



文章栏目：固体废物处理与资源化

DOI 10.12030/j.cjee.202012079

中图分类号 X787

文献标识码 A

钟为章, 杨珂, 洪晨, 等. 沉淀法分离青霉素菌渣中蛋白质工艺的优化[J]. 环境工程学报, 2021, 15(6): 2027-2036.

ZHONG Weizhang, YANG Ke, HONG Chen, et al. Proteins from penicillin residue were isolated by trichloroacetic acid precipitation method[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(6): 2027-2036.

沉淀法分离青霉素菌渣中蛋白质工艺的优化

钟为章^{1,2}, 杨珂^{1,2}, 洪晨³, 许彬^{1,2}, 冯卫博^{1,2}, 陈赛男^{1,2}, 李月^{1,2}, 李再兴^{1,2,*}

1. 河北科技大学环境科学与工程学院, 石家庄 050018

2. 河北省污染防治生物技术实验室, 石家庄 050018

3. 北京科技大学能源与环境工程学院, 北京市工业典型污染物资源化重点实验室, 北京 100083

第一作者: 钟为章 (1983—), 男, 博士, 副教授。研究方向: 固体废物及废水资源化利用。E-mail: zhongweizhang@aliyun.com

*通信作者: 李再兴 (1973—), 男, 博士, 教授。研究方向: 固体废物及废水资源化利用。E-mail: li_zaixing@163.com

摘要 为高效回收抗生素菌渣中的蛋白质, 采用不同沉淀法分离青霉素菌渣中的蛋白质。首先, 考察不同沉淀法对蛋白质的沉淀效果, 选出最优蛋白质沉淀方法; 然后, 开展单因素实验并基于响应曲面法选择分离青霉素菌渣中蛋白质的最优工艺参数; 最后, 利用最优工艺条件对青霉素菌渣进行蛋白质分离实验验证。结果表明, 三氯乙酸 (TCA) 沉淀法沉淀效果最好, 其分离青霉素菌渣中蛋白质的最优工艺条件为: TCA 的质量分数为 20%、水解液 pH 为 3.0、沉淀时间为 10 h 和离心转速为 10 000 r·min⁻¹; 此条件下的预测蛋白质沉淀率为 89.5%, 实际蛋白质沉淀率为 89%。该研究结果可为菌渣蛋白质高效回收提供参考。

关键词 青霉素菌渣; 嗜热菌; 蛋白质沉淀分离; 三氯乙酸

我国是世界上抗生素生产、消费和出口大国, 年产量约占世界总产量的 70%^[1-2]。在生产抗生素的过程中, 会产生大量的抗生素菌渣。据估算, 每生产 1 t 抗生素, 约产生 8~10 t 的抗生素菌渣, 我国每年产生的抗生素菌渣约为 2×10⁶ t, 产量巨大^[3-4]。抗生素菌渣主要由剩余培养基、残留的抗生素、微生物代谢产物以及发酵菌丝体组成。其中, 残留的抗生素会对生态环境和人群健康造成潜在的危害^[5-6]。根据我国 2020 年发布的《国家危险废物名录》^[7], 抗生素菌渣属于化学原料药生产过程中产生的废弃物及中间体, 全过程须按危险废物进行管理, 不可随意处置。抗生素菌渣处理技术有焚烧、填埋、堆肥等。这些处理技术存在不能完全消除菌渣危害、成本高、会造成二次污染等问题。抗生素菌渣中含有丰富的蛋白质, 是一种潜在的生物质能, 如能将其回收利用, 可较好地实现菌渣中氮源的资源化^[8-9]。

菌渣中蛋白质的回收主要包括菌渣中蛋白质溶出和菌渣水解液中蛋白质的分离纯化 2 个过程。由于菌渣的蛋白质主要存在于菌丝体中, 为了获得更多的蛋白质, 就需要对菌渣进行水解^[10-11]。常用的菌渣水解方法有物理法 (热水解、超声波、高压均质等)、化学法 (酸碱处理、臭氧氧化处理等) 和生物法 (酶制剂和嗜热溶胞法)。与化学、物理水解技术相比, 生物法中的嗜热溶胞法是利用

收稿日期: 2020-12-15; 录用日期: 2021-02-01

基金项目: 河北省重点研发计划项目 (19273809D); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (51708170); 河北省人才工程培养资助项目 (A201901043)

优势嗜热溶胞菌分泌的胞外酶(蛋白酶和淀粉酶)进行生物溶胞作用,使菌渣中的有机物溶出。该方法具有操作简单、经济环保和水解效果好等优点^[12-14]。菌渣经水解后,需要从混合溶液中进一步沉淀分离出蛋白质。常用的蛋白质沉淀分离方法有等电点沉淀法、盐析法、有机溶剂沉淀法、非离子多聚物沉淀法等^[15-17]。

本实验采用嗜热溶胞法水解青霉素菌渣,以青霉素菌渣水解液为研究对象,采用等电点沉淀法、盐析法(硫酸铵)、有机溶剂沉淀法(乙醇、丙酮)、选择性变性沉淀法(TCA)和非离子多聚物沉淀法(聚乙二醇)对水解液沉淀分离,并通过比较不同沉淀法的蛋白质沉淀率,选出最优的蛋白质沉淀法;然后对最优沉淀法进行单因素实验,以确定蛋白质沉淀率的影响因素及取值范围;之后,用响应曲面法选取最优沉淀法分离蛋白质的最佳工艺条件;最后,用最优工艺条件对青霉素菌渣水解液进行蛋白质分离实验验证。本实验研究结果可为菌渣的资源化处理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验原料

青霉素菌渣取自石家庄某制药厂。其主要理化性质见表1。

表1 青霉素菌渣理化性质
Table 1 Physical and chemical properties of penicillin bacteria residue

pH	含水率/%	SCOD/(g·L ⁻¹)	TCOD/(g·L ⁻¹)	TSS/(g·L ⁻¹)	VSS/(g·L ⁻¹)	氨氮/(g·L ⁻¹)	蛋白质/(g·L ⁻¹)
4.62	91.61	40.87	118.40	60.73	57.57	7.47	22.96

嗜热溶胞菌是从混合堆肥基质中分离出的嗜热菌DF7(保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏号:CGMCC No.16459)。该菌属嗜热芽孢杆菌(*Bacillus thermophilus*)属,革兰氏染色呈阳性;呈细杆状、产芽孢、能够分泌蛋白酶和淀粉酶;最适生长温度为60℃、最适生长pH为7.0。

1.2 实验方法

1) 蛋白质的溶出。取一定量的青霉素菌渣于1 000 mL的锥形瓶中,调节pH至7.0后,添加15%的嗜热菌(体积分数),于60℃恒温振荡培养12 h;然后,再将其在5 000 r·min⁻¹转速下离心10 min,离心清液为水解液。水解液中蛋白质的质量浓度为62.22 g·L⁻¹,pH为6.72。

2) 蛋白质沉淀法的筛选。采用等电点沉淀法、硫酸铵沉淀法、乙醇沉淀法、丙酮沉淀法、TCA沉淀法和聚乙二醇沉淀法对青霉素菌渣中蛋白质进行沉淀分离,根据蛋白质的沉淀效果,确定最优沉淀方法。

分别取20 mL水解液,用NaOH或HCl调节水解液pH为1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、6.5、7.5和8.5,静置8 h。分别取20 mL水解液,然后加入硫酸铵,使其饱和度为30%、40%、50%、60%、70%、80%和90%,静置8 h。分别取20 mL水解液,然后加入一定量的乙醇/丙酮/TCA/聚乙二醇,使其与水解液的体积比为1:2、3:4、1:1、5:4和3:2,静置8 h。对沉淀后的水解液进行离心,取上清液测蛋白质浓度,计算蛋白质沉淀率。

3) 蛋白质沉淀法的优化实验。对筛选出的沉淀法进行单因素实验,以确定蛋白质沉淀率的影响因素及取值范围,然后以蛋白质沉淀率为响应值,进行响应曲面优化实验;再用Design-Expert软件对实验数据进行分析,预测沉淀蛋白质的最优条件。

4) 验证实验。用模型预测的最优工艺条件对青霉素菌渣水解液进行3次蛋白质分离实验,取平均值,与预测值进行比较,以验证模型的可靠性。

1.3 分析方法

TSS、VSS用重量法测定;TCOD、SCOD用重铬酸钾法测定;氨氮用纳氏试剂分光光度法测

定；蛋白质浓度用福林酚试剂法测定，采用 (1) 式计算蛋白质沉淀率。

$$\text{蛋白质沉淀率} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中： C_1 为水解液中蛋白质浓度， $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ； C_2 为沉淀后水解液中蛋白质浓度， $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 不同沉淀法对蛋白质沉淀率的影响

由图 1(a) 可知，当水解液 pH 为 3.5 时，蛋白质的沉淀率最大为 60.67%。蛋白质水溶液呈两性电离状态。改变水溶液 pH 会使蛋白质的电荷性质发生改变，从而使蛋白质的溶解度下降，进而使

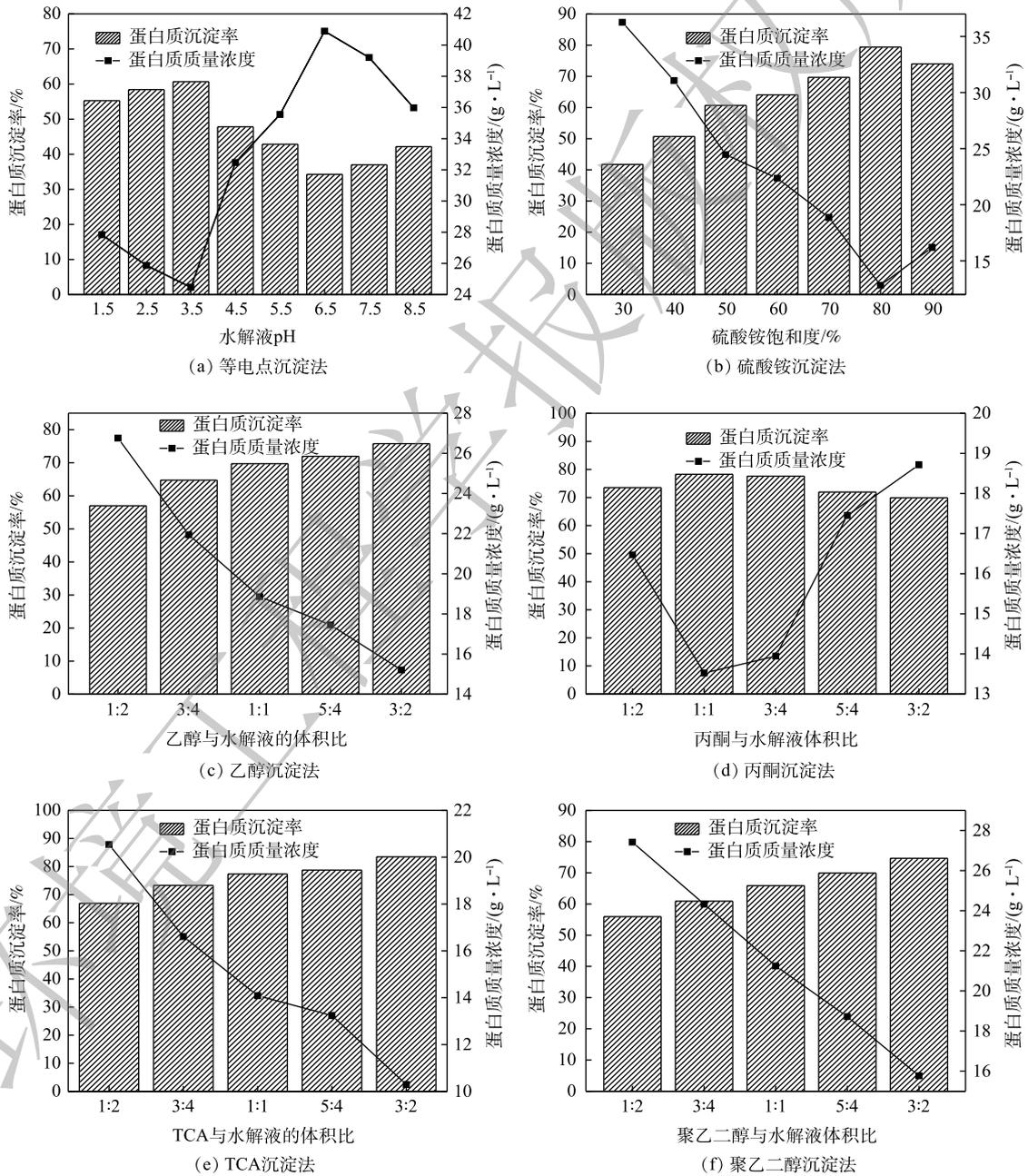


图 1 不同沉淀法对蛋白质沉淀率的影响

Fig. 1 Effects of different precipitation methods on protein precipitation rate

蛋白质沉淀析出。当达到等电点时,蛋白质净电荷为零,蛋白质分子间的电荷排斥力消失,蛋白质的溶解度最低,沉淀效果最好^[11,18]。

由图 1(b)可知,蛋白质的沉淀率随硫酸铵饱和度的增加呈先上升后下降的趋势。其原因是,硫酸铵能够压缩蛋白质周围的溶剂化层,使蛋白质表面疏水相互作用增大,从而使蛋白质聚集沉淀。当盐浓度比较高时,会产生共沉淀现象,导致蛋白质的沉淀率下降^[19]。因此,当硫酸铵饱和度为 80% 时,蛋白质沉淀率最大,为 79.39%。

由图 1(c)可知,随着乙醇体积的增大,蛋白质沉淀率逐渐升高,当体积比为 3:2,蛋白质沉淀率最大为 75.78%。由图 1(d)可知,随着丙酮体积增大,蛋白质沉淀率呈现先增大后下降的趋势;当体积比为 1:1 时,蛋白质沉淀率最大为 78.27%。这是因为,乙醇和丙酮属于有机溶剂,会降低蛋白质水溶液介电常数,蛋白质之间静电引力变大,从而使蛋白质聚集沉淀^[16]。

由图 1(e)可知,蛋白质沉淀率随着 TCA 体积的增大,蛋白质沉淀效率呈上升趋势。当 TCA 与水解液体积比为 3:2 时,蛋白质沉淀率最大为 83.45%。其原因是,TCA 能与蛋白质形成不溶性盐,从而使蛋白质构象发生改变,暴露出较多的疏水性基团,从而使蛋白质聚集沉淀^[20]。

由图 1(f)可知,随着聚乙二醇体积的增大,蛋白质沉淀率越来越大,当聚乙二醇与水解液的体积比为 3:2 时,蛋白质沉淀率最大为 74.66%。这是因为,聚乙二醇能使蛋白质分子水合膜脱水,改变蛋白质的介电常数,从而导致蛋白质分子亲水基的位阻关系发生改变,最终使蛋白质沉淀^[21]。

2.2 不同沉淀法中蛋白质沉淀率的比较

由图 2 可知,蛋白质沉淀率的排序为:TCA 沉淀法>硫酸铵沉淀法>丙酮沉淀法>乙醇沉淀法>聚乙二醇沉淀法>等电点沉淀法。等电点沉淀法操作简单,但是沉淀能力不强,常与其它沉淀法结合使用。硫酸铵盐析法操作简便,但纯度较低,沉淀剂不易脱除,常用于粗蛋白的分离。乙醇和丙酮沉淀属于有机溶剂沉淀法,分辨能力高,溶剂易脱除,但易引起蛋白质变性,并且操作要求在低温下进行。聚乙二醇沉淀法沉淀效果较好,但沉淀剂比较难去除^[16]。相比之下,TCA 沉淀法对蛋白质的沉淀效果最好;故下一步研究采用 TCA 沉淀法来分离青霉素菌渣中的蛋白质。

2.3 TCA 沉淀法的单因素实验结果

TCA 的质量分数、水解液 pH、沉淀时间、离心转速对蛋白质沉淀率的影响如图 3 所示。由图 3(a)可知,随 TCA 质量分数的增大,蛋白质的沉淀率呈先上升后出现略微下降的趋势。其原因是,TCA 是有机酸,随着 TCA 质量分数的增大,会使水解液中的酸性逐渐加强,蛋白质可能会在适宜的酸性条件下水解,从而使蛋白质沉淀率降低。

由图 3(b)可知,随着水解液 pH 的增大,蛋白质的沉淀率呈现先上升后下降的趋势;pH 在 3.5 时蛋白质的沉淀率达到峰值。这是因为,蛋白质沉淀和变性关系密切,但是变性的蛋白质不一定沉淀,变性蛋白质只有在等电点附近才可以沉淀^[17]。因此,水解液 pH 对蛋白质沉淀率有一定的影响。

由图 3(c)可知,当沉淀时间小于 10 h 时,蛋白质的沉淀率明显上升;当沉淀时间大于 10 h 时,蛋白质的沉淀率变化不大,所以沉淀时不宜太长。

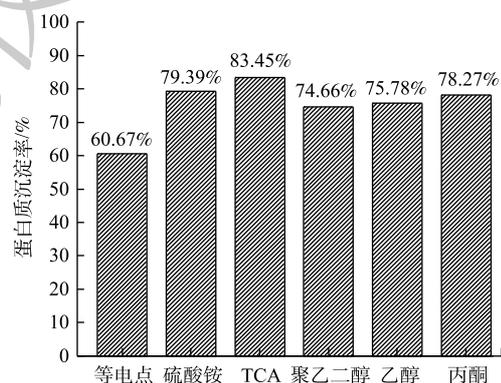


图 2 不同沉淀方法蛋白质沉淀率的比较

Fig. 2 Comparisons of protein precipitation rates by different precipitation methods

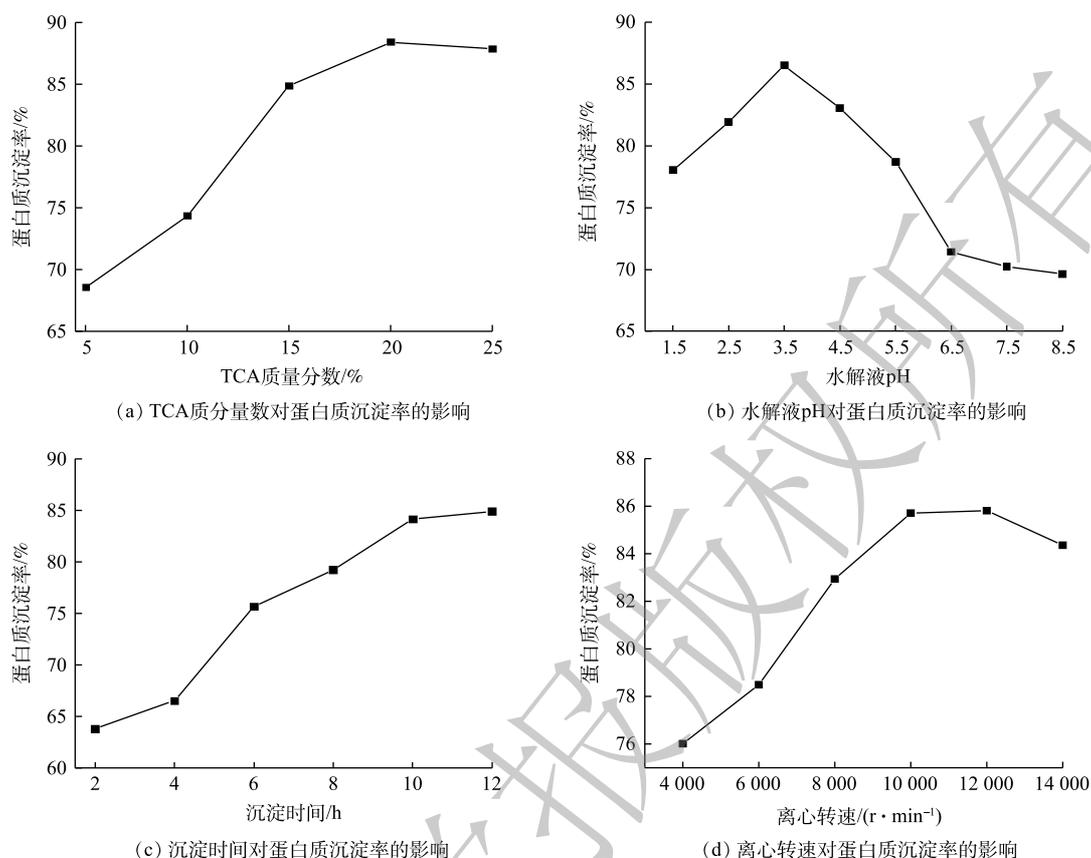


图3 不同因素对蛋白质沉淀率的影响

Fig. 3 Influences of different factors on protein precipitation rate

由图3(d)可知,随着离心转速的增加,蛋白质的沉淀率呈先上升后下降的趋势,当离心转速为 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时蛋白质的沉淀率最高。

综上所述,在响应曲面优化实验中,TCA的质量分数取15%、20%和25%,水解液pH取2.5、3.5和4.5,沉淀时间取8、10和12 h,离心转速取8 000、10 000和 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.4 基于响应曲面法优化蛋白质沉淀实验

1) 实验设计结果及回归模型分析。以蛋白质沉淀率作为响应值,TCA质量分数(A)、水解液pH(B)、沉淀时间(C)、离心转速(D)为自变量,进行响应曲面优化实验,实验设计及结果如表2所示。用Design Expert对表2所列实验结果进行分析,得到的回归方程如式(2)所示。

$$\text{蛋白质沉淀率} = 89.5 + 4.22A + 1.38B + 1.47C + 0.28D - 0.1AB - 0.97AC - 0.5AD - 1.50BC + 0.25BD + 0.025CD - 8.23A^2 - 4.89B^2 - 2.47C^2 - 0.63D^2. \quad (2)$$

由表3可知, F 为63.86, $P < 0.000\ 1$,这说明回归方程是显著的; $R^2 = 0.984\ 6 > 0.9$,这说明该模型与实验结果拟合良好;决定系数 $R^2_{\text{Adj}} = 0.969\ 2$,这说明该模型能够解释96.92%的响应值变化,模型具有较好的回归性。信噪比 $\text{Adeq Precision } 27.522 > 4$,这表明方程的拟合度和可信度极高;失拟项($P > 0.05$)不显著,这说明实验误差很小。通过比较 F 值得各因素对蛋白质沉淀率影响次序为:TCA质量分数>沉淀时间>水解液pH>离心转数。

2) 响应曲面分析。响应曲面的坡度和等高线的形状可反映各因素之间交互作用的强弱。响应曲面坡度陡峭且等高线形状是椭圆形说明各因素之间交互作用明显,反之不明显。用Design expert软件作响应曲面图和等高线图,见图4~图9。

表2 实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results

实验号	A	B	C	D	蛋白质沉淀率/%
1	25	3	10	12 000	84.2
2	15	3	12	10 000	78.1
3	20	4	10	8 000	84.9
4	20	4	8	10 000	83.4
5	20	3	8	12 000	86.3
6	25	3	8	10 000	81.8
7	15	4	10	10 000	73.7
8	20	3	10	10 000	87.9
9	20	2	12	10 000	83.7
10	20	3	10	10 000	90.5
11	15	3	10	8 000	75.9
12	25	3	10	8 000	84.9
13	20	4	12	10 000	83.3
14	20	3	10	10 000	89.5
15	15	3	8	10 000	71.3
16	20	2	10	8 000	83.1
17	15	3	10	12 000	77.2
18	20	3	12	12 000	87.4
19	20	2	8	10 000	77.8
20	25	4	10	10 000	82.3
21	20	3	10	10 000	89.8
22	15	2	10	10 000	70.1
23	20	3	12	8 000	86.3
24	20	2	10	12 000	82.9
25	25	3	12	10 000	84.7
26	20	3	10	10 000	89.8
27	20	4	10	12 000	85.7
28	20	3	8	8 000	85.3
29	25	2	10	10 000	79.1

表3 蛋白质沉淀率回归方程模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression equation model of protein precipitation rate

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F	P
模型	809.10	14	57.79	63.86	<0.000 1
A	214.21	1	214.21	236.71	<0.000 1
B	22.96	1	22.96	25.38	0.000 2
C	25.81	1	25.81	28.52	0.000 1
D	0.91	1	0.91	1.00	0.333 6
AB	0.040	1	0.040	0.044	0.836 5
AC	3.80	1	3.80	4.20	0.059 6
0AD	1.00	1	1.00	1.11	0.311 0
BC	9.00	1	9.00	9.95	0.007 0
BD	0.25	1	0.25	0.28	0.607 4
CD	0.002 5	1	0.002 5	0.002 763	0.958 8
A ²	439.26	1	439.26	485.40	<0.000 1
B ²	155.21	1	155.21	71.52	<0.000 1
C ²	39.47	1	39.47	43.61	<0.000 1
D ²	2.57	1	2.57	2.84	0.114 2
残差	12.67	14	0.90		
失拟项	8.93	10	0.89	0.95	0.569 4
纯误差	3.74	4	0.93	63.86	
总计	821.77	28			

由图4可知,响应曲面中蛋白质沉淀随着TCA的质量分数和水解液pH的增大呈先上升后下降的趋势,曲面中心较高,其他位置较低,且等高线的形状接近圆形。这说明,TCA的质量分数和水解液pH交互作用不明显。

由图5可知,随着TCA的质量分数和沉淀时间的增加,蛋白质沉淀率呈上升的趋势,且等高线的形状接近椭圆形。这说明,TCA的质量分数与沉淀时间交互作用明显。这是因为,TCA能够使蛋白质构象发生改变,从而使蛋白质沉淀,TCA使蛋白质变性需要一定反应时间,变性蛋白质才能充分的析出。

由图6响应面可知,随着TCA质量分数的增加,蛋白质沉淀率呈上升趋势;而离心转速增加蛋白质的沉淀率并没有明显的变化。这说明,离心转速对蛋白质的沉淀率的影响较小。由响应曲面图和等高线图可知,TCA质量分数与离心转速对蛋白质沉淀率交互作用不明显。

由图7可知,随着沉淀时间的增加蛋白质沉淀率呈上升的趋势,随着水解液pH的增加蛋白质沉淀率呈先上升后趋于平缓的趋势,且响应曲图中曲面整体左后角较高,其他位置较低,其等高线比较密集且形状为椭圆形。这说明,水解液pH与沉淀时间对蛋白质沉淀率交互作用显著。这是因为,蛋白质是两性物质,调节水解液pH,可改变蛋白质的电荷性质,使分子间的引力增大,使蛋白质的溶解度降低,从而使蛋白质聚集沉淀。蛋白质沉淀析出需要时间一定的,所以水解液pH与沉淀时间对蛋白质沉淀率交互作用显著。

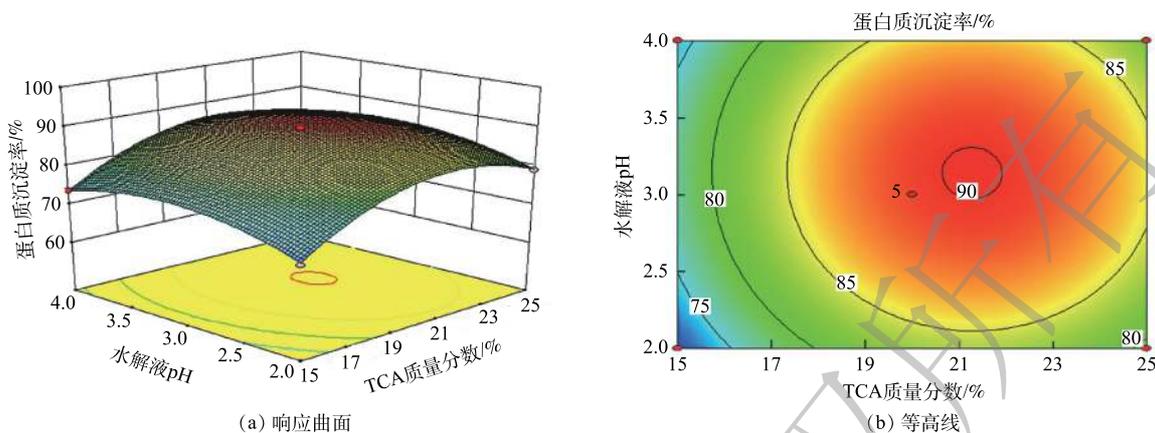


图 4 TCA 质量分数与水解液 pH 对蛋白质沉淀率的影响

Fig. 4 Influences of TCA mass fraction and hydrolysate pH on protein precipitation rate

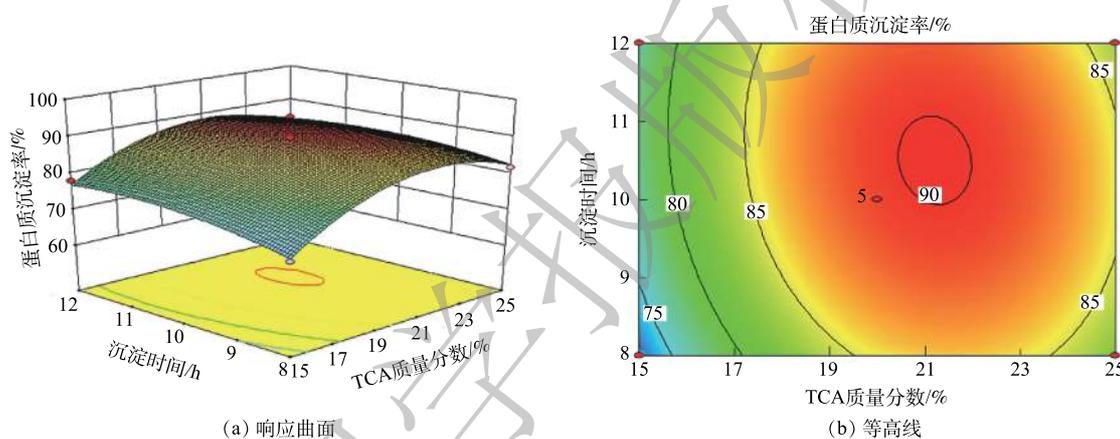


图 5 TCA 质量分数与沉淀时间对蛋白质沉淀率的影响

Fig. 5 Influences of TCA mass fraction and precipitation time on protein precipitation rate

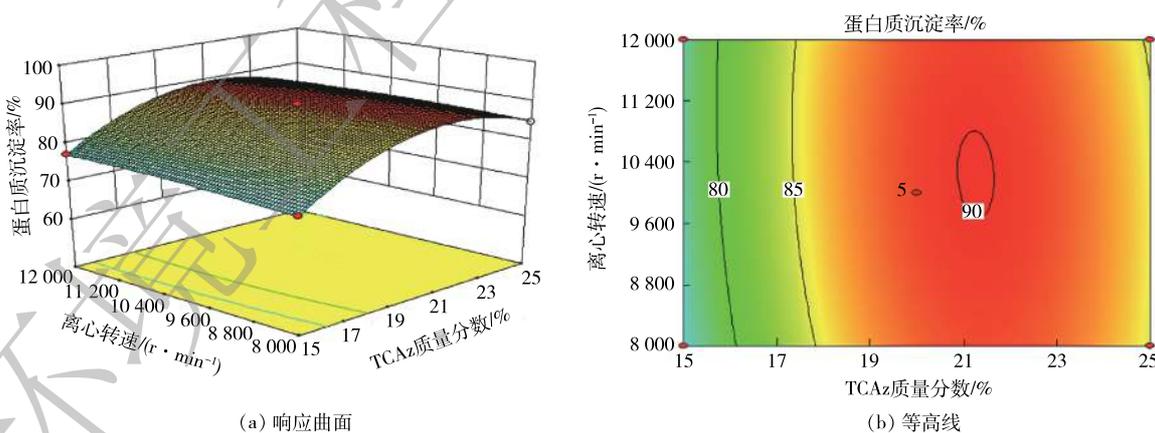
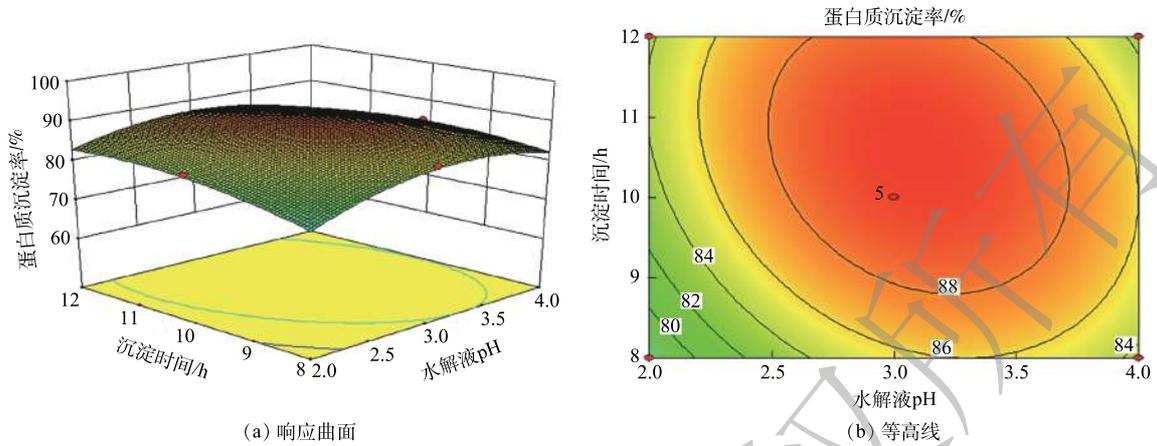


图 6 TCA 质量分数与离心转速对蛋白质沉淀率的影响

Fig. 6 Influences of TCA mass fraction and centrifugation revolution on protein precipitation rate

由图 8 可知，蛋白质沉淀率随着水解液 pH 的增加略微上升，而随着离心转速的增大，蛋白质沉淀率变化不大，且响应面曲面坡度趋于平缓。这说明，水解液 pH 和离心转速之间交互作用不明显。

图 9 响应曲面图中曲面接近平面，随着沉淀时间和离心转速的增加蛋白质沉淀率没有明显变化。这说明，沉淀时间与离心转速之间交互作用不明显。

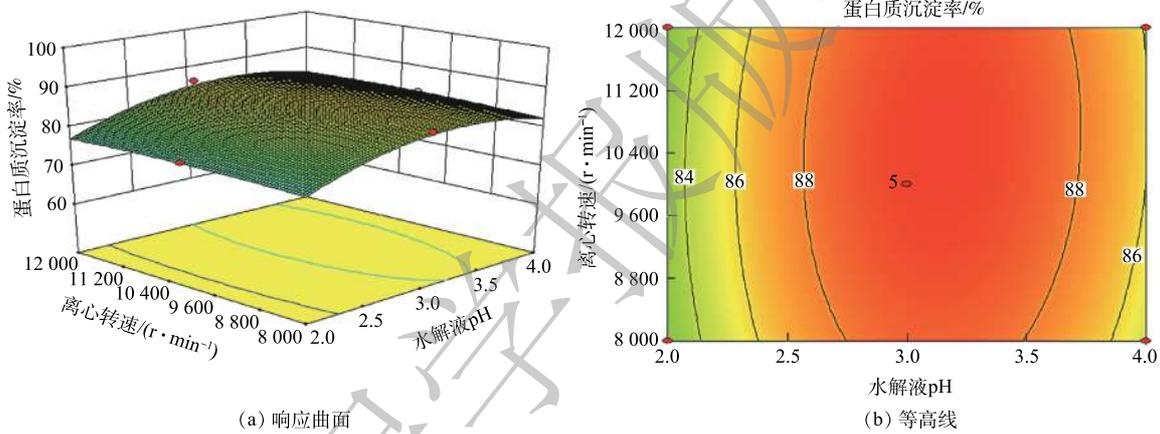


(a) 响应曲面

(b) 等高线

图 7 水解液 pH 与沉淀时间对蛋白质沉淀率的影响

Fig. 7 Influences of pH of hydrolysate and precipitation time on protein precipitation rate

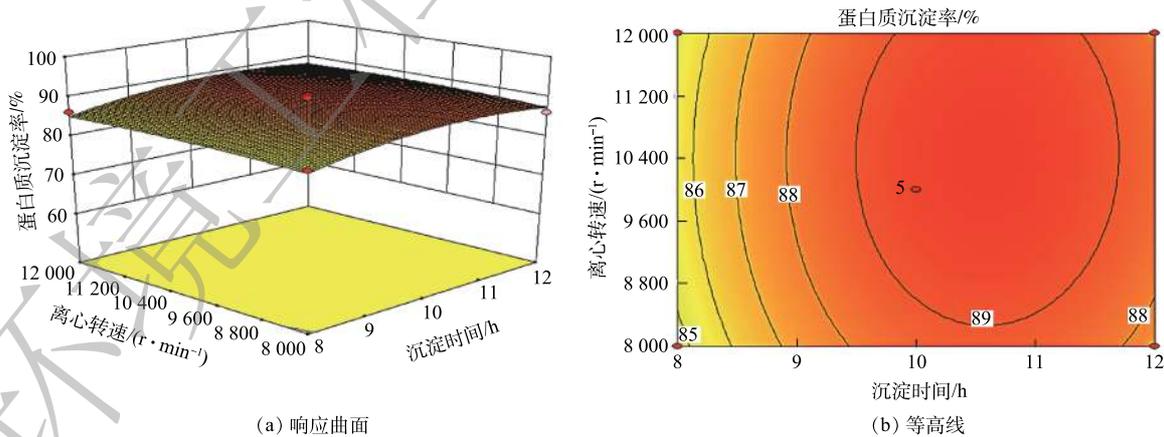


(a) 响应曲面

(b) 等高线

图 8 水解液 pH 与离心转速对蛋白质沉淀率的影响

Fig. 8 Influences of hydrolysate pH and centrifugation revolutions on protein precipitation rate



(a) 响应曲面

(b) 等高线

图 9 沉淀时间与离心转速对蛋白质沉淀率的影响

Fig. 9 Influences of precipitation time and centrifugation revolution on protein precipitation rate

综合上述信息可知，TCA 的质量分数与沉淀时间和水解液 pH 与沉淀时间对蛋白质沉淀率的交互作用显著，与模型分析结果一致。

2.5 验证实验

利用 Design Expert 软件对实验条件进行预测, 得出的最优条件为: TCA 质量分数为 20%、水解液 pH 为 3.0、沉淀时间为 10 h、离心转速为 $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 蛋白质沉淀率为 89.5%。为了验证该模型的准确性, 用模型预测的最优条件对青霉素菌渣水解液进行 3 次蛋白质分离实验, 测得蛋白质沉淀率的平均值为 89%。该结果与预测值相差 0.5%, 表明预测模型与实际情况拟合较好, 说明响应曲面法模拟得到的优化条件准确可靠。

3 结论

1) TCA 沉淀法对青霉素菌渣中蛋白质的沉淀分离效果最好, 要优于等电点沉淀法、硫酸铵沉淀法、乙醇沉淀法、丙酮沉淀法和聚乙二醇沉淀法。

2) TCA 沉淀法中各因素对蛋白质沉淀率影响次序为: TCA 质量分数>沉淀时间>水解液 pH>离心转速。

3) TCA 沉淀法对青霉素菌渣中蛋白质沉淀分离的最佳工艺条件为: TCA 质量分数为 20%、水解液 pH 为 3.0、沉淀时间为 10 h、离心转速为 $10\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$; 此条件下的蛋白质沉淀率为 89.5%。

4) 最优条件下对青霉素菌渣进行蛋白质分离实验得到的蛋白质的沉淀率与响应曲面的预测值接近, 表明响应曲面法模拟得到的优化条件准确可靠。

参 考 文 献

- [1] SHEN Y P, ZHUAN R, CHU L B, et al. Inactivation of antibiotic resistance genes in antibiotic fermentation residues by ionizing radiation: Exploring the development of recycling economy in antibiotic pharmaceutical factory[J]. *Waste Management*, 2019, 84: 141-146.
- [2] HU J, HONG C, LI Z, et al. Nitrogen release of hydrothermal treatment of antibiotic fermentation residue and preparation of struvite from hydrolysate[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 713: 135174.
- [3] HU Y M, SHEN Y P, WANG J L. Pretreatment of antibiotic fermentation residues by combined ultrasound and alkali for enhancing biohydrogen production[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 268: 122190.
- [4] CAI C, HUA Y, LI H P, et al. Hydrothermal treatment of erythromycin fermentation residue: Harmless performance and bioresource properties[J]. *Resources, Conservation and Recycling*, 2020, 161: 104952.
- [5] YANG G, WANG J L, SHEN Y P. Antibiotic fermentation residue for biohydrogen production using different pretreated cultures: Performance evaluation and microbial community analysis[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 292: 122012.
- [6] LIAO H, ZHAO Q, CUI P, et al. Efficient reduction of antibiotic residues and associated resistance genes in tylosin antibiotic fermentation waste using hyperthermophilic composting[J]. *Environment International*, 2019, 133: 105203.
- [7] 环境保护部, 国家发展和改革委员会. 国家危险废物名录[S]. 北京: 环境保护部, 国家发展和改革委员会, 2020.
- [8] 李再兴, 田宝阔, 左剑恶, 等. 抗生素菌渣处理处置技术进展[J]. *环境工程*, 2012, 30(2): 72-75.
- [9] 公丕成, 蔡辰, 张博, 等. 我国抗生素菌渣资源化研究新进展[J]. *环境工程*, 2017, 35(5): 107-111.
- [10] 闫怡新, 秦磊, 高健磊. 剩余污泥提取蛋白质工艺研究进展[J]. *环境工程*, 2019, 37(6): 146-149.
- [11] 施正华, 李秀芬, 宋小莉, 等. 采用等电点沉淀法回收市政污泥水解液中的蛋白质[J]. *环境工程学报*, 2016, 10(10): 5919-5923.
- [12] 李业云, 张婷, 景凌云. 剩余污泥源头减量化技术研究进展[J]. *应用化工*, 2019, 48(11): 2708-2713.
- [13] GAO P T, GAO L, SUN J, et al. Enhancing the hydrolysis of saline waste sludge with thermophilic bacteria pretreatment: New insights through the evolution of extracellular polymeric substances and dissolved organic matters transformation[J]. *Science*

of the Total Environment, 2019, 670: 31-40.

- [14] 宁高阳. 土霉素菌渣的减量化及菌渣溶液的生物处理研究[D]. 兰州: 兰州交通大学, 2020.
- [15] XIAO K, ZHOU Y. Protein recovery from sludge: A review[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 249: 119373.
- [16] 王敏慧, 唐珊, 刘海龙. 豆制品废水中蛋白质的沉淀分离[J]. *山西科技*, 2014, 29(1): 77-80.
- [17] LIU S, LI Z, YU B, et al. Recent advances on protein separation and purification methods[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2020, 284: 102254.
- [18] 张益奇, 陈康, 周龙锡, 等. 水产加工废水蛋白质的回收及再利用研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(23): 198-203.
- [19] PEI K Y, XIAO K K, HOU H J, et al. Improvement of sludge dewaterability by ammonium sulfate and the potential reuse of sludge as nitrogen fertilizer[J]. *Environmental Research*, 2019, 670: 31-40.
- [20] 刘肖肖, 樊新顺, 施东青, 等. 三氯乙酸法测定烟叶中蛋白质含量[J]. *化学研究*, 2018, 29(5): 484-487.
- [21] 闻崇炜, 赵焯清, 石莉, 等. 聚乙二醇沉淀蛋清蛋白质的规律及在卵白蛋白分离中的应用[J]. *食品科学*, 2018, 39(1): 29-35.
- (责任编辑: 金曙光)

Proteins from penicillin residue were isolated by trichloroacetic acid precipitation method

ZHONG Weizhang^{1,2}, YANG Ke^{1,2}, HONG Chen³, XU Bin^{1,2}, FENG Weibo^{1,2}, CHEN Sainan^{1,2}, LI Yue^{1,2}, LI Zaixing^{1,2,*}

1. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China
2. Pollution Prevention Biotechnology Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang 050018, China
3. Beijing Key Laboratory of Resource Oriented Treatment of Industrial Pollutants, School of Energy and Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

*Corresponding author, E-mail: li_zaixing@163.com

Abstract In order to solve the problem of protein recovery from antibiotic residue, different precipitation methods were used to separate protein from penicillin residue. Firstly, the effects of different precipitation methods on protein precipitation were investigated, and the optimal protein precipitation method was selected. Then, the single factor experiment and response surface experiment were carried out to optimize the process parameters of the optimal precipitation method for the separation of proteins from penicillin residue. Finally, proteins were isolated from penicillin residue under optimum conditions. The results showed that the best precipitation effect was obtained by trichloroacetic acid (TCA) precipitation method. The optimal extraction conditions were: mass fraction of TCA was 20%, pH of hydrolysate was 3.0, precipitation time was 10 h and centrifugation rotation was 10 000 r·min⁻¹. Under these conditions, the precipitation rate of protein was 89.5%. Under the optimal conditions, the protein precipitation rate is 89%, and the experimental value is in good agreement with the predicted value, so that the optimal protein precipitation method can be obtained. This study can provide reference for protein recovery from fungus residue.

Keywords penicillium residue; thermophilic bacteria; protein precipitation separation; trichloroacetic acid