

固定化蛋白酶对废水中蛋白质的水解效果与机理

于宏兵¹, 林学钰¹, 张兰英¹, 张蕾¹, 杨雪梅¹, 刘继莉²

(1. 吉林大学 环境与资源学院, 长春 130026; 2. 吉林省环境科学研究院, 长春 130012)

摘要: 采用吸附方法将蛋白酶固定于活性炭、大孔树脂和硅胶载体上, 分别研究了 3 种载体蛋白酶固定化效果、酶活性以及对淀粉加工黄浆废水中蛋白质的水解效果。批次试验结果表明, 3 种载体蛋白酶固定效果分别为: 硅胶 20.31%, 大孔树脂 37.85%, 活性炭 61.95%; 酶活性最高时 pH 均为 5.5; 酶活性分别为 3.6 mg/min、21.48 mg/min 和 18.68 mg/min。水解后, 大孔树脂和活性炭固定酶的水解产物氨基酸总量分别较水解前增加 21.26 倍和 14.6 倍; 产物中检出 16 种氨基酸, 较水解前增加 2 种。以大孔树脂为载体构建固定化酶反应器进行连续进水试验, 结果表明: 进水中蛋白质浓度明显影响反应器的水解效果, 当其蛋白质浓度与反应器的酶浓度匹配时(500 mg/L), 反应器能获得 80% 蛋白质水解率和 36.1% 有机物水解酸化率。挥发性水解产物组成以乙醇和乙酸为主, 分别占 50.3%、33.3%。为乙醇型水解。

关键词: 固定化; 蛋白酶; 水解; 废水

中图分类号: X703.1; X792 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)03-0112-06

Hydrolysis and Mechanism of Wastewater Contained Protein Using Immobilized Protein Enzyme

YU Hong-bing¹, LIN Xue-yu¹, ZHANG Lan-ying¹, ZHANG Lei¹, YANG Xue-mei¹, LIU Ji-li²

(1. College of Environment and Resource, Jilin University, Changchun 130026, China; 2. Jilin Academy of Environment Science, Changchun 130012, China)

Abstract: Protein-enzyme was immobilized on big-hole resin, activated charcoal and silica particles by a absorption method. This study focuses on effect of enzyme immobilization, thermal stability and hydrolysis efficiency of wastewater. The result of batch test show that the ratio of immobilized enzyme on activated charcoal, big-hole resin and silica particles was 61.95%, 37.85% and 20.31% respectively. The highest of thermal ability of activated charcoal, big-hole resin and silica particles was 18.68 mg/min, 21.48 mg/min and 3.6 mg/min respectively at pH 5.5. The total amino-acids of big-hole resin and activated charcoal immobilized enzyme after hydrolysis was respectively increased to 21.26 times and 14.6 times. The kind of amino acid was increased from 14 to 16 kinds. The continuous-flow test result indicate that concentration of substrate in influent had significant effect on the hydrolysis rate of immobilized enzyme reactor. The reactor was able to gain hydrolysis rate of 80% for protein and 36.1% (VFA/COD%) for organic materials in the wastewater with a moderate concentration of protein (500 mg/L). The ethanol and acetic of volatile hydrolysis-mixture composition were 50.3% and 33.3% respectively.

Key words: immobilizing; protein enzyme; hydrolysis; wastewater

固定化酶在生物催化反应中, 具有防止酶随物流失, 可反复使用, 酶活性损失小等特点, 作为新兴生物催化技术已被应用于食品化工制药等领域。近年来, 国外曾有利利用固定化酶处理含酚废水的报道^[1], 酶在废水生物处理中有十分重要的作用, 其中蛋白质、纤维素、多糖等高分子有机物污染物均需经水解形成水溶性小分子, 方可为厌氧菌所利用。水解酸化往往成为限速阶段^[2]。同时水解酶类活性及稳定性亦受溶液中 pH、电解质浓度、温度等环境因素影响, 以往的厌氧和好氧处理方法都存在水解菌及酶随水流失和水解菌及酶浓度保持困难等问题^[3], 这都将影响整个厌氧水解酸化及整体工艺处理的效果。成为粮食加工行业高浓度有机废水处理负荷低的主要原因之一。因此, 保持酶的浓度和稳定

性是维持和提高水解效果的关键所在, 玉米加工中的“黄浆废水”中含有大量蛋白质, 其中 68% 为醇溶蛋白, 对这类废水处理一直是个难题^[4]。利用固定化酶处理高浓度有机废水尤其是具有复杂水质的“黄浆水”鲜见报道。本研究采用物理吸附固定技术以活性炭、大孔树脂、硅胶为载体固定蛋白酶, 比较研究各载体酶的固定效果、酶活性、水解效果以及影响因素, 并利用固定酶构建水解反应器对该类废水进行连续处理, 提高有机污染物的可溶性和可降解性。

收稿日期: 2004-08-19; 修订日期: 2004-11-03

基金项目: 国家科技攻关专题项目(2003BA614A-10-01)

作者简介: 于宏兵(1958~), 男, 研究员, 主要研究方向为工业废水处理和水土污染控制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蛋白酶:酶活 200 U/g,适宜 pH4.5~6, 适宜温度 35℃~80℃,呈粉状;载体:大孔树脂,粒度 0.4~1.0 mm,孔径分布 9~30 nm,密度 0.75 g/cm³;活性炭:碘值>950,粒度 8~20 目;商品硅胶:G60. 试验水样:采自一大型玉米深加工企业的“黄浆废水”, COD:33 000~35 000 mg/L, 蛋白质:4 700~5 200 mg/L, pH 4.5, SS:4 600~5 400 mg/L, BOD:8 200~15 000 mg/L. 蛋白质经酶作用水解,其最终产物为氨基酸及 VFA, 水中新增氨基酸的量/原液中的蛋白质的量×100%能够反映废水中的蛋白质水解效果和程度. 酸化率(VFA/COD×100%)反映有机污染物的水解程度.

1.2 分析方法

COD的测定:重铬酸钾法;SS 重量法;VFA 的测定:气相色谱法;蛋白质的测定:福林法;氨基酸的测定:甲醛滴定法;pH 采用 pH2-25BC 型数字酸度计测定,水解液氨基酸定性和定量分析:取水解液用 0.2 μm 纤维树脂膜过滤分离出氨基酸的水解液再用 6 mol/L 盐酸 105℃水解 24 h 后,加水定容,稀释 50 倍后,在 Agilent1100 液相色谱仪上,用 OPA 和 FMOc 柱前衍生, C18 柱分离,紫外或荧光检测器检测.以 18 种氨基酸混合对照品的保留时间定性,以外标法峰面积定量,色谱条件:C18 柱和保护柱,流速 1 mL/min.检测器条件:荧光检测器 激发波长 340 nm,发射波长 450 nm,14.5 min 后激发波长 266 nm,发射波长 305 nm.紫外检测器 338 nm,18 min 后为 262 nm.酶活性:用甲醛法测定 1 g 酶载体在 1 min 内水解蛋白质产生氨基酸的量(mg),单位计为 mg/min^[5].

1.3 试验方法

实验装置如图 1 所示.

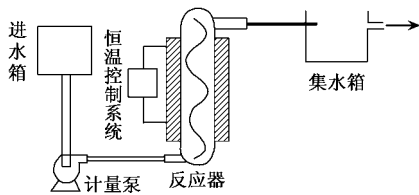


图 1 上流折板式固定化蛋白酶反应器

Fig.1 Schematic diagram of the upflow immobility enzyme reactor

酶的固定化:分别称取 20g 经处理的活性炭,

大孔树脂和硅胶各 5 份,分别放入 300 mL 蛋白酶含量 146 mg/L 溶液中,然后在 200 r/min 摆床上,其中活性炭振荡 1.5 h^[6],大孔树脂振荡 3 d^[7],硅胶振荡 24 h^[8]. 固定蛋白酶后,载体用去离子水反复冲洗载体至蛋白质浓度为 0 或不变时,测定洗出液中蛋白质含量.批次试验设计:调节原水 pH 为 5.0、5.5、6.0、7.0 后,各取 3 份每份 500 mL 分别与 3 种固定化蛋白酶载体混合放入 1 000 mL 烧杯中并在 37℃恒温水浴中反应 6 h,分别测定每个反应器中的蛋白质和酶活性,确定 3 种载体高酶活性的 pH 值范围.在 3 种载体最佳 pH 值范围内向 37℃水浴中的 10 个反应器中各加入 500 mL 原液,分别设定 HRT 为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、6.0 h,对出水中的蛋白质和酶活性进行测定,探求其随时间的变化规律.固定化蛋白酶动态反应器设计:反应器有效容积 0.2 L(3.5 cm×20 cm),内置折流板(见图 1),填加固定化蛋白酶的大孔树脂,装填容量:0.36 g/mL,上升流速:0.18 cm/min,反应温度:37℃.将“黄浆”废水经计量泵按 0.066 L/h 流量进入反应器,水力停留 3.0 h,上口流出.测其出水蛋白质水解率和 VFA 以及 VFA/COD 等.

2 结果与讨论

2.1 不同载体材料对蛋白酶固定效果

不同载体材料表面特征和酶的带电性、交换性、能以及两者之间 ξ 电位等都影响酶在载体表面的固定效果.由图 2 可见大孔树脂、活性炭和硅胶对蛋白酶的固定效果.本试验溶液中蛋白酶浓度 146.94 mg/L, pH 为 7.0.3 种载体固定酶效果以每个载体 5 个平行试样的平均酶固定率进行比较.由图 2 可见,在 pH 中性条件下蛋白酶固定率:大孔树脂为 37.85%,活性炭为 61.95%,硅胶最低为 20.31%,呈活性炭>大孔树脂>硅胶.分析原因, pH 为 7 时,活性炭与该蛋白酶之间的 ξ 电位最小,活性炭表面孔隙发达,孔径分布较宽,更适于蛋白酶的表面电性和尺寸,易于产生表面吸附和深层吸附.大孔树脂表面电性对极性有机分子有一定吸附作用,另外其表面孔径分布在 9~30 nm 之间,比表面较大,都有利于对蛋白质分子的吸附.硅胶由于孔隙少,孔径过小,难于形成孔隙内部的深层吸附.因此,固定的酶数量最少.

2.2 pH和载体性质对固定化蛋白酶活性的影响

几乎每种固定化酶都有最适的 pH 值范围^[4,7],实验中将固定化的酶分别放入不同 pH 值的废水

中, pH 变化范围为 4.0 ~ 7.0. 从图 3 可见, 大孔树脂、活性炭、硅胶 3 种载体最高蛋白酶活性的 pH 值均为 5.5, 其酶活性分别为 21.48 mg/min、18.68 mg/min 和 3.6 mg/min, 但是 3 种载体的最高酶活性相差较大, 表明 3 种载体的性质对其酶活性有明显影响. 另外从固定化效果比较来看, 活性炭大于大孔树脂, 但是其最高酶活性却呈大孔树脂 > 活性炭 > 硅胶. 由此可见载体上酶的固定多少与其酶活性没有直接关系. 从图 3 分析可见, 在 pH 5.5 酶活性达到最高点之后, 硅胶酶活性曲线迅速下降, 表明硅胶-蛋白酶复合体对 pH 更为敏感, pH 最适范围较窄.

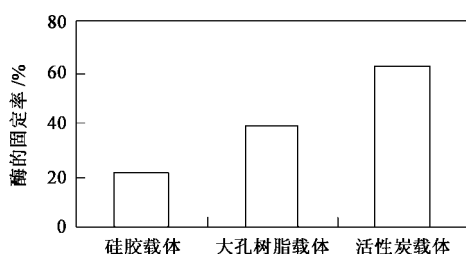


图 2 3 种载体酶固定效果比较

Fig. 2 Comparison among the rate of silica, big-hole resin and activated charcoal for immobilized protein enzyme

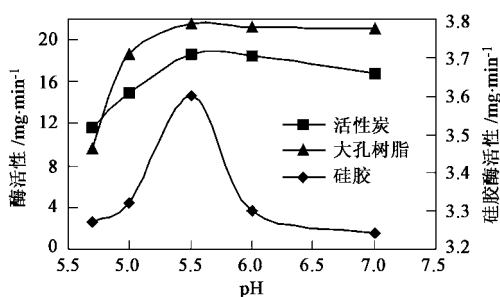


图 3 pH 对不同载体酶活性的影响

Fig. 3 The Effect on enzyme activity of pH with different loads

由图 3 可见, 当 $pH < pH_{5.5}$ 时, 其活性对 pH 较为敏感, 大孔树脂固定化酶活性随 pH 变化与硅胶和活性炭基本一致, 其蛋白质水解率随 pH 上升而迅速增加, $pH > 5.5$ 时, 活性炭和大孔树脂其酶活性随 pH 增加而下降, 但其下降幅度较硅胶小的多, 仅减少 0.47 mg/min 和 1.88 mg/min. 由图 4 可见, pH 变化也对活性炭和大孔树脂固定化酶的蛋白质水解效果产生影响, 其中活性炭固定化酶在 pH 5.5 时对蛋白质水解达到最高为 44.30%, 大孔树脂为 39.43%.

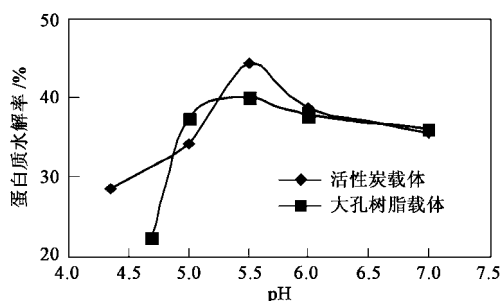


图 4 pH 对大孔树脂和活性炭固定蛋白酶水解的影响

Fig. 4 The effect of pH on hydrolysis rate of big-hole resin and activated charcoal

2.3 反应时间对固定化酶活性及水解效果的影响

在批次酶催化水解反应中, 反应体系内的物质组成发生变化, 反应底物不断减少而生成氨基酸不断增加, 从而促使酶活性的变化. 由图 5 可见, 活性

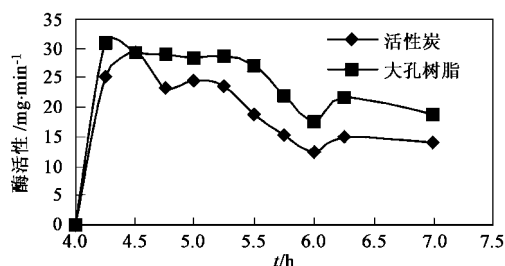


图 5 反应时间对活性炭和大孔树脂固定蛋白酶活性的影响

Fig. 5 The effect of time on enzyme activity of immobilized activated carbon and big-hole resin

炭和大孔树脂固定酶活性分别在 1 h 和 0.5 h 达到最大, 分别为 29.42 mg/min 和 30.82 mg/min. 在此之后, 酶活性均开始下降. 但是, 大孔树脂固定的蛋白酶活性下降得较慢, 在反应 3 h 时其酶活仍为 27.08 mg/min, 仅比最大少 3.74 mg/min; 而活性炭固定的蛋白酶活性在 3 h 时, 酶活性只有 18.68 mg/min, 减少了 10.74 mg/min. 酶活性损失较大. 事实上, 高浓度的有机废水的组成复杂, 有多种激活剂和抑制剂, 酶活性的变化规律很难相同于蛋白酶与纯蛋白质反应的规律. 同时底物浓度的减少也是造成酶活性降低的一个因素. 另外, 从酶活的平均值来看大孔树脂蛋白酶活性要高于活性炭的蛋白酶活性. 蛋白质在酶作用水解时, 先将蛋白质吸附其表面, 然后使蛋白质表面的多肽链解开. 活性炭利用其较大的孔径吸附了大量的酶分子, 但却没有更多的空间吸附蛋白质, 使蛋白酶的活性中心不能裸露在外面与蛋白质充分接触, 导致酶活性不高. 大孔树脂虽然对蛋白酶的固定率没有活性炭高, 然而, 它给废

水中的蛋白质留有与蛋白酶活性中心足够的接触空间,反而加快了反应^[10].从图 6 可以看出,蛋白质水解率随反应时间不断增加,在水力停留时间为 6 h 时活性炭与大孔树脂固定酶对蛋白质的水解率分别为 30.43 %和 39.93 %.在相同时间内大孔树脂固定酶对高浓度有机废水中的蛋白质水解效果好于活性炭固定化酶.

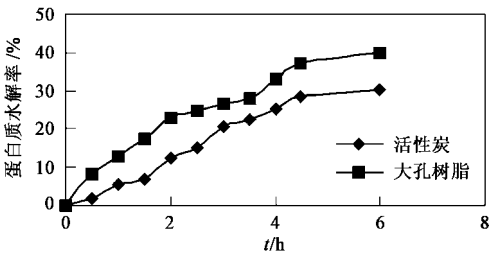


图 6 反应时间对活性炭和大孔树脂固定蛋白酶水解的影响
Fig.6 The effect of time on protein hydrolysis of activated charcoal and big-hole resin

2.4 固定化酶蛋白质水解特征

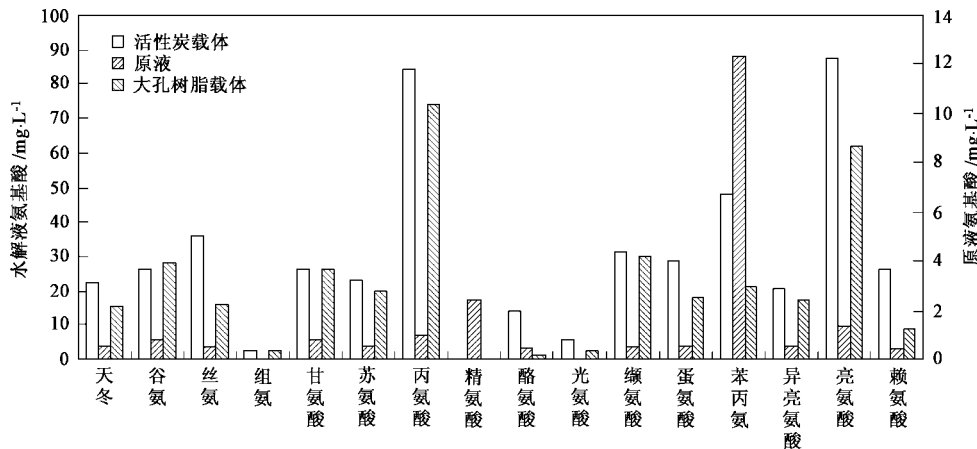


图 7 水解液中氨基酸浓度和组成变化
Fig.7 The change of amino-acids composition before and after hydrolysis

在反应器设计上重点考虑质量传递规律,三维结构空间效应对固定化酶催化效果的影响.选择酶固定率高,活性强,活性损失少的大孔树脂固定化酶为反应器填料,反应器采用上升式水流,反应器内置有旋流折板,上升水流与折板和大孔树脂载体相碰形成涡流和搅动,从而提高水中污染质的分子扩散,增加酶中心与污染质碰撞和传质效应.另一方面搅动固定酶载体随水流上升,在反应器折板上着落形成多层固定酶,使其在反应器中垂直均匀性分

布.玉米黄浆废水所含蛋白质在 pH5.5,固定化蛋白酶作用下水解 6h 后产生氨基酸,其数量和组成与水解前比较有显著变化.由图 7 可见,以大孔树脂和活性炭为载体固定的蛋白酶水解产物氨基酸总量分别较水解前增加 21.26 和 14.6 倍.从氨基酸组成来看,水解前仅检出 14 种氨基酸,水解后产物中检出 16 种氨基酸,增加 2 种氨基酸:组氨酸和光氨酸.大孔树脂和活性炭载体蛋白酶水解氨基酸组成关系趋势基本相同,其中丙氨酸最高分别为 17.5 %和 22.47 %,其次为亮氨酸分别为 18.1 %和 18.62 %.处于中间位置为缬氨酸分别为 6.52 %和 9.05 %,蛋氨酸分别为 5.96 %和 5.64 %.苯丙氨酸分别为 9.90 %和 6.31 %.赖氨酸相差较少分别为 5.46 %和 4.65 %.含量最少的是酪氨酸分别为 2.85 %和 1.96 %.其他氨基酸均分布在 3 %~5 %之间.总体来看,废水中蛋白质经过固定酶水解后,其产物中的氨基酸总量明显增加,氨基酸组份也有所增加,水解前未检出的组氨酸和光氨酸在水解液中检出.

2.5 固定化蛋白酶反应器的水解特征

布.试验采用玉米“黄浆水”经稀释,设定不同蛋白质(底物)浓度水平,低水平:217 mg/L (L Run),中水平:506 mg/L (M Run) 和高水平:1 036 mg/L (H Run),pH 为 7.0,每次换水反应器连续运行 3d,观测每天出水氨基酸浓度变化,了解反应器的水解能力.由图 8 可见,其出水氨基酸含量随处理时间延长均有所增加,但随底物浓度不同而有明显差异,呈底物浓度越高出水氨基酸浓度越高的趋势.由图 9 可见蛋白质水解率的变化,各处理的最高水解率分别

为 L:61%, M:80%, H:47.7%, 其水解速率分别为 0.20 h^{-1} , 0.26 h^{-1} 和 0.15 h^{-1} , 均呈 $M > L > H$ 的趋势, 表明相对于体系酶浓度水平不变的条件下, 底物浓度的高低对其水解及水解率有明显影响, 适当的 M 处理底物浓度与体系酶浓度相匹配, 其水解效率最高, 而 H 处理底物浓度过高使酶过饱和而 L 处理过低使酶不饱和其结果都将导致水解效率的降低。

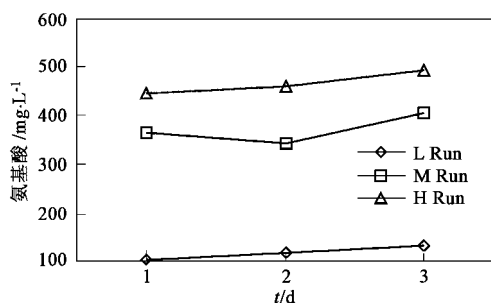


图 8 不同底物浓度条件下的水解

Fig. 8 The effect on hydrolysis of different substrate concentration

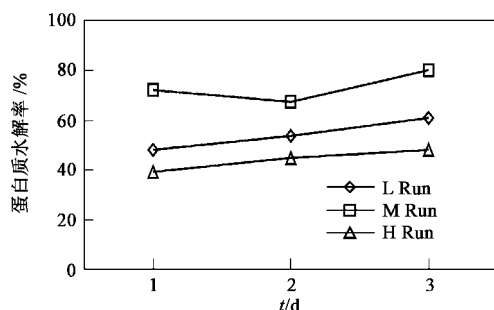


图 9 不同底物浓度下的水解率

Fig. 9 The effect on hydrolysis rate with different substrate concentration

由图 10 可见, “黄浆”废水中有机物经大孔树脂固定酶反应器的水解酸化作用, 产生大量 VFA 和醇类, 表明该反应器除蛋白质外对其它有机物依然有水解酸化作用, 可为进一步甲烷化提供挥发性有机酸。反应器的酸化率最高达到 36.1%, 平均为 31%, 且出水 pH 降低不明显, 仍然保持在 pH 6.5 ~ 7.0 之间。另外由图 11 可见, 该酸化反应器所产生的水解产物中以乙醇和乙酸为主, 并明显高于丙酸和丁酸, 呈乙醇 > 乙酸 > 丁酸 > 丙酸的结果, 分别占挥发性有机物总量的 50.3%, 33.3%, 10.7%, 5.5%。乙醇型发酵是充分发挥两相厌氧系统功能最佳发酵类型^[11], 以乙醇和乙酸为主的末端产物有利于产甲烷相利用和功能的发挥。这些发酵产物作为甲烷菌的

底物, 最终降解转化为甲烷和 CO_2 。这一发酵类型有利于发挥产甲烷相的处理能力。这在工程中是有实际意义的。

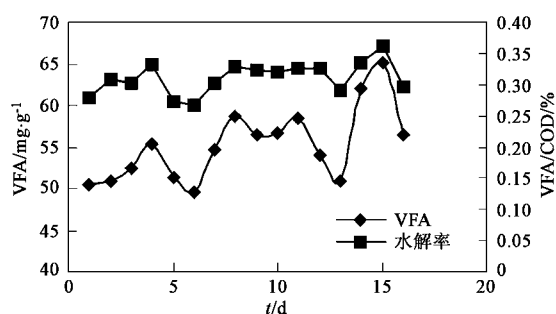


图 10 VFA 和水解率 (VFA/COD) 随时间变化特性

Fig. 10 The change of VFA and VFA/COD with time

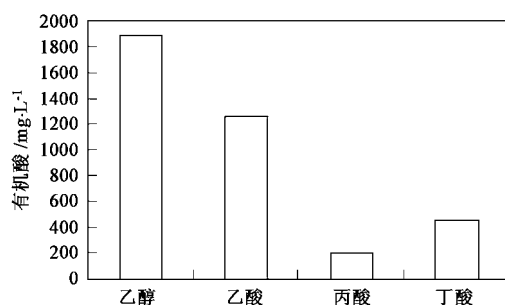


图 11 水解液中挥发性有机物的组成

Fig. 11 The composition of volatile organic in wastewater after hydrolysis

3 结论

(1) 批次实验中, 活性炭蛋白酶的固定率可达到 61.95%, 大孔树脂为 37.85%, 硅胶只有 20.31%。在 pH 5.5 条件下, 能获得最大酶活性, 其中大孔树脂最高为 21.48 mg/min, 活性炭载体为 18.68 mg/min, 硅胶仅为 3.6 mg/min, 不同载体酶固定率多少与酶活性高低没有直接关系。固定酶活性随反应时间变化, 大孔树脂固定酶活性在 0.5 h 达到最大为 30.82 mg/min, 活性炭在 1 h 达到最大 29.42 mg/min, 随后 2 种载体固定酶活性都开始减少。但是, 大孔树脂固定酶在 3 h 内损失只有 3.74 mg/min, 而活性炭为 10.4 mg/min; 2 载体对蛋白质的水解率分别为 39.93% 和 30.43%。综上比较来看大孔树脂是较为理想的蛋白酶固定载体。

(2) 经固定蛋白酶水解后溶液中氨基酸浓度有显著增加, 其中大孔树脂载体增加 21.26 倍, 活性炭载体增加 14.6 倍, 氨基酸种类由 14 种增加到 16

种.

(3)固定酶载体反应器的水解效果明显受进水底物浓度的影响,当底物浓度与反应器的酶的浓度相适应时,能获得 80 %的水解率.经 3d 运行出水氨基酸和水解率并未降低而是有所增加.表明固定酶载体反应器动态运行过程中的酶活性并未损失,这与批次试验酶活性随反应时间进行而降低的结果有所不同.其内在原因有待进一步研究.

(4)经反应器作用,废水中的有机物转化为挥发性有机酸(VFA),其酸化率最高达到 36.1 %.VFA 组成以乙醇和乙酸为主,分别占有机酸总量的 50.3 %和 33.3 %;丁酸和丙酸分别为 10.7 %和 5.5 %.为乙醇型发酵,这有利于被甲烷菌所利用.

参考文献:

[1] Akay G, Erthan E, Keskinlek B, *et al.* Removal of phenol from wastewater using membrane-immobilized enzymes part, cross-flow filtration[J]. *Journal of Membrane Science*, 2002, **206**: 61 ~ 68 .

[2] Shin H S, Han S K, Song Y C, *et al.* Performance of UASB reactor treating leachate from acidogenic fermenter in the two-phase anaerobic digestion of food wastewater[J]. *Wat. Res.*, 2001, **35**(14): 3341 ~ 3347 .

[3] Gülay Bayramoglu, Meltem Yilmaz, M Yakup Arica, *et al.*

Immobilization of a thermostable α -amylase onto reactive membranes: kinetics characterization and application to continuous starch hydrolysis[J]. *Food Chemistry*, 2004, **84**: 591 ~ 599 .

[4] 谷成,刘维立.高浓度有机废水处理技术的发展[J].*城市环境与城市生态*, 1999, **3**: 54 ~ 56 .

[5] 陈钧辉.生物化学实验[M].北京:科学出版社, 2001. 120 ~ 121 .

[6] Leng Hong Lim, Douglas G Macdonald, Gordon A Hill. Hydrolysis of starch particles using immobilized barley α -amylase [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **13**: 53 ~ 62 .

[7] 罗贵民 曹淑桂 张今,等.酶工程[M].北京:化学工业出版社, 2002. 373 ~ 375 .

[8] 王建龙.生物固定化技术与水污染控制[M].北京:科学出版社, 2002. 2 ~ 14 .

[9] Rani A S, Das M L M, Satyanarayana S. Preparation and characterization of amyloglucosidase adsorbed on activated charcoal[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000, **10**: 471 ~ 476 .

[10] Estela M Lamas, Rui M Barros, Victor M Balacao, *et al.* Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, **28**: 642 ~ 652 .

[11] 任南琪,刘敏,王爱杰,等.两相厌氧系统中产甲烷相有机酸转化规律[J].*环境科学*, 2003, **24**(4): 89 ~ 93 .