

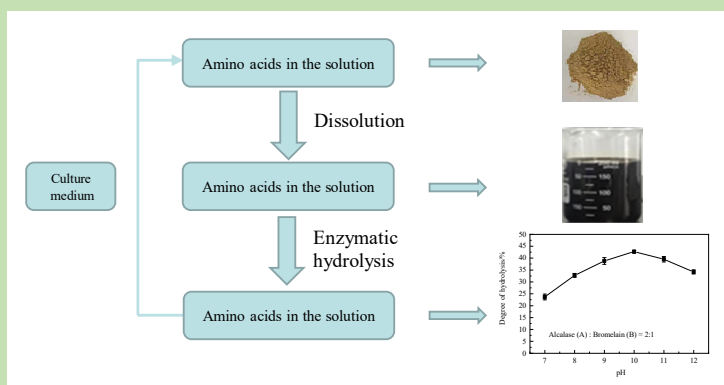
Enzymatic hydrolysis of penicillin mycelium protein

Zhan'ao ZHANG^{1,2}, Qingfen LIU^{1*}

1. CAS Key Laboratory of Green Process and Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

2. School of Chemical Engineering, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: More than 2000000 tons of antibiotics fermentation residues (AFRs) were produced in China every year, which were hazardous solid waste, and how to safely dispose of them is attracting attention. AFRs are rich in organic substances, such as protein and carbohydrates, which accounts for about 50% of dry penicillin AFRs. So it is significant to develop new methods for recycling and utilization of mycelium protein in AFRs. In this work, penicillin mycelium was



dissolved by alkali-thermal method, and penicillin mycelium protein solution was prepared, and then enzymatic hydrolysis performance of penicillin mycelium protein was explored in this solution using enzyme as catalyst, such as alcalase (A), bromelain (B), neutrase (C), and acid protease (D). The effects of types of enzymes, pH of the solution, the ratio of enzyme to protein, reaction temperature and time on protein hydrolysis process were systematically studied, and an optimization scheme was proposed. In a single enzyme-catalyzed hydrolysis process, alcalase showed the optimal performance, the hydrolysis degree of protein reached 31.43% at following conditions, the mass ratio of alcalase to protein as 6%, pH=11, the reaction time of 3 h and temperature of 50 °C. In the complex enzyme-catalyzed hydrolysis process, the mixture of alcalase and bromelain as catalysts was demonstrated got the best efficiency. The optimum parameters were as follows: the mass ratio of complex enzyme to protein was 9% (A:B=2:1), pH=10, the reaction time of 3 h and temperature of 50 °C. Under these optimal conditions, the protein hydrolysis degree reached 42.73%, which was 11.30 percentage points higher than the best single-enzyme method. The high performance liquid chromatography (HPLC) analysis found the enzymatic hydrolysate contained 16 amino acids, such as glutamic acid, aspartic acid, glycine, leucine and alanine, the ratio was 15.47wt%, 11.94wt%, 9.41wt%, 9.23wt%, 9.22wt%, respectively. This work provides a high efficient enzyme-catalyzed hydrolysis method of penicillin mycelium protein for preparing amino acids, and to carry out utilization of penicillin mycelium protein in AFRs.

Key words: penicillin mycelium; protein; enzyme catalysis; degree of hydrolysis; amino acid

收稿: 2020-04-07, 修回: 2020-05-22, 网络发表: 2020-06-01, Received: 2020-04-07, Revised: 2020-05-22, Published online: 2020-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 21676272); 水体污染控制与治理科技重大专项(编号: 2017ZX07402003); 石家庄市科学技术研究与发展计划(编号: 191240104A)

作者简介: 张展敖(1995-), 男, 辽宁省沈阳市人, 硕士研究生, 化学工程专业, E-mail: zhangzhanao@ipe.ac.cn; 刘庆芬, 通讯联系人, E-mail: qfliu@ipe.ac.cn.

引用格式: 张展敖, 刘庆芬. 青霉素菌丝中蛋白质酶法水解工艺. 过程工程学报, 2021, 21(4): 471-478.

Zhang Z A, Liu Q F. Enzymatic hydrolysis of penicillin mycelium protein (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2021, 21(4): 471-478, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.220122.

青霉素菌丝中蛋白质酶法水解工艺

张展教^{1,2}, 刘庆芬^{1*}

1. 中国科学院过程工程研究所绿色过程与工程重点实验室, 北京 100190

2. 中国科学院大学化学工程学院, 北京 100049

摘 要: 采用碱热法溶解青霉素菌丝, 研究酶法催化水解菌丝溶解液中蛋白质转化为氨基酸的过程。考察酶种类、溶解液 pH 值、酶与蛋白质质量比、反应温度和时间等因素对蛋白质水解度的影响, 建立最佳水解工艺。结果表明, 酶种类、酶与蛋白质之比、pH、温度和时间均对蛋白质水解过程产生影响。以单酶为催化剂, 碱性蛋白酶催化水解效果最好, 蛋白质水解度达 31.43%。以碱性蛋白酶(A)和菠萝蛋白酶(B)组成的复合酶(A:B=2:1)催化水解效果更好, 在复合酶与蛋白质的质量比 9%、pH=10、反应温度 50℃、反应时间 3 h 条件下, 蛋白质水解度达到 42.73%, 比单酶法提高了 11.30 个百分点。在最佳复合酶水解工艺下, 酶解液中含 16 种氨基酸, 主要有谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、亮氨酸和丙氨酸等氨基酸。本工作为抗生素菌丝作为发酵培养基循环利用提供了一条新途径。

关键词: 青霉素菌丝; 蛋白质; 酶催化; 水解度; 氨基酸

中图分类号: TQ465.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2021)04-0471-08

1 前 言

我国是世界上最大的抗生素生产国^[1], 国产抗生素产量约 21 万吨/年^[2]。发酵是生产抗生素的关键环节, 每生产 1 吨抗生素约产生 10 吨发酵菌渣, 我国每年约产生 200 多万吨抗生素发酵菌渣亟待处理^[3,4]。抗生素菌渣中富含蛋白质和葡聚糖等有机物质^[5], 其中蛋白质约占干重的 50%。抗生素菌渣被列为危险固体废弃物^[6,7], 原因是其中残留的抗生素可能诱发生耐药菌而威胁人类健康^[8,9], 为此, 抗生素菌渣的科学合理处置与利用是国内外关注的焦点。目前国内符合有关法规的抗生素菌渣处理方法只有焚烧法和规范填埋法^[10], 采用焚烧法和填埋法处理菌渣, 不仅导致菌渣中大量有机质的浪费, 而且还会产生严重的二次污染。因此研究抗生素菌渣中蛋白质循环化利用的新方法具有重要意义。

目前已有文献报道了发酵菌丝溶解过程, 酸热法^[11]、碱热法^[12]和离子液体^[13]等均能溶解抗生素菌渣, 但现有文献并未对溶解液中蛋白质利用开展相关研究。抗生素菌丝中虽含大量蛋白质, 但蛋白质等大分子在发酵过程中难以直接利用。而蛋白质的水解产物氨基酸是菌体生长的基本营养物质, 便于菌丝体生长过程中利用。本课题组提出了将抗生素菌渣溶解并进一步制备氨基酸和多肽等低分子营养物质用于发酵培养基循环利用的新思路, 实现抗生素菌渣厂内循环利用, 既避免了菌渣出厂对环境的污染, 又实现了菌丝中蛋白质等有机质的资

源化利用。目前尚未见到关于抗生素菌渣制备氨基酸等营养物质的研究。

目前, 已有食品行业对酶法水解蛋白质制备低分子多肽、氨基酸等营养物质的研究^[14,15]。Kristinsson 等^[16]采用商用碱性蛋白酶(Corolase 7089)水解三文鱼蛋白质, 在溶液 pH=7.5, 40℃下反应 3 h, 蛋白水解度达 14.39%。Ren 等^[17]采用风味蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶等水解大麻种子蛋白质, 得出碱性蛋白酶水解效果最好, 在溶液 pH=8.5, 60℃下反应 3 h, 蛋白质水解度达 27.24%。Noman 等^[18]采用木瓜蛋白酶水解中华鲟肌肉中的蛋白质, 系统考察了酶与底物质量比、温度、时间和 pH 等条件对酶水解过程的影响, 在固液混合比为 1:1、酶与底物比为 3%、溶液 pH=6、反应温度 70℃、反应时间 2 h 的条件下, 蛋白质水解度达 24.89%。Evangelho 等^[19]采用胃蛋白酶水解黑豆蛋白质, 在溶液 pH=2, 37℃下反应 2 h, 蛋白水解度达 27.7%。以上研究表明, 蛋白质水解程度受酶种类、溶解液 pH 值、酶与蛋白质质量比、反应温度和反应时间等因素影响。

目前尚未见到青霉素菌丝中蛋白质酶法水解的研究报道。本工作采用碱热法溶解青霉素菌丝, 获得菌丝溶解液, 研究了碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和酸性蛋白酶等单酶催化水解溶解液中菌丝蛋白质的过程, 考察了溶解液 pH、酶与蛋白质质量比、反应时间和温度等因素对单酶水解过程影响。在此基础上, 进一

步研究了复合酶催化水解菌丝蛋白质的水解过程,建立了菌丝蛋白质最佳水解工艺,并对水解液中氨基酸进行分析检测,为实现水解溶液作为发酵营养物质奠定基础。

2 实验

2.1 实验材料与试剂

青霉素菌渣(华北制药股份有限公司),碱性蛋白酶(工业级,邢台思倍特生物科技有限公司),中性蛋白酶和酸性蛋白酶(工业级,南宁东恒华道生物科技有限公司),菠萝蛋白酶(工业级,和氏璧生物技术有限公司),三氯乙酸、硼酸、溴甲酚绿、甲基红、硫酸铜、硫酸钾、正己烷(分析纯,北京化工厂),乙腈(色谱纯,美国 Thermo Fisher Scientific 公司),三乙胺(分析纯,天津市光复精细化工研究所),异硫氰酸苯酯(色谱纯,上海 Aladdin 公司),考马斯亮蓝 G-520 和牛血清白蛋白(分析纯, Sigma 公司),天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、组氨酸、精氨酸、苏氨酸、丙氨酸、脯氨酸、酪氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸(色谱纯, Sigma 公司)。

2.2 分析仪器

UH5300 紫外-可见分光光度计(日本日立有限公司), HI221 型 pH 酸度计(意大利 HANNA 公司), KDT-08A 定氮仪(上海精密仪器仪表有限公司), Agilent 1100 高效液相色谱仪(HPLC, 美国安捷伦公司)。

2.3 实验方法

青霉素菌丝溶解液制备:将 4wt% NaOH 溶液与干菌丝按质量比 7:1 于 70℃ 下溶解 30 min,反应结束后以 4000 r/min 离心 10 min,倾倒入上层清液,即青霉素菌丝溶解液。

溶解液中菌丝蛋白质酶法水解:取青霉素菌丝溶解液,用 1 mol/L NaOH 或 HCl 调节溶液 pH,按一定比例加入酶,于 20~60℃ 下反应 1~5 h,待反应结束后以 4000 r/min 离心 10 min,倾倒入上层清液,将上层清液在 100℃ 条件下灭活 15 min,采用三氯乙酸沉淀法^[18]计算蛋白质水解度 DH(%)^[20]。

$$DH = \frac{m_3 - m_2}{m_1 - m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中, m_1 , m_2 和 m_3 分别为反应前溶解液中总氮含量(mg)、催化反应前溶解液中加入 10wt% 三氯乙酸溶液处理得到的上层清液中总氮含量(mg, 4000 r/min 离心 10 min)、反应结束后溶解液中加入 10wt% 三氯乙酸溶液处理得到的上层清液中总氮含量(mg, 4000 r/min 离心 10

min),皆采用凯氏定氮法测定。

2.4 检测方法

菌丝溶解液中蛋白浓度测定:以考马斯亮蓝 G-250 溶液与牛血清白蛋白的标准曲线(595 nm)测定溶解液中蛋白质的含量。

考马斯亮蓝 G-250 溶液配置:用 50 mL 95vol% 乙醇溶解 100 mg 考马斯亮蓝 G-250,加入 1 L 容量瓶中,然后加入 100 mL 85wt% 磷酸溶液,再加蒸馏水定容至 1 L。将菌丝溶解液加入考马斯亮蓝 G-250 溶液中,混合均匀后,测量 595 nm 处吸光度以标定溶解液中蛋白质浓度。

采用 PITC 柱前衍生法检测溶解液的氨基酸^[21]。检测样品制备方法:菌丝溶解液在 120℃、6 mol/L 盐酸条件下酸解 24 h^[22]。将酸解液置于真空烘干箱中抽干脱酸,加入 0.02 mol/L 的盐酸溶液和 1 mol/L 三乙胺的乙腈溶液^[23],充分溶解。氨基酸标准样品制备:取已知浓度的 16 种氨基酸混合溶液,加入正己烷、1 mol/L 三乙胺的乙腈溶液、0.1 mol/L 异硫氰酸苯酯的乙腈溶液,混合均匀。用 HPLC 检测样品中的氨基酸组成和含量,C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 40℃,检测波长为 254 nm,流动相 A: 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液/乙腈(体积比 93:7),流动相 B: 乙腈/水(体积比 80:20),梯度洗脱(0~14 min, 100%→85% A; 14~29 min, 85%→66% A; 29~30 min, 66%→0 A; 30~37 min, 0 A; 37~37.1 min, 0→100% A; 37.1~45 min, 100% A),流速 1 mL/min,进样量 10 μL。

3 结果与讨论

3.1 单酶法催化水解菌丝蛋白质

以碱性蛋白酶(A)、菠萝蛋白酶(B)、中性蛋白酶(C)和酸性蛋白酶(D)等为催化剂,研究单酶催化水解溶解液中菌丝蛋白质的过程,以蛋白质水解度为指标,考察溶解液 pH 值、酶与蛋白质质量比、反应温度和反应时间等因素的影响,建立相应的酶法水解工艺。

3.1.1 反应时间的影响

在碱性蛋白酶溶解液 pH=11、菠萝蛋白酶溶解液 pH=8、中性蛋白酶溶解液 pH=7、酸性蛋白酶溶解液 pH=6,酶与蛋白质质量比为 10%,反应温度 50℃ 的条件下,考察反应时间对酶解溶液中菌丝蛋白质的影响。由图 1 可看出,随反应时间延长,蛋白质的水解度逐渐增加到最大,而后趋于平稳。这是因为菌丝溶解液中的蛋白质在酶催化作用下逐渐水解为多肽和氨基酸,当反应时间过短,蛋白质没有反应完全,导致蛋白质水解度

较低;随反应时间延长,有更多的蛋白质发生水解,从而出现蛋白质水解度逐渐增大并达到稳定值的趋势。在反应时间超过 3 h 后,菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和酸性蛋白酶催化菌丝蛋白质水解反应趋于稳定,在反应时间 3 h 时,蛋白质水解度分别为 17.42%, 12.51%, 9.07%;当反应时间继续延长至 4 h,蛋白质水解度没有明显变化;从提高反应效率方面考虑,菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和酸性蛋白酶的最佳反应时间为 3 h 均能获得较大的水解度。碱性蛋白酶催化菌丝蛋白质水解反应在 4 h 时水解度达到 31.43%,继续延长反应时间,水解度基本保持不变,因此碱性蛋白酶最佳催化反应时间为 4 h。

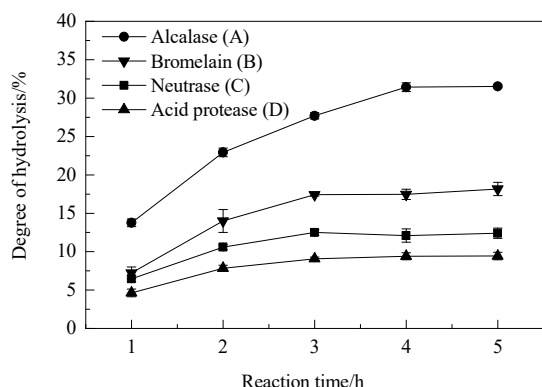


图 1 反应时间对青霉素菌丝蛋白质水解度的影响
Fig.1 Effect of reaction time on degree of hydrolysis of penicillin mycelium protein

3.1.2 反应温度的影响

在碱性蛋白酶溶解液 pH=11、菠萝蛋白酶溶解液 pH=8、中性蛋白酶溶解液 pH=7、酸性蛋白酶溶解液 pH=6, 酶与蛋白质质量比为 10%, 碱性蛋白酶反应 4 h, 中性蛋白酶、酸性蛋白酶和菠萝蛋白酶反应 3 h 的条件下, 考察反应温度对酶解溶液中菌丝蛋白质的影响。从图 2 可看出, 随反应温度升高, 溶解液中蛋白质的水解度呈先上升后下降的趋势。反应温度为 40℃时, 菠萝蛋白酶和中性蛋白酶对蛋白质水解度达最大值, 分别为 18.23%和 15.60%; 温度达 50℃时, 碱性蛋白酶和酸性蛋白酶对蛋白质水解度达最大值, 分别为 31.43%和 9.07%; 继续升高反应温度, 蛋白质水解度呈下降趋势。温度会影响酶催化的反应速度和酶自身的稳定性, 不同的酶有不同的最适反应温度范围。随反应温度升高, 逐渐接近酶的最适温度, 酶活性得到提高, 有利于蛋白质折叠结构的展开, 从而使蛋白质水解度增大。当反应温度超过酶最适温度会导致酶变性失活, 从而使蛋白质水解度降低。因此, 选定碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性

蛋白酶和酸性蛋白酶的最佳反应温度为 50, 40, 40, 50℃。

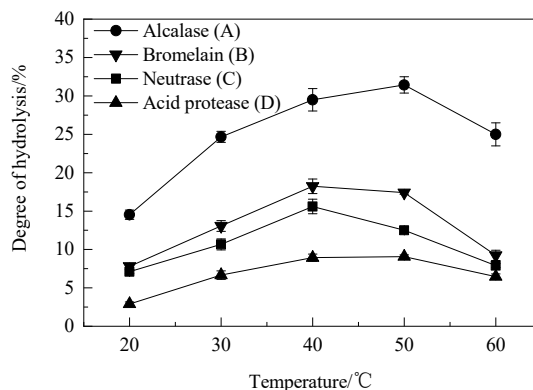


图 2 温度对青霉素菌丝蛋白质水解度的影响
Fig.2 Effect of reaction temperature on degree of hydrolysis of penicillin mycelium protein

3.1.3 酶与蛋白质质量比的影响

在碱性蛋白酶溶解液 pH=11、温度 50℃, 菠萝蛋白酶溶解液 pH=8、温度 40℃, 中性蛋白酶溶解液 pH=7、温度 40℃, 酸性蛋白酶溶解液 pH=6、温度 50℃, 碱性蛋白酶反应 4 h, 中性蛋白酶、酸性蛋白酶和菠萝蛋白酶反应 3 h 的条件下, 考察酶与蛋白质质量比对酶解菌丝蛋白质的影响。从图 3 中可以看出, 随酶与蛋白质质量比升高, 溶解液中蛋白的水解度呈先上升后平稳的趋势。酶与底物蛋白质质量比达 5%时, 中性蛋白酶和菠萝蛋白酶催化蛋白质水解度达 11.96%和 18.23%; 酶与底物蛋白质质量比达 6%时, 碱性蛋白酶催化蛋白质水解度达 31.43%; 酶与底物蛋白质质量比达 7%时, 酸性蛋白酶催化蛋白质水解度达 9.13%。实验结果表明, 当

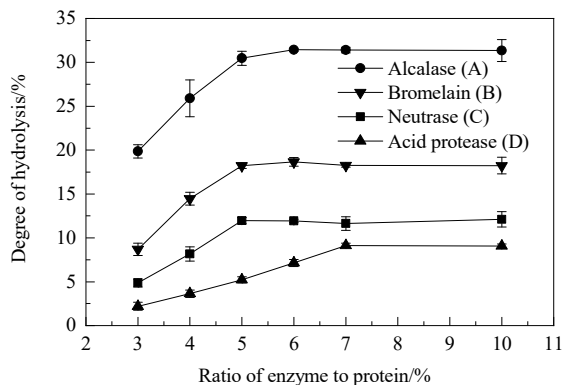


图 3 酶与蛋白质质量比对青霉素菌丝蛋白质水解度的影响
Fig.3 Effect of the mass ratio of enzyme to protein on degree of hydrolysis of penicillin mycelium protein

酶与蛋白质质量比较小时,提高酶量,有利于蛋白质发生水解,蛋白质水解度增大;当酶与蛋白质质量比达到一定程度时,蛋白质水解度已不随酶加入量增大而变化,反而增加酶解成本。因此,碱性蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶和菠萝蛋白酶的最佳酶与蛋白质质量比为 6%, 5%, 7%, 5%, 酶量达到以上值时,均能获得较大的水解度。

3.1.4 pH 的影响

在中性蛋白酶、菠萝蛋白酶反应温度 40℃,碱性蛋白酶、酸性蛋白酶反应温度 50℃,碱性蛋白酶、中性蛋白酶与蛋白质质量比 6%,酸性蛋白酶、菠萝蛋白酶与蛋白质质量比 7%,碱性蛋白酶反应 4 h,中性蛋白酶、酸性蛋白酶和菠萝蛋白酶反应 3 h 的条件下,考察溶解液 pH 值对酶解溶液中菌丝蛋白质的影响。从图 4 可看出,随溶解液 pH 值升高,蛋白质水解度呈先增长后下降的趋势。酸性蛋白酶在 pH=6 的溶液中催化蛋白质水解度达最大值 9.42%,中性蛋白酶在 pH=7 的溶液中催化蛋白质水解度达最大值 12.10%;菠萝蛋白酶在 pH=8 溶液中催化蛋白质水解度达最大值 18.23%;碱性蛋白酶在 pH=10 和 11 的溶液中催化蛋白质水解度分别达 32.00%和 31.43%,水解度绝对值后者比前者降低了 0.57%。而以碱溶法制备的菌丝蛋白溶解液呈强碱性,溶解液 pH 由 11 调节至 10 将消耗大量酸液,从而大幅增加难处理废水排放量。因此,从经济环保的角度考虑,选择碱性蛋白酶催化菌丝蛋白质水解 pH=11 为宜。溶解液 pH 值既能影响酶的稳定性和酶的活性,还能影响蛋白质在溶液中的溶解性能。因此,碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和酸性蛋白酶的最佳催化 pH 值分别为 11, 8, 7, 6。

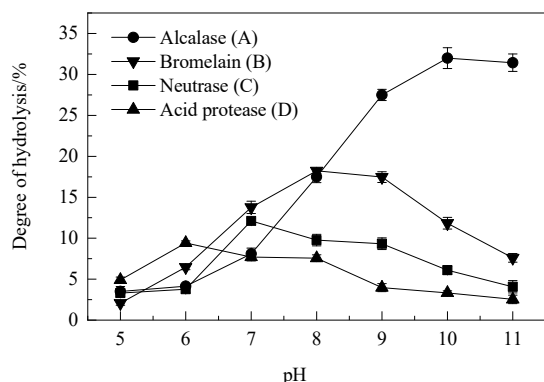


图4 pH对青霉素菌丝蛋白质水解度的影响
Fig.4 Effect of pH on degree of hydrolysis of penicillin mycelium protein

3.1.5 单酶催化水解最佳工艺

以上研究结果显示,酶的种类、酶与蛋白质质量比、反应温度和时间等条件均对酶催化水解菌丝蛋白质反应产生影响,几种酶水解菌丝蛋白质的最佳工艺分别为:碱性蛋白酶与蛋白质的质量比 6%、溶解液 pH=11、反应温度 50℃、反应时间 4 h,蛋白水解度达 31.43%;菠萝蛋白酶与蛋白质质量比 5%、溶解液 pH=8、反应温度 40℃、反应时间 3 h,蛋白质水解度为 18.23%;中性蛋白酶与蛋白质质量比 5%、溶解液 pH=7、反应温度 40℃、反应时间 3 h,蛋白质水解度为 11.96%;酸性蛋白酶与蛋白质质量比 7%、溶解液 pH=6、反应温度 50℃、反应时间 3 h,蛋白质水解度为 9.13%。以碱性蛋白酶为催化剂获得最佳水解效果,蛋白水解度达 31.43%;蛋白质水解度的顺序为碱性蛋白酶>菠萝蛋白酶>中性蛋白酶>酸性蛋白酶。

3.2 复合酶法催化水解菌丝蛋白质

不同酶作用于蛋白质的位点不同,单一种类的酶作用位点相对较少,蛋白质的水解受到一定限制,采用复合酶协同水解可提高蛋白质的水解度。单酶催化青霉素菌丝中蛋白质水解研究结果表明,以碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶分别为催化剂获得了较好的蛋白质水解效果。在此基础上,进一步研究以碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶组成的复合酶催化水解菌丝蛋白质的过程,考察复合酶配比、复合酶与蛋白质质量比、溶解液 pH 值、反应温度和时间等因素对水解过程影响,建立最佳复合酶水解工艺。

3.2.1 复合酶配比的影响

以碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶组成复合酶,复合酶与蛋白质质量比为 10%、溶解液 pH=11、反应温度 50℃、

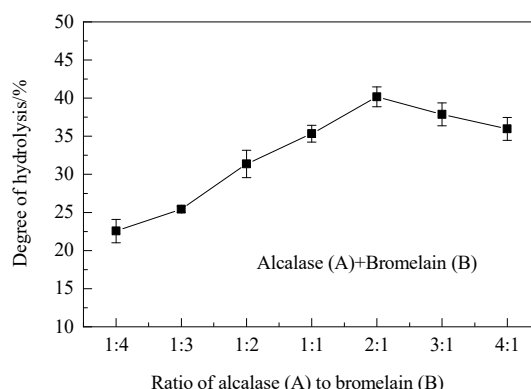


图5 复合酶配比对青霉素菌丝蛋白质水解度的影响
Fig.5 Effect of ratio of alcalase to bromelain on degree of hydrolysis of penicillin mycelium protein

反应时间 4 h 条件下, 考察复合酶配比对酶解菌丝蛋白质的影响。从图 5 中可以看出, 在碱性蛋白与菠萝蛋白酶质量比在 1:4~4:1 的范围内, 随碱性蛋白酶的比例提高, 溶解液中蛋白的水解度呈先上升后下降趋势。当碱性蛋白酶与菠萝蛋白酶质量比为 2:1, 菌渣蛋白水解度达最大值 40.17%, 说明该条件下碱性蛋白酶与菠萝蛋白酶二者共同催化作用达最佳效果, 因此选定复合酶碱性蛋白酶与菠萝蛋白酶最佳配比为 2:1。

3.2.2 反应时间的影响

以碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶组成的复合酶 (A:B=2:1) 为催化剂, 复合酶与蛋白质质量比为 10%、溶解液 pH=11、反应温度 50℃ 的条件下, 考察反应时间对酶水解菌丝蛋白质的影响。从图 6 可看出, 随反应时间延长, 溶解液中蛋白质水解度呈先上升后趋于平稳的趋势。当菌丝蛋白水解反应 3 h 时, 蛋白质水解度可达 39.53%, 说明复合酶催化水解速度比碱性蛋白酶更快, 最佳反应时间为 3 h。

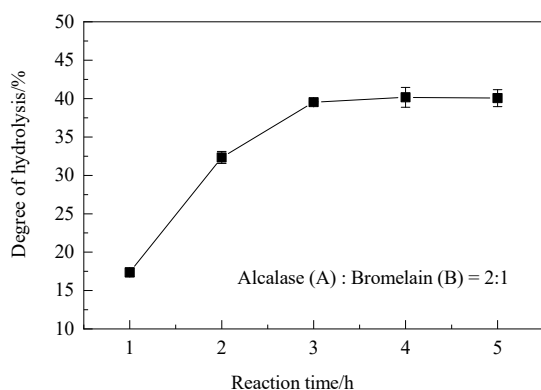


图 6 反应时间对青霉素菌丝蛋白质水解度的影响
Fig.6 Effect of reaction time on degree of hydrolysis of penicillin mycelium protein

3.2.3 反应温度的影响

以碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶组成的复合酶 (A:B=2:1) 为催化剂, 复合酶与蛋白质质量比为 10%, 溶解液 pH=11, 反应 3 h 的条件下, 考察反应温度对复合酶水解催化菌丝蛋白质的影响。从图 7 可看出, 随反应温度升高, 溶解液中蛋白的水解度呈先上升后下降趋势。当反应温度为 50℃ 时, 蛋白水解达 39.53%。反应温度 50℃ 为碱性蛋白酶的最适反应温度, 在菠萝蛋白酶协同作用下, 蛋白质的水解度达最大值; 继续升高反应温度, 超过碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶最适温度, 会导致酶变性失活, 从而使蛋白质水解度降低。因此选定最佳反应温度为 50℃。

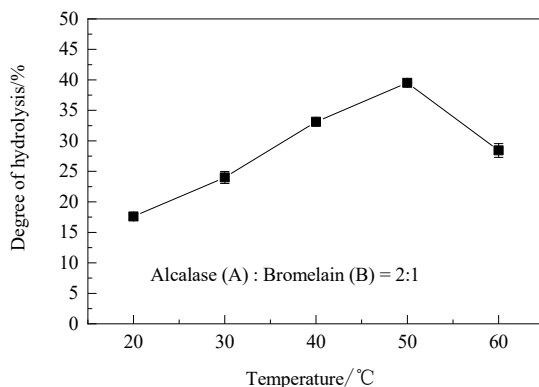


图 7 温度对青霉素菌丝蛋白质水解度的影响
Fig.7 Effect of temperature on degree of hydrolysis of penicillin mycelium protein

3.2.4 复合酶与蛋白质质量比的影响

以碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶组成的复合酶 (A:B=2:1) 为催化剂, 溶解液 pH=11、反应温度 50℃、反应时间 3 h 的条件下, 考察复合酶与蛋白质质量比对菌丝蛋白质水解效果的影响。从图 8 可看出, 随复合酶与蛋白质质量比升高, 蛋白质水解度呈先上升后趋于平稳的趋势。当复合酶与蛋白质质量比为 9% 时, 蛋白质水解度达 39.70%; 继续增大复合酶与蛋白质质量比至 10%, 蛋白质水解度达 40.20%, 蛋白质水解度仅提高了 0.50 个百分点。因此, 为减少复合酶的用量, 选定复合酶与蛋白质质量比为 9% 更经济。

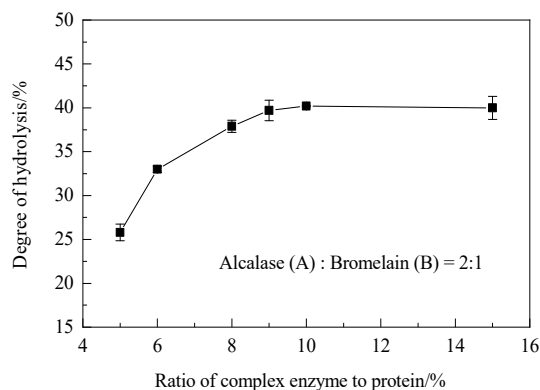


图 8 酶与蛋白质质量比对青霉素菌丝蛋白质水解度的影响
Fig.8 Effect of mass ratio of enzyme to substrate protein on degree of hydrolysis of penicillin mycelium protein

3.2.5 pH 的影响

以碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶组成的复合酶 (A:B=2:1) 为催化剂, 在复合酶与蛋白质质量比为 9%、反应温度 50℃、反应时间 3 h 的条件下, 考察溶解液 pH 对复合酶水解溶液中菌丝蛋白质的影响。结果如图 9 所

示, 随溶解液 pH 值上升时, 蛋白质水解度呈先增长后下降的趋势; 当溶解液 pH=10 时, 蛋白质水解度达最大值 42.73%; 继续升高溶解液 pH 值, 蛋白质水解度降低。在复合酶催化水解菌丝蛋白质过程中, 一方面溶液 pH 值会影响碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶的稳定性; 另一方面溶液 pH 值也会影响碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶的催化活性。随溶解液 pH 值升高, 达菠萝蛋白酶最适 pH 值, 蛋白质水解效果提高, 继续升高溶解液 pH 值, 虽偏离了菠萝蛋白酶最适 pH 值, 但逐渐接近碱性蛋白酶的最适 pH 值, 蛋白质水解度仍呈增长趋势; 当溶解液 pH 值超过碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶最适值, 会导致溶液中酶变性失活, 蛋白质水解度降低。因此, 选定溶解液 pH=10。

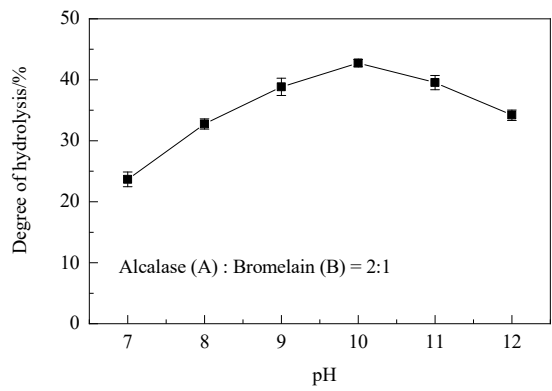


图9 pH 对青霉素菌丝蛋白质水解度的影响
Fig.9 Effect of pH on degree of hydrolysis of penicillin mycelium protein

3.2.6 复合酶催化水解菌丝蛋白质最佳工艺

以碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶组成的复合酶(A:B=2:1)为催化剂, 复合酶与蛋白质的质量比为 9%、溶解液 pH=10、反应温度为 50℃、反应时间 3 h, 青霉素菌丝蛋白质水解度达到 42.73%, 比单酶法提高了 11.30 个百分点。

3.3 酶解液中氨基酸组成和含量

在青霉素菌丝溶解液中, 加入 10%三氯乙酸溶液, 沉淀溶液中菌丝蛋白质, 采用 PITC 柱前衍生法检测上层清液中氨基酸组成与含量, 没有检测出氨基酸。采用最佳复合酶工艺催化水解溶解液中菌丝蛋白质, 待反应结束, 加入 10wt%三氯乙酸溶液, 沉淀酶解液中未被水解的菌丝蛋白质, 测定上层清液中氨基酸组成与含量, 如表 1。可以看出溶液中含 16 种氨基酸, 其主要成分为谷氨酸(GLU)、天冬氨酸(ASP)、甘氨酸(GLY)、亮氨酸(LEU)和丙氨酸(ALA), 分别约占检测出所有氨基酸总

量的 15.47wt%, 11.94wt%, 9.41wt%, 9.23wt% 和 9.22wt%。由此确定, 在碱性和菠萝蛋白酶复合作用下, 溶解液中青霉素菌丝蛋白质主要被水解为谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸等分子。

表 1 复合酶酶解液中氨基酸组成与含量
Table 1 Amino acid composition and content in complex hydrolysis solution

No.	Amino acid	Content/wt%
1	Aspartic acid (ASP)	11.94
2	Glutamic acid (GLU)	15.47
3	Serine (SER)	5.27
4	Glycine (GLY)	9.41
5	Histidine (HIS)	3.95
6	Arginine (ARG)	1.92
7	Threonine (THR)	3.25
8	Alanine (ALA)	9.22
9	Proline (PRO)	4.75
10	Tyrosine (TYR)	5.45
11	Valine (VAL)	4.86
12	Methionine (MET)	2.84
13	Isoleucine (ILE)	2.75
14	Leucine (LEU)	9.23
15	Phenylalanine (PHE)	4.91
16	Lysine (LYS)	4.76

4 结 论

以碱性蛋白酶(A)、菠萝蛋白酶(B)、中性蛋白酶(C)和酸性蛋白酶(D)等为催化剂, 研究了青霉素菌丝溶解液中蛋白质酶催化水解的过程, 得到以下结论:

(1) 酶的种类、酶与蛋白质的质量比、反应温度和时间等条件对菌丝蛋白质水解过程均有影响, 其中碱性蛋白酶催化水解效果最佳。

(2) 碱性蛋白酶的最佳催化水解工艺为: 碱性蛋白酶与蛋白质的质量比 6%、溶解液 pH=11、反应温度 50℃、反应时间 4 h, 青霉素菌丝蛋白质水解度达 31.43%。

(3) 以碱性蛋白酶和菠萝蛋白酶组成的复合酶(A:B=2:1)为催化剂获得更好的水解效果, 最佳工艺为: 复合酶与蛋白质的质量比为 9%、溶解液 pH=10、反应温度为 50℃、反应 3 h, 青霉素菌丝蛋白质水解度达到 42.73%, 比单酶法提高了 11.30 个百分点。

(4) 在最佳复合酶水解工艺下, 酶解液中含 16 种氨基酸, 主要是谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、亮氨酸和丙氨酸等氨基酸, 分别占检测出所有氨基酸总量的 15.47wt%, 11.94wt%, 9.41wt%, 9.23wt%和 9.22wt%。

参考文献

- [1] Li Z X, Zuo J E, Tian B K, et al. Thermal-alkaline pretreatment on the decomposition of the streptomycin bacterial residue [J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2012, 26(3): 2971–2975.
- [2] Mara H. Public health China takes aim at rampant antibiotic resistance [J]. *Science*, 2012, 336(6083): 795–795.
- [3] Zhou C, Liu X L, Li W L, et al. A novel process dehydration of antibiotics fermentation residues [J]. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 2018, 37(6): 1959–1964.
- [4] Cai C, Liu H L, Wang M M. Characterization of antibiotic mycelial residue (AMR) dewatering performance with microwave treatment [J]. *Chemosphere*, 2017, 174: 20–27.
- [5] Tashpulatov Z, Baibaev B G, Shul'man T S. Chemical composition of mycelium of the thermotolerant fungus *penicillium atrovenetum* [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2000, 36: 518–520.
- [6] Zhang G Y, Li C X, Ma D C, et al. Anaerobic digestion of antibiotic residue in combination with hydrothermal pretreatment for biogas [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 192: 257–265.
- [7] Li C X, Zhang G Y, Zhang Z K, et al. Alkaline thermal pretreatment at mild temperatures for biogas production from anaerobic digestion of antibiotic mycelial residue [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 208: 49–57.
- [8] Arikian O A, Mulbry W, Rice C. Management of antibiotic residues from agricultural sources: use of composting to reduce chlortetracycline residues in beef manure from treated animals [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164: 483–489.
- [9] Martinez J L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments [J]. *Science*, 2008, 321(5887): 365–367.
- [10] Wang M M, Zhang B, Cai C, et al. Acidic hydrothermal treatment: characteristics of organic, nitrogen and phosphorus releasing and process optimization on lincomycin removal from lincomycin mycelial residues [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 336: 436–444.
- [11] 韩庆, 苏海佳. 废菌渣高值化研究中细胞破壁工艺的比较 [J]. *环境科学与技术*, 2011, 34(5): 144–147.
- Han Q, Su H J. Comparison of cell wall broken in the research of high value utilization of mycelium residue [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 34(5): 144–147.
- [12] 王贺飞, 李贵霞, 钟为章, 等. 酸/热联合法对土霉素菌渣中蛋白质溶出效果的影响 [J]. *科学工程与技术*, 2017, 17(33): 207–211.
- Wang H F, Li G X, Zhong W Z, et al. Effect on extracting proteins from terramycin bacterial residue by acid/thermal treatment [J]. *Science Technology and Engineering*, 2017, 17(33): 207–211.
- [13] Yang J R, Li W L, Liu Q F, et al. Dissolution of antibiotics mycelium in ionic liquids: performance and mechanism [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2018, 26(2): 252–258.
- [14] Godfrey T, Macmillan J R. *Industrial enzymology: the application of enzymes in industry* [M]. London: MacMillan, 1983: 23.
- [15] Kristinsson H G, Barbara A R. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2000, 40(1): 43–81.
- [16] Kristinsson H G, Rasco B A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture [J]. *Process Biochemistry*, 2000, 36(1/2): 131–139.
- [17] Ren Y, Liang K, Jin Y Q, et al. Identification and characterization of two novel α -glucosidase inhibitory oligopeptides from hemp (*cannabis sativa L.*) seed protein [J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 26: 439–450.
- [18] Noman A, Xu Y S, AL-Bukhaiti W Q, et al. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*acipenser sinensis*) by using papain enzyme [J]. *Process Biochemistry*, 2018, 67: 19–28.
- [19] Evangelho J A, Vanier N L, Pinto V Z, et al. Black bean (*phaseolus vulgaris L.*) protein hydrolysates: physicochemical and functional properties [J]. *Food Chemistry*, 2017, 214: 460–467.
- [20] Nissen J A. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1979, 27: 1256–1262.
- [21] Campanella L, Crescentini G, Avino P. Simultaneous determination of cysteine, cystine and 18 other amino acids in various matrices by high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999, 833(2): 137–145.
- [22] Carrasco-Castilla J, Hernández-Álvarez A J, Jacinto-Hernández C, et al. Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1789–1795.
- [23] 唐晓雷, 何慧楠, 张思雨, 等. 柱前衍生-HPLC 测定不同等级的梅花鹿鹿茸饮片氨基酸的含量 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(6): 650–654.
- Tang X L, He H N, Zhang S Y, et al. Determination of amino acids in different grades of antler pieces from cervus nippon by pre-column derivatization-HPLC [J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2019, 36(6): 650–654.