

# 里氏木霉酸性蛋白酶的纯化、酶学性质及稳定剂筛选

吴 尧<sup>1</sup> 余华顺<sup>1</sup> 陈 瑞<sup>1</sup> 杨兆世<sup>1</sup> 李 明<sup>1</sup> 高 洁<sup>1</sup> 张 彦<sup>1,2</sup>

(1. 安琪酵母股份有限公司酵母功能湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443003;

2. 农业微生物发掘与利用全国重点实验室, 湖北 宜昌 443003)

**摘要:** [目的] 以里氏木霉菌株 (*Trichoderma reesei*) 来源的酸性蛋白酶为材料, 纯化并分析其酶学性质, 筛选酸性蛋白酶的稳定剂配方。[方法] 采用硫酸铵分级沉淀、透析、阴离子交换柱层析技术对酸性蛋白酶进行纯化, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 确定其相对分子质量, 并分析其酶学性质。对酸性蛋白酶的稳定剂配方进行优化, 并考察其对酸性蛋白酶的贮藏稳定性。[结果] 纯化后酸性蛋白酶的比酶活力为 4 849 U/mg, 纯化倍数为 3.28 倍, 相对分子质量为 40, 该酶的最适反应条件为 pH 3.0, 反应温度 55 °C, 在 pH 3.0~6.0 范围内和温度 <60 °C 时稳定性较好, 60 °C 时酶活力保存率为 69%, 具有较高的耐温性。金属离子中 Na<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 对酸性蛋白酶稳定性有保护作用。酸性蛋白酶在 20% 氯化钠浓度下贮藏 7 d 仍保留有一定的活性, 表现出较高的耐盐性能。酸性蛋白酶稳定剂的最优配方为麦芽糖 26%、甘露醇 12.5%、氯化钠 12%、氯化锌 0.1 mol/L。添加稳定剂配方后, 酸性蛋白酶在 45 °C 贮藏 48 d 后, 相对酶活力为 92.8%。[结论] 酸性蛋白酶具有较高的耐热性和耐盐性, 稳定剂配方可以明显提高酸性蛋白酶的稳定性。

**关键词:** 酸性蛋白酶; 纯化; 酶学性质; 酶稳定性

## Purification, enzymatic properties, and stabilizer screening of acid protease from *Trichoderma reesei*

WU Yao<sup>1</sup> YU Huashun<sup>1</sup> CHEN Rui<sup>1</sup> YANG Zhaoshi<sup>1</sup> LI Ming<sup>1</sup> GAO Jie<sup>1</sup> ZHANG Yan<sup>1,2</sup>

(1. The Hubei Provincial Key Laboratory of Yeast Function, Angel Yeast Co., Ltd., Yichang, Hubei 443003, China;

2. National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Yichang, Hubei 443003, China)

**Abstract:** [Objective] To purify and study the enzymatic properties of acid protease from the *Trichoderma reesei* strain, and to screen the stabilizer formula. [Methods] The acid protease is purified by ammonium sulfate precipitation, dialysis, and anion exchange column chromatography. Then, its molecular weight is determined by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and its enzymatic properties are studied. Finally, the stabilizer formula of acid protease is optimized, with an investigation into its effect on acid protease storage stability. [Results] For the purified acid protease, its specific enzyme activity is 4 849 U/mg, purification fold is 3.28 times, and relative molecular weight is 40. The optimal reaction condition of the enzyme is a pH of 3.0 and a temperature of 55 °C, with satisfactory stability in the pH range of 3.0 to 6.0 and below 60 °C. The enzyme activity retention rate is 69% at 60 °C, indicating high temperature resistance. In metal ions, Na<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> protect acid protease stability. Stored at a concentration of 20% sodium chloride for 7 days, acid protease still retains certain activity, exhibiting high salt tolerance. The optimal formula of acid protease stabilizer is: maltose 26%, mannitol 12.5%, sodium chloride 12%, and zinc chloride 0.1 mol/L. Added with stabilizer, the enzyme activity of acid protease is 92.8%.

**基金项目:** 湖北省自然科学基金项目 (编号: 2024AFD182)

**通信作者:** 余华顺 (1976—), 男, 安琪酵母股份有限公司高级工程师, 硕士。E-mail: yuhs@angelyeast.com

**收稿日期:** 2025-06-18 **改回日期:** 2025-11-25

**引用格式:** 吴尧, 余华顺, 陈瑞, 等. 里氏木霉酸性蛋白酶的纯化、酶学性质及稳定剂筛选[J]. 食品与机械, 2026, 42(4): 26-32.

**Citation:** WU Yao, YU Huashun, CHEN Rui, et al. Purification, enzymatic properties, and stabilizer screening of acid protease from *Trichoderma reesei*[J]. Food & Machinery, 2026, 42(4): 26-32.

after storage at 45 °C for 48 days. [Conclusion] Acid protease is high in heat and salt resistance, while the stabilizer formula can significantly improve acid protease stability.

**Keywords:** acid protease; purification; enzymatic property; enzyme stability

酸性蛋白酶是指具有较低的最适反应 pH 的蛋白酶,其催化机制依赖于两个催化天冬氨酸残基的协同作用来实现对肽键的水解<sup>[1]</sup>。酸性蛋白酶具有专一性强、反应条件温和、效率高等特点,被广泛应用于饲料、食品、酿造等领域<sup>[2-6]</sup>。

酸性蛋白酶因来源不同而对温度、pH 和离子强度的耐受性有所区别,不同的酸性蛋白酶在工业化应用的适用性上存在较大差异<sup>[7]</sup>。其中,具备耐温和耐盐特性的酸性蛋白酶因更适用特定的应用条件,从而受到研究者的重视<sup>[8]</sup>。此外,早期开发的酸性蛋白酶产品一般为固体剂型,液体剂型酶制剂产品的生产一般是发酵液经除菌浓缩后再加入稳定剂和防腐剂制备而成,具有工艺简化、无粉尘、使用方便等优点<sup>[9]</sup>。但液体剂型酶制剂也容易出现酶活力不稳定的现象<sup>[10]</sup>。曹治云<sup>[11]</sup>研究表明,低相对分子质量的水混溶共溶剂能够增加或降低酸性蛋白酶的稳定性。但不同来源的酶具备自身的特性,需要进行相应的研究来确定其合适稳定剂类型和组合<sup>[12]</sup>。

研究拟对酸性蛋白酶进行纯化并分析其酶学性质,利用升温加速试验法考察金属离子、糖醇类等化合物的类型和浓度对其稳定性的影响,筛选得到稳定剂配方,为扩大酸性蛋白酶的工业化应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

里氏木霉 E79-2 菌株:安琪酵母股份有限公司;

YMJ6011 玉米浆:临朐县华懋饲料有限公司;

SDS-PAGE 预制胶:南京金斯瑞生物科技有限公司;

DEAE Large Scale 预装柱:西安蓝晓科技有限公司;

葡萄糖、磷酸二氢钾、硫酸铵、硫酸镁、氯化钙、乳糖、牛血清蛋白、考马斯亮蓝 R-250、十二烷基硫酸钠(SDS)、酪蛋白、福林试剂、三氯乙酸、碳酸钠、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)、硫酸铜、氯化锂、硫酸亚铁、氯化锰、氯化镁、氯化锌、氯化钠、氯化钙、甘油、山梨醇、甘露醇、木糖、麦芽糖、海藻糖、海藻酸钠、柠檬酸、冰醋酸等:分析纯,国药集团药业股份有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

生化培养箱: MJ150 型,南通莱特科学仪器有限公司;

恒温摇床: ZQZY-88CV 型,上海知楚仪器有限公司;

超净工作台: ACB-4E1-CN 型,新加坡艺思高科技有限公司;

灭菌锅: SN210C 型,日本雅马拓科技有限公司;

紫外分光光度计: UVmini-1285 型,日本岛津公司;

冷冻离心机: 3-18KS 型,美国 Sigma 公司;

pH 计: FiveEasy Plus 型,瑞士梅特勒—托利多公司;

恒温水浴锅: 601 型,江苏金怡仪器科技有限公司;

蛋白纯化仪: Pure 25 M1 型,美国 GE AKTA 公司;

电泳仪: DYY-5 型,北京六一仪器厂。

### 1.2 方法

**1.2.1 粗酶液的制备** 里氏木霉 E79-2 菌株经过摇瓶发酵,摇瓶发酵培养基:葡萄糖 4 g/L,玉米浆 26 g/L,乳糖 37.5 g/L,硫酸铵 3 g/L,硫酸镁 1 g/L,磷酸二氢钾 6 g/L,无水氯化钙 0.5 g/L,其余为蒸馏水;初始 pH 值为 4.5,115 °C 灭菌 30 min。28 °C、220 r/min 培养 168 h,12 000 r/min 离心 5 min,上清液过 0.22 μm 微滤膜除菌后得到酸性蛋白酶粗酶液,4 °C 低温贮藏备用。

#### 1.2.2 酸性蛋白酶的分离纯化

(1) 硫酸铵分级沉淀与透析:设定硫酸铵饱和度分别为 20%,30%,40%,50%,60%,70%,75%,80%,85%,取粗酶液 20 mL,冰水浴下,向粗酶液中缓慢加入硫酸铵粉末至预定的硫酸铵饱和度,溶解后于 4 °C 贮藏 4 h,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,沉淀中加入 0.05 mol/L 醋酸缓冲液(pH 4.0)复溶,测定复溶沉淀及上清液的酶活力。根据相对酶活力占比确定分级沉淀的最适饱和和区间。

收集最适饱和和区间的沉淀,复溶,装入透析袋(8 kDa)中,于 4 °C 透析,每 6 h 换一次缓冲溶液,重复 5 次,冷冻干燥后备用。

(2) 柱层析:用纯化水将酸性蛋白酶冻干粉配制成蛋白质量浓度为 25 mg/mL 的溶液,经 0.22 μm 微滤膜除菌后备用。柱层析上样量 1 mL,平衡缓冲液 Buffer A 为 20 mol/L Tris-HCl, pH 7.0,洗脱缓冲液 Buffer B 为 20 mol/L Tris-HCl, pH 7.0(梯度混合 1 mol/L NaCl),层析柱为 5 mL DEAE Large Scale 预装柱,层析流速 1.0 mL/min,每管收集 5 mL。

(3) SDS-PAGE 电泳:参照文献[13]。

#### 1.2.3 酶活力、蛋白含量及稳定性测定

(1) 酶活力:按 GB/T 28715—2012 执行。

(2) 可溶性蛋白含量:采用 Bradford 法<sup>[13]</sup>。

(3) 稳定性:根据文献[14]的方法并修改。酸性蛋白

酶与稳定剂于较高温度下贮藏,考察酶活力损失状况分析稳定剂对酶活力稳定性的影响。酸性蛋白酶 pH 为 4.0~4.2, 45 °C 密封贮藏 1 周。

#### 1.2.4 酸性蛋白酶的酶学性质分析

(1) 最适反应温度及温度稳定性:将酸性蛋白酶用醋酸缓冲溶液(0.05 mol/L, pH 4.0)溶解,分别于 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C 保温 5 min, 测定酶活力, 确定最适反应温度。

(2) 最适反应 pH 及 pH 稳定性:分别用 pH 值为 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 的醋酸缓冲溶液溶解酸性蛋白酶, 静置 2 h 后, 测定酶活力, 确定最适反应 pH 值。

(3) 金属离子:向酸性蛋白酶溶液中分别加入 25 mmol/L 硫酸铜、氯化镁、氯化钙、硫酸亚铁、氯化锰、氯化锂、氯化锌、氯化钠, 45 °C 贮藏 7 d 后, 测定酶活力, 考察不同金属离子对酸性蛋白酶稳定性的影响。

(4) 耐盐性:向酸性蛋白酶溶液中分别加入 5%, 10%, 20% 氯化钠, 45 °C 贮藏 7 d, 每 24 h 测定酶活力, 考察酸性蛋白酶的耐盐性。

#### 1.2.5 单因素试验

(1) 稳定剂类型对酸性蛋白酶稳定性的影响:向酸性蛋白酶溶液中分别加入 5% 的山梨醇、甘露醇、海藻糖、甘油、木糖、麦芽糖, 分别加入 0.1% 的柠檬酸、EDTA、SDS 和海藻酸钠进行稳定性试验, 考察稳定剂对酸性蛋白酶稳定性的影响。

(2) 稳定剂浓度对酸性蛋白酶稳定性的影响:选择对酶活力稳定性有保护作用的试剂, 向酸性蛋白酶中分别添加金属离子浓度为 0.025, 0.050, 0.100, 0.300, 0.600 mol/L, 糖醇类化合物浓度为 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 的试剂, 考察稳定剂的最佳浓度。

1.2.6 正交试验 根据单因素试验和耐盐性试验结果, 选取 3~5 种有效的酸性蛋白酶稳定剂进行正交试验设计。

1.2.7 添加稳定剂的酸性蛋白酶的长期贮藏试验 根据正交试验结果确定稳定剂配方, 贮藏温度为 45 °C。

#### 1.3 数据处理

采用 Minitab 软件进行显著性分析, 使用 Origin 8.1 软件进行数据统计分析并绘制图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 酸性蛋白酶的分离纯化

2.1.1 硫酸铵分级沉淀及透析 由图 1 可知, 在 40% 硫酸铵饱和度下, 沉淀中的相对酶活力较低, 但上清液的相对酶活力较高, 故可认为沉淀中绝大部分为杂蛋白。当硫酸铵饱和度 > 70% 时, 沉淀中的相对酶活力变化较小, 认为此时已将酶蛋白沉淀完全。故可确定硫酸铵分级盐析

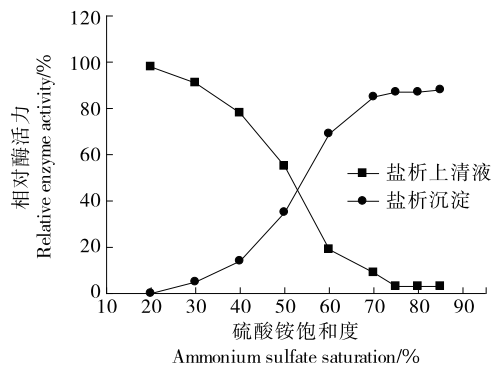


图 1 酸性蛋白酶的硫酸铵分级沉淀

Figure 1 Ammonium sulfate precipitation of acid protease

的饱和度区间为 40%~70%。取该区间的沉淀进行复溶, 透析, 冷冻干燥后备用。

2.1.2 柱层析纯化 由图 2 可知, 酸性蛋白酶经过柱层析纯化, 蛋白组得到有效分离, 分别收集蛋白峰 (I~IV) 进行电泳分析。峰 I 为上柱流穿峰和平衡液洗涤峰, 峰 II、III 和 IV 为梯度盐 (0~1 mol/L) 浓度洗涤峰, 其中峰 III 为主峰, 酶活力和蛋白浓度较高, 认为其为纯化的酸性蛋白酶。

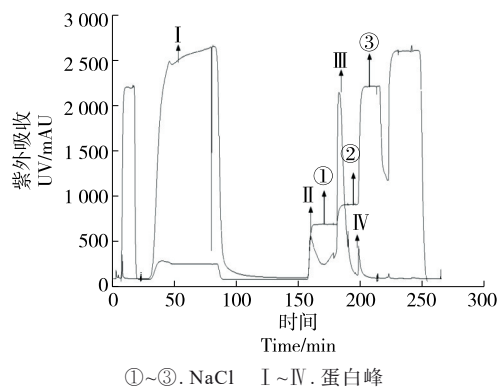


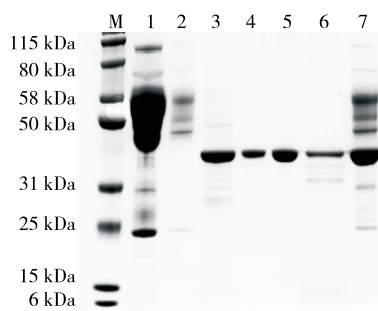
图 2 酸性蛋白酶的 DEAE 柱层析图谱

Figure 2 DEAE column chromatogram of acid protease

2.1.3 SDS-PAGE 电泳 由图 3 可知, 酸性蛋白酶经过硫酸铵分级盐析沉淀和透析, 再经过 DEAE 离子交换柱层析, 所收集的纯化组分峰 I~IV, 其中纯化组分峰 III 的电泳结果单一, 且比酶活力相对较高, 可视为纯酶组分。由表 1 可知, 酸性蛋白酶的相对分子质量为 40, 比酶活力为 4 849 U/mg, 纯化倍数为 3.28 倍。

### 2.2 酸性蛋白酶的酶学性质

2.2.1 最适反应温度及温度稳定性 由图 4 可知, 酸性蛋白酶的最适反应温度为 55 °C; 当反应温度为 60 °C 时, 相对酶活力为 69%, 表现出较高的耐热性能, 与赵元昊<sup>[15]</sup>的研究结果类似。



M. Mark 1. 粗酶液 2. 柱层析峰 I 3. 柱层析峰 II 4. 柱层析峰 III 5. 柱层析峰 III 6. 柱层析峰 IV 7. 硫酸铵分级盐析

图3 酸性蛋白酶 SDS-PAGE 电泳图

Figure 3 SDS-PAGE electrophoretogram of acid protease

表1 各步纯化样品的比酶活力和纯化倍数

Table 1 Specific enzyme activity and purification fold of samples at each purification step

| 纯化步骤       | 比酶活/(U·mg <sup>-1</sup> ) | 纯化倍数 |
|------------|---------------------------|------|
| 粗酶液        | 1 478                     |      |
| 硫酸铵分级盐析    | 2 325                     | 1.57 |
| 柱层析组分峰 III | 4 849                     | 3.28 |

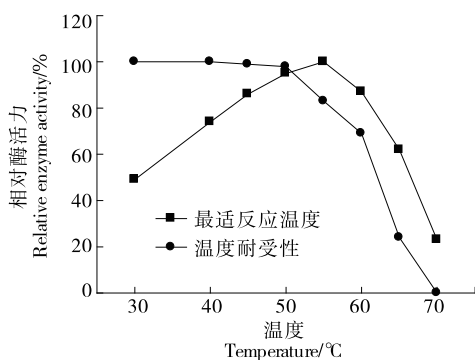


图4 酸性蛋白酶的最适反应温度及温度稳定性

Figure 4 Optimal reaction temperature and temperature stability of acid protease

2.2.2 最适反应 pH 及 pH 稳定性 由图 5 可知,酸性蛋白酶的最适反应 pH 为 3.0;在 pH 3.0~6.0 时,酶活力稳定性较高;在 pH 7.0 时残余酶活力约 60%,表明酸性蛋白酶可以在一个较宽的 pH 范围内保持稳定。

2.2.3 金属离子的影响 由图 6 可知,Na<sup>+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>对酸性蛋白酶稳定性有保护作用,与王鑫等<sup>[16-17]</sup>的研究报结果一致,这可能与酸性蛋白酶具有相似的活性位点有关。

2.2.4 酸性蛋白酶的耐盐性 由图 7 可知,酸性蛋白酶在 NaCl 浓度 < 10% 时,酶活力损失较小。当盐浓度为 20%

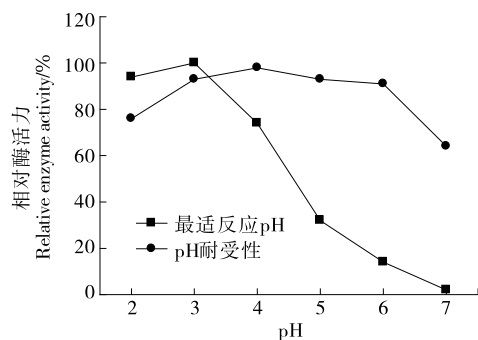


图5 酸性蛋白酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性

Figure 5 Optimal reaction pH and pH stability of acid protease

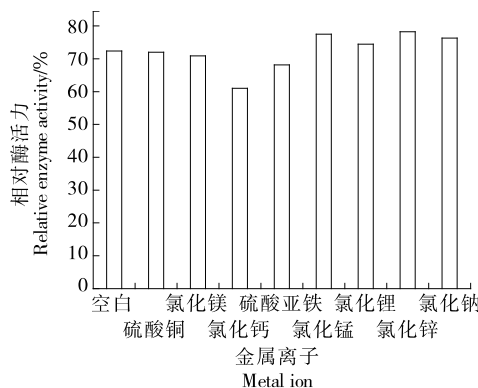


图6 金属离子对酸性蛋白酶稳定性的影响

Figure 6 Effect of metal ions on acid protease stability

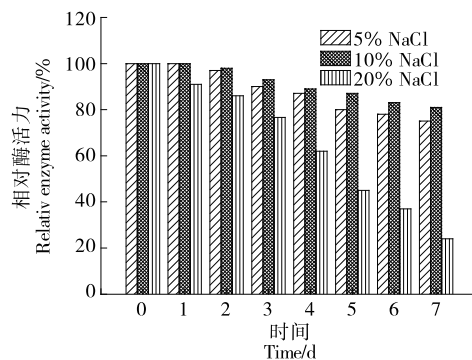


图7 酸性蛋白酶的耐盐性

Figure 7 Salt tolerance of acid protease

时,酶活力虽有损失但仍保留一定的活性。因此,酸性蛋白酶具有较高的耐盐性,与余洁瑜等<sup>[18]</sup>的研究结果一致。

### 2.3 单因素试验

2.3.1 稳定剂种类 由图 8 可知,甘露醇、海藻糖、木糖和麦芽糖对酸性蛋白酶稳定性有保护作用,可能是糖醇等羟基化合物能减少水对酶蛋白的破坏程度<sup>[19-20]</sup>。

2.3.2 稳定剂浓度 由图 9 可知,当 Mn<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>浓度 < 0.3 mol/L 时,酶活力保留率高于空白组。进一步提高

$\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  浓度,酶活力保留率显著下降。由图 10 可知,25%的海藻糖、25%的麦芽糖、15%的甘露醇和 30%的木糖对酸性蛋白酶的保护效果相对较好。

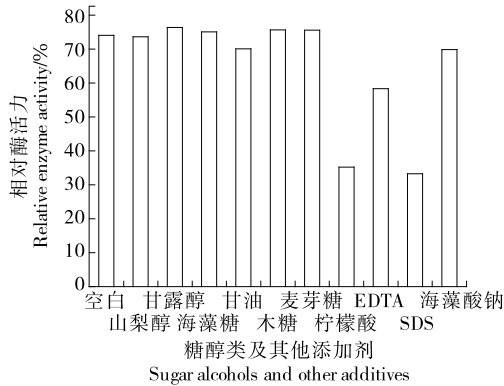


图 8 糖醇类溶质及其他添加剂对酸性蛋白酶稳定性的影响

Figure 8 Effect of sugar alcohol solutes and other additives on acid protease stability

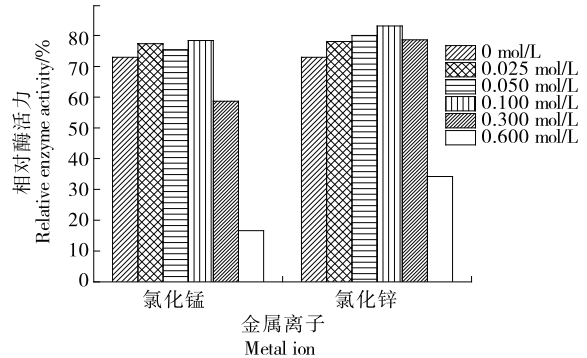


图 9  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  浓度对酸性蛋白酶稳定性的影响

Figure 9 Effect of  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations on acid protease stability

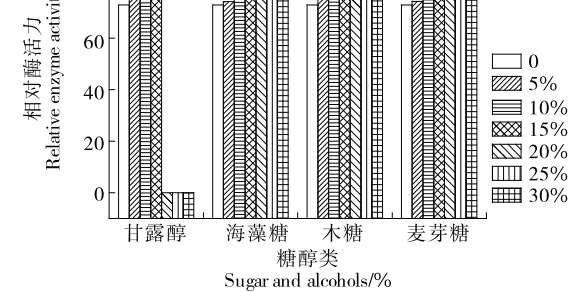


图 10 甘露醇、海藻糖、木糖和麦芽糖对酸性蛋白酶稳定性的影响

Figure 10 Effect of mannitol, trehalose, xylose, and maltose on acid protease stability

## 2.4 正交试验

根据单因素试验和酸性蛋白酶耐盐性结果,选取海藻糖、麦芽糖、甘露醇、氯化钠、氯化锌 5 个因素,设计五因素四水平正交试验,试验因素水平见表 2,试验设计及结果见表 3。

| 表 2 正交试验因素和水平                                        |         |         |         |         |                                          |
|------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|------------------------------------------|
| Table 2 Factors and levels of orthogonal experiments |         |         |         |         |                                          |
| 水平                                                   | A 海藻糖/% | B 麦芽糖/% | C 甘露醇/% | D 氯化钠/% | E 氯化锌/( $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |
| 1                                                    | 18      | 18      | 6       | 6       | 0.05                                     |
| 2                                                    | 22      | 22      | 9       | 9       | 0.10                                     |
| 3                                                    | 26      | 26      | 12      | 12      | 0.15                                     |
| 4                                                    | 30      | 30      | 15      | 15      | 0.20                                     |

| 表 3 正交试验设计及结果                                        |        |        |        |        |        |          |
|------------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| Table 3 Design and results of orthogonal experiments |        |        |        |        |        |          |
| 试验号                                                  | A      | B      | C      | D      | E      | 酶活力保留率/% |
| 1                                                    | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 93.4     |
| 2                                                    | 1      | 2      | 2      | 2      | 2      | 95.4     |
| 3                                                    | 1      | 3      | 3      | 3      | 3      | 97.6     |
| 4                                                    | 1      | 4      | 4      | 4      | 4      | 93.3     |
| 5                                                    | 2      | 1      | 2      | 3      | 4      | 92.0     |
| 6                                                    | 2      | 2      | 1      | 4      | 3      | 93.4     |
| 7                                                    | 2      | 3      | 4      | 1      | 2      | 96.7     |
| 8                                                    | 2      | 4      | 3      | 2      | 1      | 95.0     |
| 9                                                    | 3      | 1      | 3      | 4      | 2      | 96.8     |
| 10                                                   | 3      | 2      | 4      | 3      | 1      | 96.3     |
| 11                                                   | 3      | 3      | 1      | 2      | 4      | 92.7     |
| 12                                                   | 3      | 4      | 2      | 1      | 3      | 93.3     |
| 13                                                   | 4      | 1      | 4      | 2      | 3      | 94.8     |
| 14                                                   | 4      | 2      | 3      | 1      | 4      | 88.5     |
| 15                                                   | 4      | 3      | 2      | 4      | 1      | 96.0     |
| 16                                                   | 4      | 4      | 1      | 3      | 2      | 93.8     |
| $k_1$                                                | 94.925 | 94.250 | 93.325 | 92.975 | 95.175 |          |
| $k_2$                                                | 94.275 | 93.400 | 94.175 | 94.475 | 95.675 |          |
| $k_3$                                                | 94.775 | 95.750 | 94.475 | 94.925 | 94.775 |          |
| $k_4$                                                | 93.275 | 93.850 | 95.275 | 94.875 | 91.625 |          |
| $R$                                                  | 1.650  | 2.350  | 1.955  | 1.950  | 4.050  |          |

由表 3 可知,试验 3 在贮藏后的相对剩余酸性蛋白酶活力最高,为 97.6%。根据极差分析可知,各因素对酸性蛋白酶稳定性的影响大小为氯化锌>麦芽糖>甘露醇>氯化钠>海藻糖。当海藻糖浓度为 18%,麦芽糖浓度为 26%,氯化钠浓度为 12%,氯化锌浓度为 0.1  $\text{mol/L}$

时,酸性蛋白酶的酶稳定性最好。当海藻糖与甘露醇浓度较高时,酸性蛋白酶难以溶解,其他4种稳定剂则溶解效果较好。考虑到经济适用等因素影响,最终确定稳定剂的最优配方为麦芽糖26%、甘露醇12.5%、氯化钠12%、氯化锌0.1 mol/L。

## 2.5 添加稳定剂配方后酸性蛋白酶的长期贮藏稳定性

由表4可知,添加稳定剂配方后,酸性蛋白酶在45℃贮藏48 d后,酶活力为92.8%,且各贮藏期的数据均明显高于对照组,说明稳定剂配方可显著提高液体酸性蛋白酶的贮藏稳定性。

表4 稳定剂配方对酸性蛋白酶稳定性影响

Table 4 Effect of stabilizer formula on acid protease stability

| 贮藏时间/d | 酶活力保留率/% |      |
|--------|----------|------|
|        | 稳定剂组     | 对照组  |
| 17     | 98.3     | 42.9 |
| 32     | 96.5     | 20.9 |
| 48     | 92.8     | 3.4  |

## 3 结论

通过硫酸铵分级盐析沉淀、透析、DEAE柱层析纯化方式,获得了酸性蛋白酶纯化样品,经SDS-PAGE电泳确定其相对分子质量为40,纯化后的酸性蛋白酶的比酶活力为4 849 U/mg,纯化倍数为3.28倍。酸性蛋白酶的最适反应温度为55℃,最适反应pH为3.0。酸性蛋白酶在温度<60℃和pH为3.0~6.0范围内的酶活力相对稳定,60℃时酶活力保存率为69%,具有较高的耐温性。 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 和 $\text{Mn}^{2+}$ 对酸性蛋白酶稳定性有保护作用,酸性蛋白酶在20%氯化钠浓度下贮藏7 d仍保留一定的活性,表现出较高的耐盐性能。稳定剂的最优配方为麦芽糖26%、甘露醇12.5%、氯化钠12%、氯化锌0.1 mol/L。加入稳定剂配方后,酸性蛋白酶于45℃贮藏48 d后,酶活力保留率为92.8%,相比于对照样,稳定剂配方明显提高了液体酸性蛋白酶的贮藏稳定性,有助于开发液体剂型酸性蛋白酶产品。此外,酸性蛋白酶对部分糖和盐类有较高的耐受性。后续可进一步筛选更多类型的化合物对酸性蛋白酶稳定性的影响,得到相对更加精简且高效的稳定剂配方组合,也可以参照王丹等<sup>[21]</sup>的方法通过酶的固定化来提高酶的稳定性。

## 参考文献

- [1] DENESYUK A I, DENESSIOUK K, JOHNSON M S, et al. Structural catalytic core of the members of the superfamily of acid proteases[J]. *Molecules*, 2024, 29(15): 3 451.
- [2] HU J, INGALE S, RATHI P, et al. Influence of exogenous acid

- protease in broiler chickens fed corn - soybean meal-based diets [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2020, 104(1): 204-211.
- [3] MIZUTA S, MATSUYAMA Y, MIZUTA K, et al. Characterization of collagen in salmon nasal cartilage: enzymatic solubilization with fungal acid protease[J]. *Fisheries Science*, 2023, 89(4): 507-513.
- [4] 何林枫,王静,李利钦,等.水酶法提取樱桃籽油的工艺及理化性质[J]. *食品与机械*, 2023, 39(3): 188-193.  
HE L F, WANG J, LI L Q, et al. Optimization on extraction of cherry seed oil by aqueous enzymatic method and analysis of its physical-chemical properties[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(3): 188-193.
- [5] 惠继星,岳军,宁艳春,等.酸性蛋白酶在玉米燃料乙醇浓醪发酵中的应用[J]. *化工科技*, 2020, 28(4): 68-72.  
HUI J X, YUE J, NING Y C, et al. Application of acid protease in high-concentration mash fermentation of corn fuel ethanol[J]. *Science & Technology in Chemical Industry*, 2020, 28(4): 68-72.
- [6] LIU C, CHEN X Y, ZENG Y H, et al. Effect of the surface charge of the acid protease on leather bating performance[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 121: 330-338.
- [7] 赵露,刘春卯,吴芳彤,等.复合保护剂对液体蛋白酶稳定性相关研究[J]. *皮革与化工*, 2024, 41(5): 14-19, 25.  
ZHAO L, LIU C M, WU F T, et al. Study on the preservation of liquid protease with complex protectant[J]. *Leather and Chemicals*, 2024, 41(5): 14-19, 25.
- [8] 魏梦园.天冬氨酸蛋白酶的高效表达、热稳定性改造及应用研究[D].无锡:江南大学,2023: 5-6.  
WEI C Y. High efficient expression, thermal stability modification and application of aspartic protease[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023: 5-6.
- [9] 吴建军,周樱,詹志春.液体酶制剂在水产饲料中的应用[J]. *当代水产*, 2013, 38(7): 64-65.  
WU J J, ZHOU Y, ZHAN Z C. Application of liquid enzyme additives in aquafeeds[J]. *Current Fisheries*, 2013, 38(7): 64-65.
- [10] 郭玉杰.丝状真菌天冬氨酸蛋白酶的自激活机制与热稳定性改良研究[D].北京:中国农业科学院,2019: 9-15.  
GUO Y J. Studies on auto-activation mechanism and thermostability improvement of aspartic proteases from filamentous fungi[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019: 9-15.
- [11] 曹治云.黑曲霉产酸性蛋白酶催化机制和稳定剂研究[D].福州:福建师范大学,2005: 52-55.  
CAO Z Y. Studies on catalytic mechanism and stabilizer of acid protease from *Aspergillus niger* SI2-111[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2005: 52-55.
- [12] 程瑛.饲用蛋白酶的储存稳定性优化和酶活特性的研究[D].

- 武汉: 中南民族大学, 2018: 2-9.
- CHENG Y. Optimization of feed protease stability and enzyme activity analysis[D]. Wuhan: South-Central University for Nationalities, 2018: 2-9.
- [13] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南(第 4 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 42-50.
- OSBORNE F M, KINGSTON R E, SEDMAN J G, et al. Concise guide to molecular biology laboratory techniques: 4th edition[M]. Beijing: Science Press, 2005: 42-50.
- [14] 吴芳彤, 赵露, 曹倩荣, 等. 中性蛋白酶液体试剂的研究[J]. 河北省科学院学报, 2024, 41(6): 45-51.
- WU F T, ZHAO L, CAO Q R, et al. Study on neutral protease liquid preparation[J]. Journal of the Hebei Academy of Sciences, 2024, 41(6): 45-51.
- [15] 赵元昊. 里氏木霉可视化转化体系的构建及酸性蛋白酶的分子改造[D]. 昆明: 云南师范大学, 2022: 71-73.
- ZHAO Y H. Molecular modification of acidic protease based on visualized transformation system of *Trichoderma reesei*[D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2022: 71-73.
- [16] 王鑫, 金鹏, 宋鹏, 等. 黑曲霉酸性蛋白酶 EXPA 的克隆表达与酶学性质解析[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(3): 40-46.
- WANG X, JIN P, SONG P, et al. Cloning, expression and biochemical characterization of a novel acid protease EXPA from *Aspergillus niger*[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(3): 40-46.
- [17] 岳晓平, 陈朋, 朱玥明, 等. 米曲霉酸性蛋白酶基因在毕赤酵母中的异源表达及酶学性质[J]. 生物工程学报, 2019, 35(3): 415-424.
- YUE X P, CHEN P, ZHU Y M, et al. Heterologous expression and characterization of *Aspergillus oryzae* acidic protease in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(3): 415-424.
- [18] 余洁瑜, 林礼钊, 李维新, 等. 酸性蛋白酶对高盐稀态酱油发酵的影响[J]. 中国酿造, 2022, 41(7): 185-190.
- YU J Y, LIN L Z, LI W X, et al. Effects of acidic protease on high-salt dilute-state soy sauce fermentation[J]. China Brewing, 2022, 41(7): 185-190.
- [19] 刘超, 赵良忠, 王瑶琼, 等. 石屏臭豆腐来源的高产蛋白酶菌株筛选及酶学特性研究[J]. 食品与机械, 2024, 40(3): 33-43.
- LIU C, ZHAO L Z, WANG Y Q, et al. Screening and enzymatic characterization study of high-yield protease-producing bacterial strains derived from Shiping stinky tofu[J]. Food & Machinery, 2024, 40(3): 33-43.
- [20] 桂丽. 液体中性蛋白酶的制备、稳定性及应用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 7-8.
- GUI L. Preparation, stability and application of liquid neutral protease[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016: 7-8.
- [21] 王丹, 耿丽晶, 黄薇, 等. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SA/CS 微球固定菠萝蛋白酶及其酶学性质研究[J]. 食品与机械, 2025, 41(5): 27-35.
- WANG D, GENG L J, HUANG W, et al. Immobilization of bromelain on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SA/CS microspheres and its enzymatic properties[J]. Food & Machinery, 2025, 41(5): 27-35.