

- [5] Baltisberger, R. J., Klaudson, C. L., *Anal. Chim. Acta*, **73**, 295 (1974).
- [6] Bisogni, J. G., Lawrence, A. W., *Environmental Science and Technology*, **8**, 850 (1974).
- [7] Matsunaga, K., Takahashi S., *Anal. Chim. Acta* **87**, 487 (1976).
- [8] Nishi, S., Horimoto, Y., Intern. Symp. on Identification and Measurement of Environmental Pollutants, 202 (1971).
- [9] 戴明德、翟平阳等, 吉林大学学报, **3**, 49 (1976).
- [10] Weiss, H. V., Shipman, W. H., *Anal. Chim. Acta*, **81**, 211 (1976).

不同来源活性污泥分析

——蛋白质及其氨基酸测定

吴克佐 徐琴钰 于莲 龚蓁蓁

(中国科学院上海生物化学研究所)

活性污泥法是利用生物学原理处理有机废水的重要方法之一。但在废水的处理过程中,必须同时重视污泥的处置和利用问题。本实验室以印染、造纸、煤气、食品和石油化工废水为例,对相应的活性污泥中蛋白质、核酸和毒性成分作了初步观察。本文报导活性污泥的分析方法及一些结果,供有关方面参考。

一、材料与方 法

1. 材料: 取自下列各厂

上海织袜四厂: 板框压滤滤饼(曝气池)

上海立新造纸厂: 新鲜污泥(生物转盘)

上海炼油厂: 新鲜污泥(曝气池)

上海杨浦煤气厂: 新鲜污泥(曝气池)

上海禽蛋五厂: 新鲜污泥(曝气池)

2. 样品预处理

新鲜活性污泥离心或压滤,除去清液。沉淀用五倍体积 1% 高氯酸洗涤,反复四次。所得沉淀再用五倍体积 95% 乙醇洗涤,反复五次。沉淀在室温下凉干,又于 110°C 烘箱中烘烤一昼夜。干物以球磨机粉碎。粉末存干燥器备用。

3. 污泥蛋白质的抽提

称取上述干污泥 1 克,置于 60 毫升梨形

磨口瓶中。加入 0.1 NNaOH 30 毫升。于沸水浴中迴流抽提。半小时后取出,离心,收集清液,反复三次。合并所得抽提液,记下总毫升数。

4. 蛋白质测定^[1-3]

试剂:

牛血清白蛋白(结晶,含量 98%,英国)

双缩脲试剂甲 30% NaOH(内含 0.2% CuSO₄)

双缩脲试剂乙 30% NaOH

测定步骤:

(1) 吸取上述抽提液三份(0.25, 0.5, 1 毫升),分别加入 0.1 NNaOH 至 2 毫升摇匀。加入双缩脲试剂甲 2 毫升。

(2) 吸取上述抽提液三份(0.25, 0.5, 1 毫升),分别加入 0.1 NNaOH 至 2 毫升摇匀。加入双缩脲试剂乙 2 毫升。

(3) 将上述 6 管置 37°C 水浴中保温。30 分钟后取出,冷至室温。如有沉淀可离心除去。清液于 72 型分光光度计上测定,选用 545 毫微米。

(4) 计算: 将上述 6 管的读数,分别算成每毫升的光密度值,并求出平均值。然后将(1)的平均值减去(2)的,再在标准曲线上

查得蛋白质的含量, 乘上抽提液总毫升数, 便得每克污泥的蛋白质含量。

(5) 标准曲线制备: 称取结晶牛血清白蛋白 40 毫克, 以 16 毫升 0.1 NNaOH 使其溶解, 制成 2.5 毫克/毫升的贮备液。测定时, 取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 毫升, 再加 0.1 NNaOH 成 2.0 毫升。加双缩脲试剂甲 2 毫升。空白管用 2 毫升 0.1 NNaOH 做成, 同样加双缩脲试剂甲 2 毫升。按步骤(3)测得光密度, 绘制成图。此标准曲线并以微量克氏定氮法加以校正。

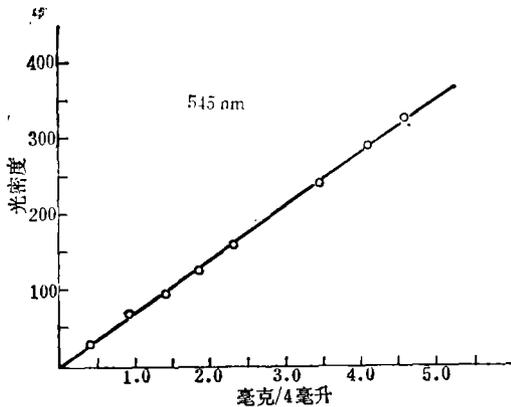


图1 蛋白质标准曲线

5. 氨基酸测定^[4]

(1) 定量称取干污泥 100 毫克, 置硬质玻璃管中, 加入恒沸点盐酸(5.7 N) 3 毫升, 抽真空, 封管。105—110°C 水解 48 小时。取出后, 将水解液转移至 100 毫升容量瓶中, 以去离子水洗涤水解管多次, 洗涤液一并加入容量瓶中。最后加去离子水至刻度, 摇匀。过滤或离心除去残渣, 取出清液 10 毫升, 蒸干。加少量水, 蒸干。反复三次用 pH 2.2, 0.5 毫升柠檬酸缓冲液溶解。取 0.05 毫升作氨基酸分析(用日本柴田 AA-600 型氨基酸自动分析仪)。

(2) 色氨酸在上述水解条件下, 已完全破坏, 另用碱水解法进行^[5]。显色剂采用三氯化铁, 醋酸酐, 冰醋酸和硫酸。

二、结果与讨论

1. 蛋白质含量:

实验结果(表 1) 指出, 活性污泥中蛋白质含量十分丰富, 一般在 30% 左右, 与豆类蛋白含量接近。微生物, 特别如细菌和酵母菌, 干物质中蛋白质含量一般均在 40% 以上。活性污泥的主要组分为微生物, 故我们的实验结果是可信的。个别结果偏高的原因尚待研究。

表 1 活性污泥中蛋白质含量

来源	% (干物质)
上海织袜四厂	35.1
上海立新造纸厂	22.3
上海炼油厂	26.4
上海杨浦煤气厂	49.0
上海禽蛋五厂	26.5

2. 氨基酸含量:

无论是干污泥的水解物或是污泥蛋白的水解物, 在氨基酸自动分析仪中都显示出含有各种天然氨基酸的正常色谱。其中赖氨酸、甲硫氨酸、色氨酸含量不低, 值得我们注意, 因为此三种氨基酸乃是蛋白质营养价值的第一、二、三限制因素。本文对细菌所含的 D-异构体氨基酸及细菌细胞壁所特有的胞壁酸(muramic acid)和二氨基庚二酸(diaminopimelic acid)均未作测定。如表 2 所示, 污泥中的其它成分, 例如碳水化合物及一些有机物在蛋白质酸水解过程中, 对氨基酸的回收率是有影响的。

3. 蛋白质测定方法

实验室最基本和常用的方法为测定含氮量, 再根据蛋白质的已知含氮量求得蛋白质的含量^[6]。此外, 紫外吸收法、缩脲法和 Folin-酚试剂也是实验室常用的方法。但现有的蛋白质测定法均不能适应污泥中蛋白质的测定。因为污泥中除蛋白质外尚有其它含氮物; 并且污泥还吸附有各种类型的有机物, 干扰测定; 此外, 污泥蛋白绝大部分属菌体蛋

表2 各种污泥蛋白的氨基酸组成(%)

氨基酸	1	2	3	4	5
赖氨酸	4.7	4.4	5.3	9.1	3.5
组氨酸	1.5	2.6	1.9	2.7	1.3
精氨酸	2.6	3.4	7.3	7.6	3.9
门冬氨酸	10.7	6.8	12.2	11.8	5.6
苏氨酸	1.8	3.6	4.3	6.2	3.0
丝氨酸	1.6	2.8	3.6	4.2	2.2
谷氨酸	11.2	8.0	12.9	10.5	6.9
脯氨酸	5.0	3.8	4.4	4.5	3.7
甘氨酸	7.8	4.1	6.4	5.9	3.8
丙氨酸	8.5	5.3	10.9	8.5	4.9
缬氨酸	7.2	4.2	7.6	6.9	4.6
甲硫氨酸	—	2.1	3.9	3.2	1.9
异亮氨酸	6.2	3.7	5.1	4.9	3.2
亮氨酸	10.1	5.0	7.8	8.0	4.6
酪氨酸	1.8	2.1	3.6	3.4	2.0
苯丙氨酸	7.1	4.1	6.6	5.1	3.7
胱氨酸	—	—	3.3	—	—
色氨酸	2.3	—	2.2	2.3	1.8
酰胺	—	—	—	—	—
合计	90.1	66.0	109.3	104.8	60.6

注: 1.上海织袜四厂 2.上海立新造纸厂 3.上海炼油厂 4.上海杨浦煤气厂 5.上海禽蛋五厂

白,而菌体蛋白在一般溶剂中是难以溶解的。

用本法测得石油酵母、黄豆豆粉和市售鲜酵母的蛋白含量(占干物质%)分别为45、40、40,与文献相近^[7]。

缩脲法受蛋白质的特异性影响较小。因为试剂易得,操作方便,工作波长在545毫微米,比色测定容易解决。这个方法最大的缺点是灵敏度极差。常规法的最低蛋白用量在0.5毫克左右。我们采用Itzhaki和Gill的试剂和操作步骤^[8],以便消去污泥中的有色物质干扰。

本文提供的蛋白质提取方法和测定步骤,对多数生物材料是适用的。若材料中淀粉含量较高,则应避免加热处理,因为淀粉受热后易成糊精影响蛋白质的抽出。

4. 污泥的毒性成分

根据我们实验室的分析,污泥中吸附或富集有不被分解的毒物。毒物含量随不同污水而异。以四种活性污泥为例,杨浦煤气厂

的汞含量最高,为48.8 ppm;织袜四厂的铜、铅、铬含量最高,分别达1050、255、250 ppm;炼油厂的砷含量为137.5 ppm,织袜厂为88.6 ppm;禽蛋五厂含酚量高达40 ppm(夏季)。抽提后的污泥蛋白中,上述几种毒性成分未见显著减少,有的还有增加。这可能是重金属与蛋白质中的某些基团作不可逆结合之故。这一结果还表明生物具有浓缩有毒有害物质的特殊功能^[6]。所以在处置和利用剩余污泥时,我们必须持十分谨慎的态度。

参 考 文 献

- [1] Gornall, A. G. et al., *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949).
- [2] Levin, R. et al., *J. Lab. Clin. Med.*, **38**, 475 (1951).
- [3] Itzhaki, R. F. et al., *Anal. Biochem.*, **9**, 401 (1964).
- [4] Moore, S. et al., *Anal. Chem.*, **30**, 1185 (1958).
- [5] Knox, R. et al., *Anal. Biochem.*, **36**, 136 (1970).
- [6] Kjeldahl, J., *Z. Anal. Chem.*, **22**, 366 (1883).
- [7] 中国医学科学院卫生研究所, 食物成分表, 人民卫生出版社, 第2版, 1977.
- [8] 山县 登, 生物浓缩(环境科学特论), 东京, 产业图书, 1978.

《环境科学丛刊》创刊启事

中国科学院环境化学研究所主办的《环境科学丛刊》将于1980年1月创刊。本刊主要刊登有关环境科学基础理论、污染治理技术、环境监测分析方法、自然保护等方面的研究成果、专论综述、译文和动态等。

本刊主要供从事环境科学研究、教学、污染治理和监测分析等方面的科技人员参考,也可供高等学校环保专业学生环保管理干部阅读。

本刊每月一期,16开本,全年订价7.20元。

订阅地点: 北京海淀区镇南大街38号刊物征订发行组。银行帐号: 北京市海淀支行48—43(一律信汇)。

本刊编辑部通讯处: 北京市934信箱。