simpson B K. A cold active transglutaminase from Antarctic krill (*Euphausia superba*): Purification, characterization and application in the modification of cold-set gelatin gel[J]. Food Chemistry, 2017, 232: 155-162.
- [10] Xia J K. Cloning, heterologous expression and enzymatic properties of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase from *Euphausia superba*[D]. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology, 2023. [夏继琨. 南极磷虾果糖-1, 6-二磷酸醛

- 缩酶克隆、异源表达及酶学性质研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2023.]
- [11] Wang X T, Tan J H, Zou H Y, et al. Cloning and characterization of chitin deacetylase from *Euphausia superba*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(4): 2075.
- [12] Whangsuk W, Sungkeeree P, Nakasiri M, et al. Two endocrine disrupting dibutyl phthalate degrading esterases and their compensatory gene expression in *Sphingobium* sp. SM42[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 99: 45-54.
- [13] Olsen J V, Ong S E, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2004, 3(6): 608-614.
- [14] Walsh K. [4] Trypsinogens and trypsins of various species [M]. Methods in enzymology. Elsevier. 1970: 41-63.
- [15] Brown W E, Wold F. Alkyl isocyanates as active-site-specific reagents for serine proteases. Identification of the active-site serine as the site of reaction[J]. Biochemistry, 1973, 12(5): 835-840.
- [16] Wang H, Li S, Wang J J, et al. N-glycosylation in the protease domain of trypsin-like serine proteases mediates calnexin-assisted protein folding[J]. eLife, 2018, 7: e35672.
- [17] Tan X Y, Qi L B, Fan F J, et al. Analysis of volatile compounds and nutritional properties of enzymatic hydrolysate of protein from cod bone[J]. Food Chemistry, 2018, 264: 350-357.
- [18] Paskulin L, McGrath K, Hagan R, et al. Leave no stone unturned: Exploring the metaproteome of beerstone for the identification of archaeological beer production[J]. Journal of Archaeological Science, 2024, 168: 106019.
- [19] Boukil A, Suwal S, Chamberland J, et al. Ultrafiltration performance and recovery of bioactive peptides after fractionation of tryptic hydrolysate generated from pressure-treated β -lactoglobulin[J]. Journal of Membrane Science, 2018, 556: 42-53.
- [20] Yin C P, Zhang X Y, Xu B L, et al. Effect of limited hydrolysis on the structure and gel properties of soybean isolate proteins: A comparative study of papain or/and trypsin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282: 137398.
- [21] Nath A, Csighy A, Eren B A, et al. Bioactive peptides from liquid milk protein concentrate by sequential tryptic and microbial hydrolysis[J]. Processes, 2021, 9(10): 1688.
- [22] Denesyuk A I, Denessiouk K, Johnson M S, et al. Structural catalytic core in subtilisin-like proteins and its comparison to trypsin-like serine proteases and alpha/beta-hydrolases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(22): 11858.
- [23] Rudnick D A, Huang J S, Hidvegi T, et al. Regulation of PGC1 α downstream of the insulin signaling pathway plays a role in the hepatic proteotoxicity of mutant α 1-antitrypsin deficiency variant Z[J]. Gastroenterology, 2022, 163(1): 270-284.
- [24] Kim T H, Koo J H, Heo M J, et al. Overproduction of inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 1 after loss of G α ₁₃ in liver exacerbates systemic insulin resistance in mice[J]. Science Translational Medicine, 2019, 11(513): eaan4735.
- [25] Yang C L, Zhao H D. COVID-19 vaccination in patients with α 1-antitrypsin deficiency[J]. The Lancet Respiratory Medicine, 2021, 9(8): 818-820.
- [26] Seitz C, Isken B, Heynisch B, et al. Trypsin promotes efficient influenza vaccine production in MDCK cells by interfering with the antiviral host response[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 601-611.
- [27] De Vos S, Demeyere K, De Cock H, et al. Comparison of serum tryptase as a diagnostic oncological marker in canine versus human mast cell neoplasms[J]. Research in Veterinary Science, 2022, 151: 90-95.
- [28] Kozlova L, Frantsiyants E M, Tkalya L D, et al. Blood trypsin proteinases as a new additional test in differential diagnosis of brain tumors [J]. Journal of Clinical Oncology, 35(15).
- [29] Tanwar M, Debnath M, Debnath S, et al. Exploring the utility of nanoprotease as environmentally friendly benign laundry detergent fabric cleaner[J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 334: 130243.
- [30] Xiong C R. Preliminary study of trypsin for metabolism of deltamethrin[D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2009. [熊春蓉. 胰蛋白酶降解溴氰菊酯的实验研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2009.]
- [31] Chi Z X, Zhao J, Li W G, et al. *In vitro* assessment of phthalate acid esters-trypsin complex formation[J]. Chemosphere, 2017, 185: 29-35.
- [32] Mazorra-Manzano M A, Ramírez-Suarez J C, Yada R Y. Plant proteases for bioactive peptides release: A review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(13): 2147-2163.
- [33] Rahman M, Brazel C S. The plasticizer market: An assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges[J]. Progress in Polymer Science, 2004, 29(12): 1223-1248.
- [34] Rahman M, Brazel C S. The plasticizer market: An assessment of traditional plasticizers and research trends to meet

- new challenges[J]. Progress in Polymer Science, 2004, 29(12): 1223-1248.
- [35] Ghosh S, Sahu M. Phthalate pollution and remediation strategies: A review[J]. Journal of Hazardous Materials Advances, 2022, 6: 100065.
- [36] Wang Z K, Li X G, Tian J W, et al. Cloning, heterologous expression and characterization of a novel *Streptomyces trypsin* in *Bacillus subtilis* SCK6[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 147: 890-897.
- [37] Zhang Y F, Huang H, Yao X H, et al. High-yield secretory production of stable, active trypsin through engineering of the N-terminal peptide and self-degradation sites in *Pichia pastoris*[J]. Bioresource Technology, 2018, 247: 81-87.
- [38] Wang Y Y. Cloning and functional study of trypsin gene from *Euphausia superba*[D]. Qingdao: Qingdao University of Science & Technology, 2015. [王亚云. 南极磷虾胰蛋白酶基因的克隆与功能研究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2015.]
- [39] Zhang W Y, Wang D M, Gan Y R, et al. Fusion expression of human trypsin-1 with DsbA in *E. coli*[J]. Chemical Industry and Engineering, 2014, 31(6): 75-79. [张文勇, 王大梅, 甘一如, 等. 人源胰蛋白酶-1 与 DsbA 在 *E. coli* 中的融合表达[J]. 化学工业与工程, 2014, 31(6): 75-79.]
- [40] He L M. Genome mining, heterologous expression and enzymatic properties characterization of trypsin[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023. [何林曼. 耐碱胰蛋白酶的挖掘、异源表达和酶学性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.]
- [41] Heu M S, Kim H R, Pyeun J H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 112(3): 557-567.
- [42] Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: Toxicology and exposure[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2007, 210(5): 623-634.
- [43] Zhang Y, Jiao Y Q, Li Z X, et al. Hazards of phthalates (PAEs) exposure: A review of aquatic animal toxicology studies[J]. Science of The Total Environment, 2021, 771: 145418.
- [44] Rahman M, Brazel C S. The plasticizer market: An assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges[J]. Progress in Polymer Science, 2004, 29(12): 1223-1248.
- [45] Xu G, Li F S, Wang Q H. Occurrence and degradation characteristics of dibutyl phthalate (DBP) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in typical agricultural soils of China[J]. Science of The Total Environment, 2008, 393(2-3): 333-340.
- [46] Paluselli A, Aminot Y, Galgani F, et al. Occurrence of phthalate acid esters (PAEs) in the northwestern Mediterranean Sea and the Rhone River[J]. Progress in Oceanography, 2018, 163: 221-231.
- [47] Yuan S Y, Huang I C, Chang B V. Biodegradation of dibutyl phthalate and di-(2-ethylhexyl) phthalate and microbial community changes in mangrove sediment[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, 184(1-3): 826-831.
- [48] Tang W J, Zhang L S, Fang Y, et al. Biodegradation of phthalate esters by newly isolated *Rhizobium* sp. LMB-1 and its biochemical pathway of di-n-butyl phthalate[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(1): 177-186.
- [49] Shariati S, Ali Pourbabae A, Ali Alikhani H. Biodegradation of diethyl phthalate and phthalic acid by a new indigenous *Pseudomonas putida*[J]. Folia Microbiologica, 2023, 68(3): 477-488.
- [50] Fan S H, Li C S, Guo J J, et al. Biodegradation of phthalic acid esters (PAEs) by *Bacillus* sp. LUNF1 and characterization of a novel hydrolase capable of catalyzing PAEs[J]. Environmental Technology & Innovation, 2023, 32: 103269.
- [51] Tao Y, Li H X, Gu J D, et al. Metabolism of diethyl phthalate (DEP) and identification of degradation intermediates by *Pseudomonas* sp. DNE-S1[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 173: 411-418.
- [52] Xu Y Q, Liu X, Zhao J R, et al. An efficient phthalate ester-degrading *Bacillus subtilis*: Degradation kinetics, metabolic pathway, and catalytic mechanism of the key enzyme[J]. Environmental Pollution, 2021, 273: 116461.
- [53] Huang H, Zhang X Y, Chen T L, et al. Biodegradation of structurally diverse phthalate esters by a newly identified esterase with catalytic activity toward di(2-ethylhexyl) phthalate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(31): 8548-8558.
- [54] Liu Y Y, Zhang Y X, Wen H M, et al. Cloning and rational modification of a cold-adapted esterase for phthalate esters and parabens degradation[J]. Chemosphere, 2023, 325: 138393.
- [55] Lu M Y. Isolation of paes-degrading strain, analysis of its degradation pathway, cloning of hydrolase gene and Characterization of its encoding enzyme[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019. [卢美玉. 增塑剂邻苯二甲酸酯降解菌的分离、降解途径解析及其水解酶基因的克隆和酶学特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.]
- [56] Yang L. Gene discovery of esterase DeEst from Desulfurellaceae bacterium and its application in degradation of phthalic acid esters[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2023. [杨柳. 硫还原菌酯酶 DeEst 的挖掘

- 及其降解邻苯二甲酸酯类塑化剂的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2023.]
- [57] Jiao Y Y, Chen X, Wang X, et al. Identification and characterization of a cold-active phthalate esters hydrolase by screening a metagenomic library derived from biofilms of a wastewater treatment plant[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e75977.
- [58] von Haugwitz G, Han X, Pfaff L, et al. Structural insights into (tere)phthalate-ester hydrolysis by a carboxylesterase and its role in promoting PET depolymerization[J]. ACS Catalysis, 2022, 12(24): 15259-15270.
- [59] Huang L. Gene cloning, expression, characteristics and application of carboxylesterase from *Bacillus velezensis*[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020. [黄琳. 贝莱斯芽孢杆菌羧酸酯酶的基因克隆、表达、酶学性质及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2020.]

Cloning and heterologous expression of Antarctic krill trypsin gene and its degradation of plasticizer

ZOU Huaying¹, TAN Jiahao¹, WANG Fang^{2*}, SONG Jia³, CHEN Mengyao¹, XU Jiakun^{2*}

1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Polar Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. College of Biological Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266061, China

Abstract: The objective of this study was to obtain the tryptic albuminase gene *EsTRY* from Antarctic krill (*Euphausia superba*) by screening and cloning, construct the recombinant expression vector EsTRY-pCold-SUMO, realize the high efficiency of heterologous expression in *Escherichia coli*, and reveal the degradation activity of this enzyme on phthalate esters (PAEs). The gene of trypsin EsTRY of Antarctic krill is 1350 bp in length, encoding 449 amino acids, with a theoretical molecular weight (MW) of 47040.35 Da and a theoretical isoelectric point (pI) of 4.90. Structural analysis revealed the presence of a catalytic triad (Asp/Glu-Ser-His) and a substrate-specific binding site, classifying EsTRY as a member of the serine protease family. The esterase activity of EsTRY was determined to be 18973 U/mL, with a specific enzyme activity of 5802.15 U/mg. The optimal reaction temperature was found to be 25 °C, and the optimal pH was determined to be 7.0. Enzyme-catalyzed degradation experiments demonstrated that EsTRY possessed the capacity to degrade phthalic acid esters (PAEs), with 13.2%, 34.4%, and 63.5% of the 1 mmol/L of PAEs being degraded within 15 min, respectively. Furthermore, 48.9% of 1 mmol/L DMP, DEP, DPRP, and DBP were degraded within 15 min, and the degradation rates reached 39.4%, 62.7%, 86.8%, and 98.7% within 5 h, respectively. In this paper, we investigated the degradation activity of EsTRY on PAEs, which provides a new potential tool for the biological management of plasticizer pollution, as well as a scientific basis for the efficient utilization and high-value exploitation of Antarctic krill.

Key words: Antarctic krill; trypsin; heterologous expression; degradation of plasticisers

Corresponding author: XU Jiakun. E-mail: xujk@ysfri.ac.cn; WANG Fang. Email: wangfang@ysfri.ac.cn