



移动扫码阅读

李超,高健磊,闫怡新,等.中性蛋白酶催化水解污泥提取蛋白质的研究[J].能源环境保护,2019,33(6):18-22.

LI Chao,GAO Jianlei,YAN yixin,et al. Study on protein extraction by sludge catalytic hydrolysis with neutral protease[J].Energy Environmental Protection,2019,33(6):18-22.

中性蛋白酶催化水解污泥提取蛋白质的研究

李超¹,高健磊²,闫怡新²,岳秋彩³

(1.天津市市政工程设计研究院郑州分院,河南 郑州 450001;

2.郑州大学 水利科学与工程学院,河南 郑州 450001;

3.河南省鑫属实业有限公司,河南 郑州 450001)

摘要:为解决污泥二次污染问题并增加蛋白质来源,利用中性蛋白酶催化水解污泥提取蛋白质,分析了pH、酶浓度、反应时间、温度、底物含固率等因素对酶催化作用的影响,并确定酶作用时的最佳条件。结果表明:在pH=7.4、酶加量4 000 U/g污泥、反应时间4 h、温度50℃、含固率4%的条件下,污泥蛋白质提取达到27.4%,氨基酸含量为373 mg/L,多肽含量为912 mg/L;利用蛋白酶作为污泥处理剂获取蛋白质、氨基酸和多肽,具有探索意义和应用价值。

关键词:剩余污泥;中性蛋白酶;催化水解;蛋白质

中图分类号:X705

文献标识码:A

文章编号:1006-8759(2019)06-0018-05

Study on protein extraction by sludge catalytic hydrolysis with neutral protease

LI Chao¹,GAO Jianlei²,YAN Yixin²,YUE Qiucui³

(1.Tianjin Municipal Engineering Design & Research Institute Zhengzhou Branch,Zhengzhou 450001,China;

2.School of water Conservancy and Engineering,Zhengzhou University,Zhengzhou 450001,China;

3.Henan Xinshu Co.,Ltd.,Zhengzhou 450001,China)

Abstract:In order to solve secondary pollution of sludge and increase protein sources,sludge was catalytic hydrolyzed by neutral protease to extract protein.The effects of pH,enzyme concentration,reaction time,temperature and solids content ratio of substrate on catalysis were analyzed.The optimal conditions for catalysis were determined.The results showed that 27.4% of protein was extracted with 373 mg/L amino acid and 912 mg/L polypeptide,when pH = 7.4,enzyme concentration = 4 000 U/g sludge, reaction time = 4 h,temperature = 50 °C and solids content ratio = 4%.Therefore,it has high theory exploration sense and application value to use protease as a sludge treatment agent to obtain protein, amino acids and polypeptides.

Key words:Excess sludge;Neutral protease;Catalytic hydrolysis;Protein

0 引言

随着我国对环境水体的要求是越来越高,污水处理厂在全国范围内的普及程度已深入到各个乡镇。然而,城镇污水处理厂采用的工艺多为生物处理,生物处理法带来的问题是会产生大量的生物污泥。资料显示,截止至2016年我国污泥已

超过4 000万吨,并且仍以每年10%的增长速度增加^[1]。剩余污泥是从生物处理系统排出的活性污泥,活性污泥主要由复杂的微生物种群及微生物代谢物等物质组成^[2,3],剩余污泥中含有丰富的蛋白质,其含量约占30%~60%^[4]。污泥中的蛋白质是一类优质蛋白,可用于制备富含蛋白的动物饲料、绿化有机肥、可降解发泡剂、泡沫灭火剂

及泡沫混凝土保温材料等^[5-7]。为污泥处理出路、资源化利用探索新途径。

剩余污泥中的蛋白质分为胞内蛋白和胞外蛋白,其中胞内蛋白占比较重。提取胞内蛋白需要先破碎细胞结构,使包含在细胞内部的蛋白质被释放出来进入液相。目前有关文献研究的提取污泥蛋白质的方法主要是物理化学法^[8-10],其中碱热法处理污泥时蛋白质提取率可达60%以上,并且在局部地区实现了工业化应用^[11]。碱热法效果虽好但反应条件较为苛刻,对反应设备和运营管理要求也较高,碱热法处理过程中需长时间将温度维持在120℃以及pH不低于12的碱性环境^[10]。利用蛋白酶催化水解法提取蛋白的研究及应用广泛存在于农业、食品等领域^[12,13]。酶法水解污泥提取蛋白的研究也有一些报道^[14,15]。酶法处理污泥提取蛋白质,具有操作简单、反应条件温和、无二次污染等特点^[14,16]。本论文利用中性蛋白酶的催化作用,通过破坏微生物细胞壁从污泥中提取蛋白质开展相关研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

试验所用污泥为某城镇污水处理厂的剩余污泥,污泥平均含水率为99%,其性质如表1所示。试验前先将污泥静止、沉淀,降低污泥含水率,以便减小试验装置体积。

表1 原污泥的性质

参数	pH	蛋白质(%DS)	TCOD(mg/L)	污泥比阻(S ² /g)
数值	6.8-7.4	30-35	7650-8160	4.7×10 ¹⁰

试验使用的中性蛋白酶由北京奥博星生物技术有限公司提供,其基本性质参数如表2所示。试验所用其他化学试剂均为分析纯。

表2 中性蛋白酶的基本参数

参数	酶活力(万U/g污泥)	最适宜pH	最适宜温度(℃)
数值	6.0	7.0-7.8	40左右

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备

在酶解试验中,先利用氢氧化钠或盐酸调节污泥pH值,并加入适量中性蛋白酶,混合均匀,然后将污泥与酶混合物置于反应器中,试验过程中利用恒温振荡水浴锅(SHZ-82A,金坛市富华仪器有限公司)加热,保障酶催化水解反应需要的温度条件;待预定反应时间结束后将反应器置于在100℃水中,对酶灭活,严格控制酶催化作用时间。

将处理后的污泥用低速离心机(转速4000 rpm)离心30 min,得到上清液即为测试样品。

1.2.2 测试及计算方法

pH的检测使用pH计(PHSJ-4A型,上海精密科学仪器有限公司);采用凯氏定氮法测定蛋白质的含量;氨基酸采用茚三酮比色法;多肽采用双缩脲法^[17]。试验过程中,每个样品进行3次平行检测,其结果取平均值。

蛋白质提取率(R_p)的计算公式:

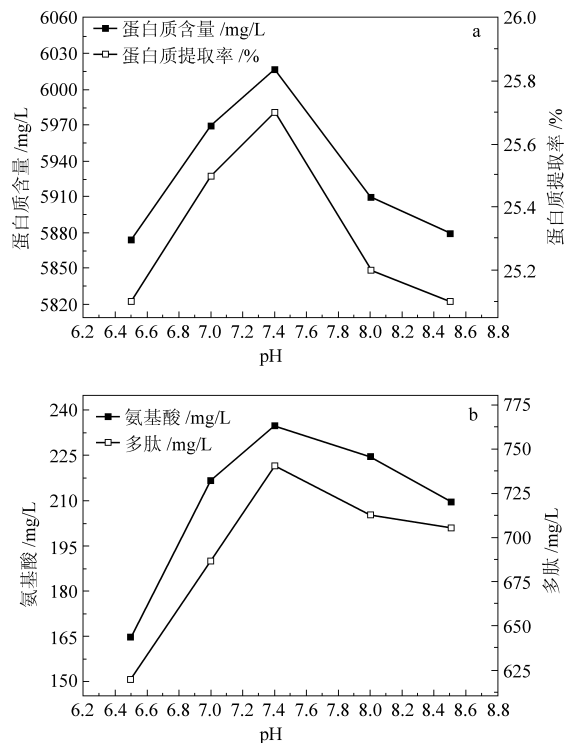
$$R_p(\%) = \frac{m_1}{m_2} \quad (1)$$

式中: m_1 、 m_2 ——分别为蛋白质提取液和原污泥中蛋白质含量,mg。

2 结果与讨论

2.1 体系pH的确定

在500 mL锥形瓶中加入200 mL污泥,使用浓度为0.5 g/mL的NaOH或99%的HCl调节pH为6.5、7.0、7.4、7.8、8.5。其它条件为:中性蛋白酶3000 U/g污泥,反应时间4 h,反应温度45℃、含固率4%。测定上清液中蛋白质含量及其提取率、氨基酸含量、多肽含量,结果如图1所示。



(a.蛋白质含量及提取率;b.氨基酸和多肽)

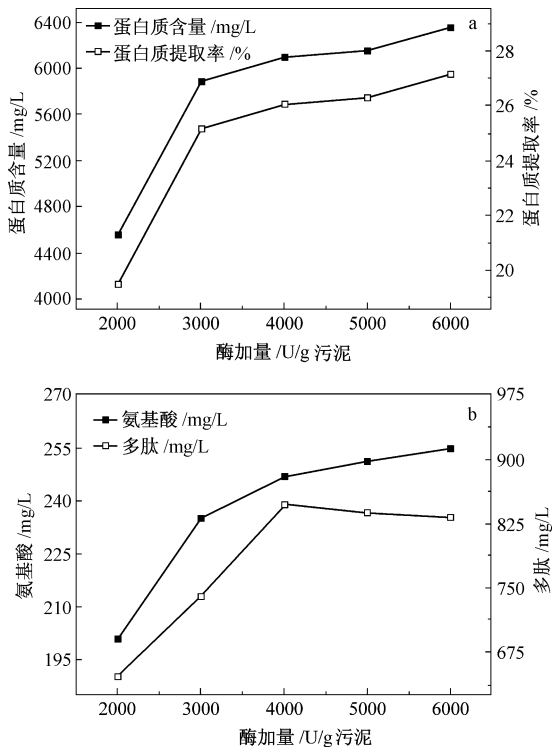
图1 pH对提取污泥蛋白质的影响

从图1中可以看出,随着pH从6至8.5的阶段,蛋白质的含量及其提取率表现为先增大后减少的现象,在pH为7.4处蛋白质的含量达到最大

值 6 017 mg/L, 此时最高提取率为 25.7%; 氨基酸和多肽的含量则同样在 pH 为 7.4 时含量达到最大值分别为 235 mg/L、741 mg/L。在酶活性中心存在一些处于电离状态的氨基酸残基^[18], pH 对酶催化反应的影响, 主要通过两点: pH 对酶的稳定性存在影响; pH 可以改变酶与底物的带电状态。在适宜 pH 环境下, 酶保持良好的稳定性^[19], 酶与底物的结合处于最适电离状态, 有助于催化反应的进行。因此, 认为中性蛋白酶作用的最适 pH 为 7.4。

2.2 酶加量的确定

在 500 mL 锥形瓶中加入 200 mL 污泥, 加入不同酶用量分别为 2 000、3 000、4 000、5 000、6 000 U/g 污泥。其它条件为: pH 7.4、反应时间 4 h、反应温度 45 °C、含固率 4%。测定上清液中蛋白质含量及其提取率、氨基酸含量、多肽含量, 其结果如图 2 所示。



(a. 蛋白质含量及提取率; b. 氨基酸和多肽)

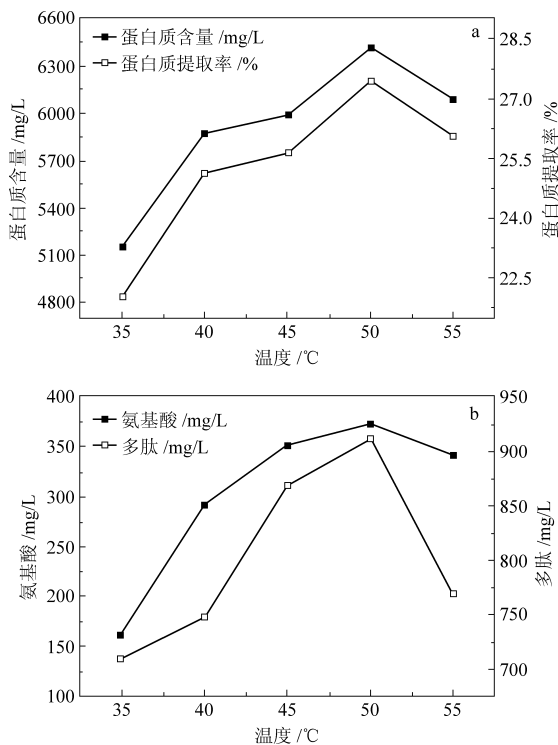
图 2 酶加量对提取污泥蛋白质的影响

由图 2 可得, 不同酶加量与同浓度底物作用, 随着酶加量的增加蛋白质的含量逐渐增加。在酶加量为 4 000 U/g 污泥时, 蛋白质含量为 6 095.2 mg/L, 蛋白质提取率达到 26%, 随着酶加量的继续增加, 蛋白质含量变化趋势放缓; 氨基酸和多肽随着酶浓度的增加而增大, 在 4 000 U/g 污泥时为分别为 247 mg/L、848 mg/L, 在 4 000 U/g 污泥以后氨基酸的含量增加速度减缓, 多肽的含

量呈下降趋势, 认为是分解出的多肽被多余的蛋白酶分解为氨基酸。因此当底物浓度不变, 酶加量为 4 000 U/g 污泥时, 酶与底物接触充分, 增加酶的投入量并不会提高蛋白质含量的增加并且造成酶的浪费。

2.3 反应温度的确定

在 500 mL 锥形瓶中加入 200 mL 污泥, 考察不同反应温度 35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C。其它条件为: pH 7.4、中性蛋白酶 4 000 U/g 污泥、反应时间 4 h、含固率 4%。测定上清液中蛋白质含量及其提取率、氨基酸含量、多肽含量, 其结果如图 3。



(a. 蛋白质含量及提取率; b. 氨基酸和多肽)

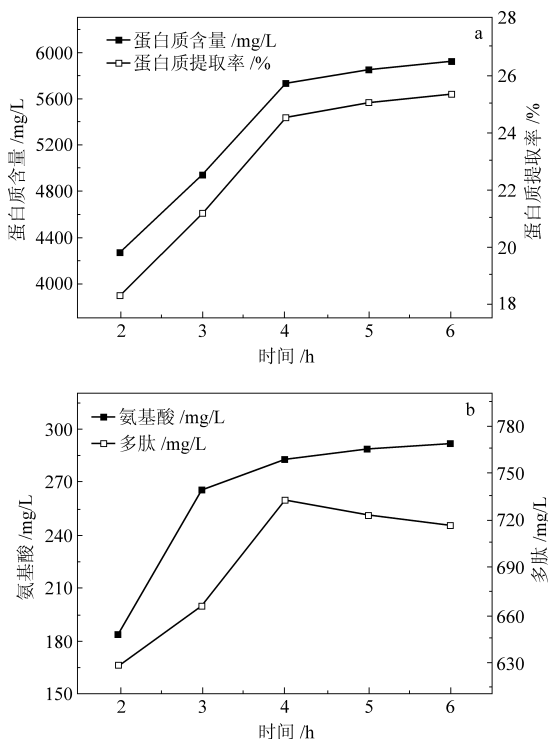
图 3 温度对提取污泥蛋白质的影响

如图 3a 所示, 随着温度的升高, 蛋白质含量及提取率的变化曲线表现为先增加后减小, 在 50 °C 时出现了拐点, 此时蛋白质浓度为 6 417.8 mg/L, 提取率为 27.4%; 氨基酸和多肽变化趋势如图 3b, 氨基酸和多肽的含量随着温度的升高出现先上升后下降的趋势。在 50 °C 时氨基酸和多肽的含量分别达到 373.6 mg/L、91 mg/L。温度是酶活性的重要因素, 酶对温度的要求也较为苛刻, 低温时酶的活性不能够被全部激活, 温度过高时会造成酶不可逆性的失活, 本试验确定 50 °C 为中性蛋白酶的最适温度。

2.4 反应时间的确定

在 500 mL 锥形瓶中加入 200 mL 污泥, 选择

反应时间 2、3、4、5、6 h。其它条件为:pH 7.4、中性蛋白酶 4 000 U/g 污泥、反应温度 45 ℃、含固率 4%。测定上清液中蛋白质含量及其提取率、氨基酸含量、多肽含量,其结果如图 4 所示。



(a. 蛋白质含量及提取率; b. 氨基酸和多肽)

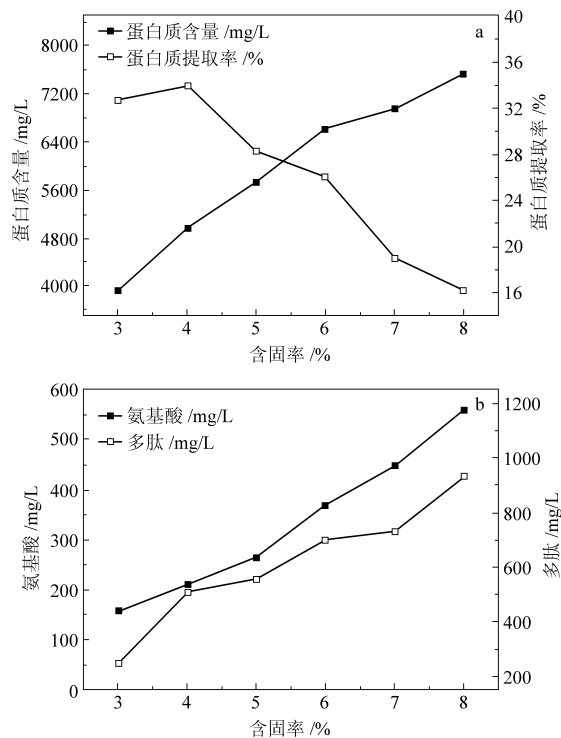
图 4 时间对提取污泥蛋白质的影响

如图 4a, 在 2~4 h 时间段内, 蛋白质含量及提取率呈现出先快速上升, 反应进行到 4 h 后逐渐平稳。在 4 h 时, 蛋白质含量为 5 737 mg/L, 蛋白质提取率达到 24.5%; 图 4b 中氨基酸浓度随着反应进行表现出上升趋势, 4 h 后增长趋势放缓; 多肽的含量在 4 h 前不断上升, 4 h 后出现下降。经分析确定, 随着反应的进行多肽被酶切为小分子氨基酸。反应进行 4 h 后蛋白质的增加达到较高水平, 继续延长反应时间不能提高蛋白质的含量, 反而会引起短链蛋白质含量的减少。因此, 选择 4 h 为反应的最适时间。

2.5 含固率的确定

调节污泥固体浓度分别为 3%、4%、5%、6%、7%、8%, 各取 200 mL 置于 500 mL 锥形瓶。其它条件为:pH 7.4、中性蛋白酶 4 000 U/g 污泥、反应时间 4 h、反应温度 50 ℃。测定上清液中蛋白质含量及其提取率、氨基酸含量、多肽含量, 其结果如图 5 所示。

如图 5a 所示, 随着含固率的增加, 蛋白质含量及其提取率逐渐升高上升后又呈现逐渐减少的趋势。在含固率为 4% 时出现最优值。如图 5b 所



(a. 蛋白质含量及提取率; b. 氨基酸和多肽)

图 5 含固率对提取污泥蛋白质的影响

示, 氨基酸和多肽含量随着含固率的增加而逐渐增大, 此时污泥分解率达到最高。酶在进行催化反应时, 首先与底物形成 ES 络合物, 这样分子间的催化作用就变为分子内的催化反应^[18]。图 5a 中在酶加量一定的情况下, 蛋白质的分解率随着含固率>4% 逐渐降低的原因可能是酶与底物的混合受到传质阻力, 造成酶不能够与更多底物结合形成 ES 络合物, 进而影响到提取蛋白质的效率, 多肽和氨基酸保持上升趋势, 认为是不能与底物结合的酶将已溶出细胞的蛋白质进一步分解。

2.6 正交实验

根据上述实验过程, 为确定优化出最适宜的工艺条件。进一步分析各影响因素之间的关系, 选择 pH、反应时间、温度和酶加量等影响因素设计 4 因素 3 水平正交试验, 以蛋白质提取率为评价对象。其结果如表 3 所示。

表 3 正交试验结果

因素	温度 (°C)	时间 (h)	pH	酶加量 (U/g 污泥)	蛋白质提取率 (%)
实验 1	45	3	7	3000	23.9
实验 2	45	4	7.4	4000	24.4
实验 3	45	5	7.8	5000	25.3
实验 4	50	4	7	5000	25.9
实验 5	50	5	7.4	3000	25.5
实验 6	50	3	7.8	4000	27.5
实验 7	55	5	7	4000	24.5

续表

因素	温度 (°C)	时间 (h)	pH	酶加量 (U/g 污泥)	蛋白质提 取率(%)
实验 8	55	3	7.4	5000	25.4
实验 9	55	4	7.8	3000	25.1
均值 1	24.53	25.6	24.77	24.83	/
均值 2	26.3	25.13	25.1	25.47	/
均值 3	25	25.1	25.97	25.53	/
极差	1.77	0.5	1.2	0.7	/

如表所示,对比极差数值可以看出,影响试验结果程度最大的是温度,其次是 pH,最小的是时间,酶加量的影响程度大于时间。对比各因素的平均值可知,中性蛋白酶催化污泥水解最佳的试验条件应为 pH 7.4,温度 50 °C,加酶量 4 000 U/g 污泥,时间 4 h。此时试验效果最优,其结果与单因素试验结果基本相符。通过正交试验得的优化反应条件,证实酶催化污泥水解反应进行的更为彻底,得到的目标上清液中蛋白质含量、氨基酸和多肽含量较多。

3 结论

采用中性蛋白酶催化水解污泥提取蛋白质是一种环保、低耗能的方法,通过试验得出一下结论:

(1) 中性蛋白酶催化水解污泥的最适条件为 pH 7.4、酶加量 4 000 U/g 污泥、反应时间 4 h、温度 50 °C、含固率 4%。此时,污泥蛋白质提取达到 27.4%,氨基酸含量为 373 mg/L、多肽含量为 912 mg/L。

(2) 中性蛋白酶在其最适工艺条件下,酶活性处在较高水平,污泥中微生物细胞壁的被破解,胞内胞外物质进入上清液,使得上清液中蛋白质、氨基酸、多肽等溶解性物质含量增加。若进一步对上清液进行分离、浓缩等处理,提高蛋白质和氨基酸的含量,可以应用于制作动物饲料,多肽成分则可以作为制作生物发泡剂的绿色原材料,减小环境污染。

参考文献

[1] 戴晓虎.城镇污水处理厂污泥稳定化处理的必要性和迫切性的思考[J].给水排水,2017(12):2-6.
[2] Jorgensen M K, Nierychlo M, Nielsen A H, et al. Unified under-

standing of physico-chemical properties of activated sludge and fouling propensity[J].Water Research,2017,120:117-132.

- [3] Che G H, Yip W K, Mo H K, et al. Effect of sludge fasting/feasting on growth of activated sludge cultures[J].Water Research, 2001,35(4):1029-1037.
- [4] Chen W H, Ping L I, Chen G D, et al. Experimental Research on Protein Extraction from Dried Excess Sludge[J].Earth & Environment,2011,39(3):435-439.
- [5] Su R, Hussain A, Guo J, et al. Animal Feeds Extracted from Excess Sludge by Enzyme, Acid and Base Hydrolysis Processes [J].Acs Sustainable Chemistry & Engineering, 2015, 3(9): 2084-2091.
- [6] 李军伟.活性污泥蛋白质混凝土发泡剂的泡沫稳定性研究[J].新型建筑材料,2010,37(12):63-66.
- [7] Collivignarelli M C, Castagnola F, Sordi M, et al. Sewage sludge treatment in a thermophilic membrane reactor (TMR): factors affecting foam formation[J].Environmental Science & Pollution Research,2017,24(3):2316-2325.
- [8] Li T T, Fu Z M. The Effects of Alkaline Treatment on Excess Sludge Supernatant Characteristics [J]. Applied Mechanics & Materials, 2013, 363(4): 1046-1049.
- [9] 崔静,董岸杰,张卫江,等.热碱水解提取污泥蛋白质的实验研究[J].环境工程学报,2009,3(10):1889-1892.
- [10] Wang X, Li Y B, Liu J X, et al. Augmentation of protein-derived acetic acid production by heat-alkaline-induced changes in protein structure and conformation [J].Water Research,2016,88: 595-603.
- [11] 薛咏海,左健,崔静,等.污泥水解处理及微生物蛋白资源化利用[J].中国给水排水,2014(24):102-104.
- [12] Chen X, Luo Y, Qi B, et al. Improving the hydrolysis efficiency of soy sauce residue using ultrasonic probe-assisted enzymolysis technology [J].Ultrason Sonochem.2017,35:351-358.
- [13] Li S, Yang X, Zhang Y, et al. Enzymolysis kinetics and structural characteristics of rice protein with energy-gathered ultrasound and ultrasound assisted alkali pretreatments [J]. Ultrasonics sonochemistry, 2016, 31: 85-92.
- [14] 马欣.生物酶法提取剩余污泥蛋白质的研究[D].天津:天津理工大学,2016.
- [15] 苏瑞景.剩余污泥酶法水解制备蛋白质、氨基酸及其机理研究[D].上海:东华大学,2013.
- [16] Li P, Deng X L, Chen Q P, et al. Study on the Protein Extraction from Excess Sludge by Papain Hydrolysis [J].International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2010:1-3.
- [17] 李晓东,牛治霞,张柏林.乳清蛋白水解物水解度 3 种测定方法的比较[J].中国乳品工业,2006,34(10):59-62.
- [18] 周晓云.酶学原理与酶工程[M].中国轻工业出版社,2005.
- [19] 朱少娟,施用晖,乐国伟.超声波对胰蛋白酶水解酪蛋白的影响[J].食品与生物技术学报,2005,24(2):50-54.