

DOI: 10.11835/j.issn.2096-6717.2020.207

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



# 剩余污泥资源化提取蛋白质方法的优选

潘倩, 刘艳梅, 周贤栋, 潘学军, 杨本芹

(昆明理工大学 环境科学与工程学院, 昆明 650500)

**摘要:** 剩余污泥中蛋白质的资源化利用是目前研究的热点, 污泥预处理则是实现污泥中蛋白质释放的重要途径。为了进一步提高剩余污泥中蛋白质的溶出效果, 选取热碱预处理、超声-碱联合预处理、溶菌酶预处理对污泥进行溶胞, 以蛋白质提取浓度为主要指标进行参数优化, 并利用等电点法对粗提取蛋白进行纯化回收。结果表明: 溶胞效果热碱预处理(pH值13、温度140℃、时间1.5h, 2062.98 mg/L) > 超声-碱联合预处理(497.76 mg/L) > 溶菌酶预处理(269.95 mg/L), 且在pH值为3时热碱预处理蛋白质纯化回收率可达62.42%。试验结果表明: 热碱预处理在提取效果方面较另外两种方法优势明显, 具有良好的利用前景。

**关键词:** 剩余污泥; 热碱预处理; 超声-碱联合预处理; 溶菌酶预处理; 蛋白质

**中图分类号:** X703      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2096-6717(2020)04-0132-09

## Optimal research on methods to extract protein from residual sludge of recycling

PAN Qian, LIU Yanmei, ZHOU Xiandong, PAN Xuejun, YANG Benqin

(Faculty of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, P. R. China)

**Abstract:** The resource utilization of protein in excess sludge is a research hotspot at home and abroad, and sludge pretreatment is an important way to realize protein release from sludge. In order to further improve the dissolution efficiency of protein in excess sludge, this paper selected thermal-alkali pretreatment, ultrasonic-alkali pretreatment and lysozyme pretreatment as the method of disintegration in sludge, and optimized the parameters with the protein extraction concentration as the main index. The isoelectric point method was also used to purify and recover crude protein. The results showed that the cellulolytic effect: thermal-alkali pretreatment (pH 13, temperature 140 °C, time 1.5 h, 2062.98 mg/L) > ultrasonic-alkali pretreatment (497.76 mg/L) > lysozyme pretreatment (269.95 mg/L), and the protein purification recovery of thermal-alkali pretreatment at pH 3 can reach 62.42%. It can be seen from the above test results that the thermal-alkali pretreatment has obvious advantages over the other two methods in terms of extraction effect, deserving of exploitation and utilization.

**Keywords:** excess sludge; thermal-alkali pretreatment; ultrasound-alkali pretreatment; lysozyme pretreatment; protein

**收稿日期:** 2020-11-11

**基金项目:** 国家自然科学基金(No. 51608241)

**作者简介:** 潘倩(1996-), 女, 主要从事剩余污泥的资源化利用研究, E-mail: 547078323@qq.com。

杨本芹(通信作者), 女, 博士, 副教授, E-mail: ynybq87@kust.edu.cn。

**Received:** 2020-11-11

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 51608241)

**Author brief:** PAN Qian (1996-), main research interest: resource utilization of residual sludge, E-mail: 547078323@qq.com.

YANG Benqin (corresponding author), PhD, associate professor, E-mail: ynybq87@kust.edu.cn.

剩余污泥是指污水处理厂在对污水进行生化处理时产生的不同废弃物的混合物。近年来,随着污水处理量的不断增多,剩余污泥的产量也逐年上升,预计2020年—2025年间,污泥的年产量有望突破6000万t(以含水率80%计算)<sup>[1]</sup>。研究表明,剩余污泥的处理处置费用高达整个污水厂总运行费用的65%<sup>[2]</sup>,超过80%的污泥因处理不当成为环境的二次污染源<sup>[3]</sup>。因此,将污泥进行有效处理,以减少其对环境的污染是目前水处理行业发展的重中之重。

剩余污泥中含有大量蛋白质(约占污泥总量的30%~60%),充分利用其中的蛋白质,一方面可以达到污泥资源化的目的,另一方面还能减轻剩余污泥对环境的危害<sup>[4]</sup>。蛋白质资源化途径包括动物饲料、木材粘合剂、泡沫灭火剂以及混凝土发泡剂等。Hwang等<sup>[5]</sup>发现,在污泥中提取出来的蛋白质重金属含量低于法定标准,检测结果中也不含黄曲霉毒素B1、赭曲霉毒素A和沙门氏菌D组等有毒有害物质,且对其进行白鼠试验无明显影响,证实其应用于动物饲料具有可行性。Pervaiz等<sup>[6]</sup>发现,从污泥中回收的蛋白质较未处理的污泥抗剪强度有很大提升,有作为木材粘合剂的巨大潜能。Li等<sup>[7]</sup>发现,对啤酒厂污泥进行处理后,其中提取出的蛋白质可作为复合蛋白发泡剂使用。由此可见,剩余污泥中提取回收的蛋白质有很大的利用空间。

截至目前,剩余污泥中蛋白质的提取技术还未

得到广泛应用,其原因主要是效率低、不经济。污泥预处理是目前使用最多的提高蛋白质溶出效率的方法,其中主要包含热预处理<sup>[8]</sup>、碱预处理<sup>[9]</sup>、臭氧预处理<sup>[10]</sup>、超声预处理<sup>[11]</sup>、酶预处理<sup>[12]</sup>以及其中几种处理方式形成的联合预处理。在单独预处理方式中,不同的预处理方式都存在其相应的缺点,例如,热预处理能耗较高,碱预处理对仪器腐蚀较大,臭氧预处理适用范围过窄,超声预处理难以应用到实际工程中等<sup>[13]</sup>。联合预处理是基于不同预处理方式的作用条件,充分考虑其协同作用,进一步提高污泥细胞的溶解效率的一种高效预处理方法。目前,大部分研究者对单独的预处理提取蛋白质进行了许多条件优化,但很少有对不同预处理方法进行比较并对所提取的蛋白质进行纯化回收的研究。

笔者采用热碱联合预处理<sup>[14]</sup>、超声碱联合预处理<sup>[15]</sup>和溶菌酶预处理<sup>[16]</sup>3种预处理方法,通过对溶出蛋白质浓度进行分析,探究其发挥破胞作用的最优条件,并分别比较3种方法提取蛋白质的效果,最后优化等电点法,确定回收纯化蛋白质的最佳pH值,旨在为污泥中蛋白质的提取利用提供相应参考。

## 1 材料与方法

剩余污泥取自昆明市污水厂的污泥浓缩池,该厂内采用A<sup>2</sup>/O(Anaerobic-Anoxic-Oxic)工艺进行污水生物处理。剩余污泥主要理化性质如表1所示。

表1 污泥基本性质

Table 1 Characteristics of raw sludge

pH值	TS/ (mg·L <sup>-1</sup> )	SS/ (mg·L <sup>-1</sup> )	TCOD/ (mg·L <sup>-1</sup> )	SCOD/ (mg·L <sup>-1</sup> )	SP <sub>1</sub> / (mg·L <sup>-1</sup> )	TP/ (g·(100g) <sup>-1</sup> )	SP <sub>2</sub> / (mg·L <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/ (mg·L <sup>-1</sup> )
7.3±0.1	21 590±240	19 970±230	13 450±125	158±8	18.48±1.21	18.92±1.66	31.15±2.83	8.36±0.56

注:SP<sub>1</sub>:可溶性蛋白质;TP:总蛋白质;SP<sub>2</sub>:可溶性多糖。

试验以蛋白质浓度为指标来确定各项预处理方法的最优破胞条件。原始污泥总蛋白浓度使用凯氏定氮法<sup>[17]</sup>测定,离心后的上清液中蛋白质采用BCA蛋白质试剂盒<sup>[18]</sup>结合酶标仪(Multiskan<sup>TM</sup> FC,赛默飞世尔科技)测定。

凯氏定氮法蛋白质计算见式(1)。

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 0.014}{m \times V_3 / 100} \times F \times 100 \quad (1)$$

式中:X为蛋白质含量,g/(100g);V<sub>1</sub>为试液消耗盐酸标准滴定液的体积,mL;V<sub>2</sub>为试剂空白消耗盐

酸标准滴定液的体积,mL;c为盐酸标准滴定液的浓度,mol/L;m为试样的质量,g;V<sub>3</sub>为吸取消化液的体积,mL;F为氮换算为蛋白质的系数,取6.25。

## 2 试验设计

将污水厂所取剩余污泥浓度调至约20000mg/L,然后分别进行试验。

### 2.1 热碱破解剩余污泥试验

热碱破解污泥试验主要从pH值、温度、时间3

个影响因素来考察污泥溶胞效果,设置如下单因素试验:

1) pH 优化试验。参照崔静等<sup>[19]</sup>和翟世民等<sup>[20]</sup>的研究,在破胞温度为 140 °C、时间为 2 h 的条件下,在 5 个烧杯中分别取 100 mL 的剩余污泥,用 4 mol/L 的 NaOH 溶液将 pH 值分别调至 9、10、11、12 和 13 后在恒温箱(XMTD-8222,上海精宏实验设备有限公司)中进行溶胞,优化出最优 pH 值。

2) 温度优化试验。在 6 个烧杯中分别取 100 mL 剩余污泥,恒温箱温度分别调节为 100、120、140、160、180、200 °C,在优化得到的最优 pH 值条件下破胞 2 h,得到最优温度。

3) 时间优化试验。在 6 个烧杯中分别取 100 mL 剩余污泥,在得到的最优 pH 值和温度下,分别破胞 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h,若此步优化得出的试验结果与前两步优化时所用时间不一致,则用该步骤得到的最优时间重复前两个步骤,得出最终试验结果。

## 2.2 超声-碱联合破解污泥试验

超声联合碱破解污泥试验主要从 pH 值、超声功率、超声时间 3 个影响因素考察污泥破胞效果,设定如下单因素试验:

1) pH 值优化试验。参照康晓荣<sup>[21]</sup>的研究,在溶胞功率为 3 W/mL(超声期间超声 3 s 停 1 s)、时间为 30 min 的条件下,在 5 个烧杯中分别取 100 mL 剩余污泥,用 4 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值,依次为 9、10、11、12 和 13,进行破胞,优化出最优 pH 值。

2) 功率优化试验。在 6 个烧杯中分别取 100 mL 剩余污泥,在最优 pH 值条件下调节超声功率,依次为 1、2、3、4、5、6 W/mL,破胞 30 min,优化出最优功率。

3) 时间优化试验。在 5 个烧杯中分别取 100 mL 剩余污泥,在得到的最优 pH 值和超声功率条件下依次破胞 10、20、30、40、50 min,若此步优化得出的试验结果与前两步优化时所用时间不一致,则用该步骤得到的最优时间重复前两个步骤,得出最终试验结果。

## 2.3 溶菌酶破解污泥试验

溶菌酶(溶菌酶冻干粉,北京索莱宝科技有限公司)破解试验主要从 pH 值、酶浓度、处理时间 3 个影响因素来考察污泥的破胞效果,设定如下单因素

试验:

1) pH 值优化试验。溶菌酶试验参照陆钧皓<sup>[22]</sup>的研究,在 12 个烧杯中分别取 100 mL 剩余污泥,其中 6 个保持酶浓度在 200 mg/g,依次调节 pH 值为 4、5、6、7、8、9,于室温下破胞 4 h;另外 6 个在不加酶的情况下,依次调节 pH 值为 4、5、6、7、8、9,于室温下破胞 4 h;依据两者差值即可分析酶单独作用时的最优 pH 值。

2) 酶浓度优化试验。在 7 个烧杯中分别取 100 mL 等浓度的剩余污泥,依次调节烧杯酶浓度为 60、90、120、150、200、250、280 mg/g,在确定的最优 pH 值和室温下破胞 4 h,优化出最优酶浓度。

3) 时间优化试验。在 7 个烧杯中分别取 100 mL 等浓度的剩余污泥,调节酶浓度及 pH 值为确定的最优值,室温下依次反应 2、3、4、5、6、7、8 h,若此步优化得出的试验结果与前两步优化时所用时间不一致,则用该步骤得到的最优时间重复前两个步骤,得出最终试验结果。

经以上每种因素预处理后的污泥溶液均在 8 000 rpm 高速冷冻离心机上离心 20 min,离心后上清液过 0.45 μm 滤膜,取滤液进行蛋白质的浓度测定,以得到高效经济的预处理方法及其最优作用条件。

## 2.4 溶菌酶对提取后蛋白质的影响

以热碱预处理为例,测定热碱预处理后的蛋白质溶液,得到蛋白质浓度值  $P_1$ 。再分别称取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g 的溶菌酶冻干粉加入 100 mL 水中,得到 6 种不同浓度的溶菌酶溶液,测定蛋白质浓度依次为  $Q_1$ 、 $Q_2$ 、 $Q_3$ 、 $Q_4$ 、 $Q_5$ 、 $Q_6$ 。取预处理后的蛋白质溶液,分别与 6 种配制溶菌酶溶液各 5 mL 进行混合,得到 10 mL 不同浓度蛋白质混合液,测定蛋白质浓度依次为  $Z_1$ 、 $Z_2$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 、 $Z_5$ 、 $Z_6$ 。最后检验等式(2)是否成立,以探究溶菌酶对提取后蛋白质浓度的影响。

$$\frac{P_1 \times 5 + Q_x \times 5}{10} = Z_x \quad (2)$$

式中, $x$  的取值范围为 1~6。

## 2.5 等电点回收蛋白质试验条件优化

将试验得到的上清液称为蛋白溶液。在 6 个烧杯中分别取 100 mL 蛋白溶液,利用 2 mol/L 的硫酸溶液调节其 pH 值,依次为 1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 和 5,然后于 -4 °C 冰箱静置 1.5 h,将静置后的蛋白溶液于 8 000 rpm 下离心 20 min,得到的上清

液过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜,取部分滤液分别进行蛋白质浓度测定,剩下的滤液再分别通过纤维素透析袋(截留分子量 20 000 Da)纯化备用。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 热碱预处理参数的确定

如图 1(a)所示,随着 pH 值的升高,溶液中蛋白质浓度逐渐升高,在 pH 为 12~13 区间显著增加。当 pH=13 时,溶液中蛋白质浓度达到最大值 2 515.55 mg/L(考虑到碱性过高对污泥处理实际意义不大,较高 pH 值会使污泥产生大量褐变反应<sup>[23]</sup>,使其中小分子发生聚集,预处理效果反而会降低,故将 pH=13 设为最大值)。这说明当 pH<12 时,污泥细胞的溶解程度不高,当 pH>12 时,污泥溶胞率明显上升。在高温的协助作用下,强碱可以与细胞中的脂类物质发生皂化反应<sup>[24]</sup>,加速破坏污泥中的细胞结构。除此之外,强碱具有化学和电离的双重作用,更容易使污泥中的微生物细胞发生溶解,进而使胞内物质溶出<sup>[25]</sup>,故选取 pH 值为 13 为最佳碱强度。

如图 1(b)所示,热碱处理中蛋白质浓度随着温度的升高而逐渐升高,在 140  $^{\circ}\text{C}$  时达到最大值 1 810.87 mg/L,当温度超过 140  $^{\circ}\text{C}$  后,蛋白质浓度呈下降趋势。热碱处理过程中,随着温度的升高,污泥中的微生物絮体结构开始分散,细胞壁和细胞质也在高温的作用下溶解,导致细胞内大量有机物溶出。大分子蛋白质也在高温作用下变成小分子蛋白质,使溶液中蛋白质浓度逐渐升高<sup>[26]</sup>。与此同时,在碱性条件下,过高的温度会使蛋白质水解为氨基酸, $\beta$ -氨基酸是其主要成分,而  $\beta$ -氨基酸在高温条件下会发生脱氨反应,生成氨气和不饱和羧酸盐,在强碱条件下,氨气会从溶液中溢出故溶液中溶解性蛋白质的浓度会降低<sup>[27]</sup>。

图 1(c)所示为热碱预处理时间对蛋白质浓度的影响,热碱处理前期,溶液中蛋白质浓度随时间逐渐增加,在处理时间为 1.5 h 时达到最大值 2 068.46 mg/L,后期随着时间的增加,蛋白质浓度缓慢下降。这是因为在热碱反应中胞内物质的释放和蛋白质的水解是同时进行的,在前 1.5 h,参照 Fan 等<sup>[28]</sup>的试验结论,因为细胞内物质释放速率大于蛋白质的碱性水解作用,故蛋白质浓度呈现上升趋势,1.5 h 后,蛋白质的水解速率大于胞内蛋白质溶出速率,故蛋

白质浓度呈现下降趋势。Li 等<sup>[29]</sup>的研究结果表明,碱破解污泥细胞的过程分为快速和慢速阶段,大部分的胞内有机物质会在前 30 min 被释放出来,因此,考虑到经济和溶胞效果,选取 1.5 h 为最佳预处理时间。

以上 3 个单因素试验结果确定了热碱处理的最优条件为:pH 值 13、时间 1.5 h、温度 140  $^{\circ}\text{C}$ ,与预设条件存在相应误差,可能是因为污泥性质和试验条件的差异。考虑到试验误差情况,取三者蛋白质最大浓度的平均值,即热碱预处理在最佳条件下可使溶液中蛋白质浓度达到 2 062.98 mg/L。

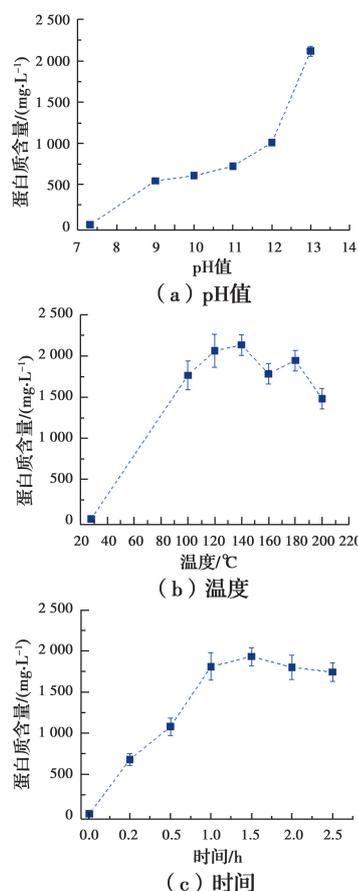


图 1 热碱提取中 pH 值、温度及时间与溶液中蛋白质浓度的关系

Fig. 1 pH value, temperature and time in relation to protein concentration in solution during the thermal-alkali pretreatment

#### 3.2 超声-碱联合预处理参数的确定

由图 2(a)可知,在超声联合碱预处理污泥时,碱的强度至关重要。当 pH<12 时,随着碱强度的增加,溶液中蛋白质浓度不断增加,在 pH 值为 12 时达到最大值 488.73 mg/L,当 pH>12 时,蛋白质浓度开始下降。因为超声波具有破坏污泥絮体结构

的作用,当声波能量达到一定值时,污泥絮体结构分散,加大污泥颗粒与碱的接触面积,提高碱对细胞壁的破坏作用,碱性越强对污泥的溶胞效果越明显<sup>[30]</sup>。但在超声作用下,碱性过强会加快溶液中部分有机物的分解,进而导致溶液中蛋白质含量降低。

图 2(b)显示,在预处理时间为 30 min、pH 值为 12 的条件下,当功率为 1 W/mL 时,蛋白质浓度达到 388.35 mg/L,当功率继续增加至 4 W/mL 时,蛋白质浓度逐渐降低,但当功率为 5 W/mL 时,蛋白质浓度迅速增加至最大值 497.89 mg/L,后期随着功率的增加,蛋白质浓度再次呈下降趋势。超声波在联合碱预处理时,主要凭借其空化作用<sup>[31]</sup>(通过剪切液体形成空化核)和声化学作用<sup>[32]</sup>(通过超声波加速反应的进行或产生新的化学物质)达到溶胞的目的。在功率由 1 W/mL 增加到 4 W/mL 的阶段,蛋白质浓度降低的原因可能是污泥絮体粒径过大,碱未能很好地发挥作用,超声功率的增加反而加快了蛋白质的水解速率。超声与碱联合作用时存在最适功率和最佳粒径的说法<sup>[33]</sup>,只有污泥经过一定功率的超声后,在剪切作用下分散成最佳粒径大小,这时碱才能发挥其最大破坏作用使细胞内容物流出。试验证明了 5 W/mL 为该试验条件下的最优功率。

如图 2(c)所示,当时间小于 30 min 时,蛋白质浓度随着时间的增加呈现上升趋势,30 min 时达到 499.48 mg/L,30 min 以后蛋白质浓度趋于平稳。在试验前期,超声波和碱同时起作用,加速了污泥絮体结构的分解和细胞壁的破碎,促使蛋白质浓度不断增加。但反应持续一段时间后,一方面由于碱的消耗导致碱性下降,未能起到跟初期相同的碱解作用,另一方面超声波单独作用时破解细胞需要的能量更大,随着碱解作用的降低,单独的超声作用只能破坏很小一部分污泥细胞,导致后期蛋白质浓度不再有明显增加<sup>[34]</sup>。

试验结果确定了超声联合碱预处理的最佳条件为:pH 值 12、功率 5 W/mL、时间 30 min。相同地,考虑到试验误差取三者蛋白质最大浓度的平均值,即在超声联合碱预处理的最优作用条件下可使溶液中蛋白质浓度达到 497.76 mg/L。

### 3.3 溶菌酶预处理参数的确定

在酶浓度为 200 mg/g、时间为 6 h 的条件下,在 pH 值跨度 4~9 的条件下试验研究了 pH 值的单独作用效果,同时,以相同 pH 值跨度研究溶菌酶的作

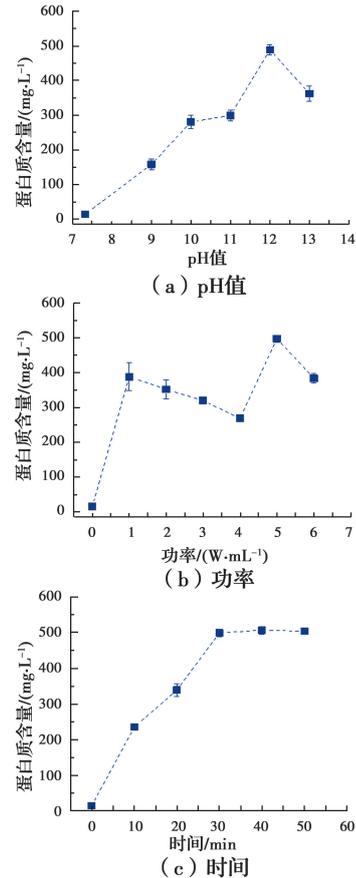


图 2 超声联合碱提取中 pH 值、功率及时间与溶液中蛋白质浓度的关系

Fig. 2 pH value, power and time in relation to protein concentration in solution during the ultrasonic-alkali pretreatment

用效果,两者的差值即为溶菌酶单独作用时的效果。如图 3(a)差值变化曲线所示,当 pH 值等于 7 时,酶单独起作用时溶液中蛋白质浓度达到 241.06 mg/L,且高于其他任何 pH 值下的浓度。pH 值是影响溶菌酶水解污泥的一个重要因素,过酸或过碱都会对酶发挥其最大活性产生影响。酶分子在不同的 pH 值溶液中具有不同解离状态,固定的某种解离状态只能与一种底物结合酶活性才能达到最高。除此之外,pH 值也会影响酶分子中某些基团的解离,酶底物的专一性、酶分子活性中心的构象等都会影响这些基团的解离状态,进而影响酶的活性<sup>[35]</sup>。

如图 3(b)所示,当酶浓度较低时,溶液中蛋白质浓度随着酶浓度的增高而增高,后期随着酶浓度的增高,蛋白质浓度增加趋势较为平缓。当溶菌酶浓度为 200 mg/g 时,溶液中蛋白质浓度达到最高值 297.14 mg/L。这是因为随着前期酶浓度的增加,

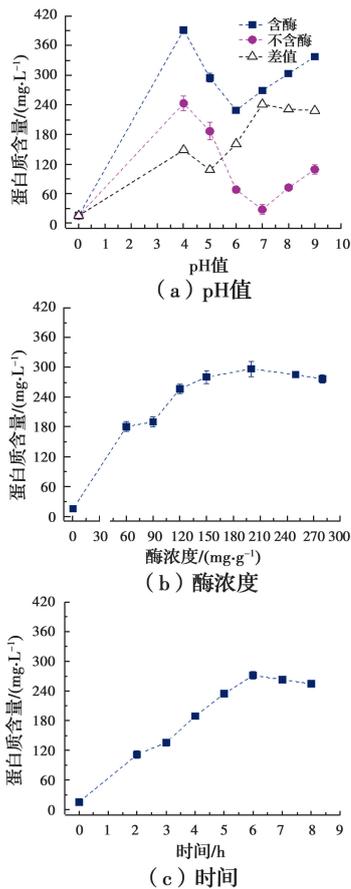


图 3 溶菌酶提取中 pH 值、酶浓度及时间与溶液中蛋白质浓度的关系

Fig. 3 pH value, enzyme concentration and time in relation to protein concentration in solution in lysozyme pretreatment

底物开始与酶接触反应,促使大量的有机物质由固相转移到液相中,使得溶液中蛋白质浓度逐渐升高。但当反应体系中所有底物与所投加溶菌酶充分接触后,底物几乎已全部与酶分子结合形成络合物<sup>[36]</sup>,故当酶量增加时,溶液中蛋白质浓度不再显著增加。

如图 3(c)所示,当反应时间小于 6 h 时,随着反应时间的增加,溶液中蛋白质浓度逐渐增加,在 6 h 时达到 271.65 mg/L,当反应时间大于 6 h 时,蛋白质浓度呈明显降低的趋势。反应时间是酶发挥活性的一个重要因素,只有当在酶与底物充分接触,充分反应之后,污泥才能最大程度地释放其内含物,进而使得溶液中蛋白质浓度上升。在反应的前 6 h 内,在外界振荡和恒温条件下,酶与剩余污泥不断反应,使得污泥被水解并释放出大量胞内物,导致溶液中蛋白质浓度上升,当大于 6 h 后,溶菌酶已与底物充分接触反应,此时蛋白质的水解速度大于其释放速

度,进而溶液中蛋白质浓度呈下降趋势。

由以上 3 个因素影响试验确定溶菌酶预处理的最优条件为:pH 值 7、酶浓度 200 mg/g,时间 6 h,在最优作用条件下,可使溶液中蛋白质浓度达到 269.95 mg/L。

通过对 3 种方法的结果对比,得出热碱法(2 062.98 mg/L)>超声联合碱法(497.76 mg/L)>溶菌酶法(269.95 mg/L),故选取热碱法进行下一步试验。

经过预处理后的蛋白质可能会发生部分变性,但不影响后期对提取蛋白质粘度特性<sup>[37]</sup>,故暂时不用考虑蛋白质变性对试验结果的影响。

### 3.4 溶菌酶对提取后蛋白质的影响结果

如图 4 所示,A、B、C、D、E、F 分别代表提取蛋白质溶液分别与 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 g/mL 的溶菌酶溶液混合得到的蛋白质浓度理论值与实际值。由图 4 可以看出,理论值与实际值差距很小,几乎可以忽略,溶菌酶对提取蛋白质浓度几乎无影响。溶菌酶的作用机制主要是针对细胞壁上的肽聚糖,通过肽键上的活性部位水解切断 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键,从而达到破坏细胞壁的作用,对蛋白质没有破坏作用,这与试验得出的结论一致<sup>[38]</sup>。

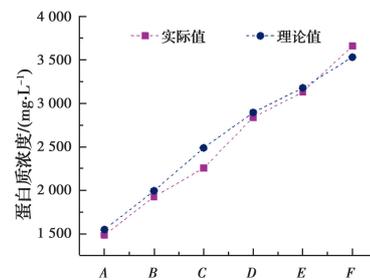


图 4 热碱处理提取蛋白质溶液与不同浓度溶菌酶溶液混合后蛋白质浓度的理论值与实践值

Fig. 4 Theoretical and practical values of protein concentration after thermal-alkali treatment with different concentration of lysozyme solution

### 3.5 等电点回收蛋白质试验结果

图 5 显示了由热碱法提取的上清液采用等电点法回收蛋白质随 pH 值的影响,蛋白质回收率随 pH 值的增加呈先上升后下降的趋势,当 pH 值为 3 时,蛋白质的回收率达到最大值 62.42%。蛋白质是由多种氨基酸连接而成的生物大分子,两性电解质,在偏酸和偏碱溶液中会分别带正电和负电。通过调节

pH 值的大小可破坏或削弱分子表面的水化膜和双电层,使分子间引力增加,进而降低蛋白质在溶液中的溶解度,变为沉淀析出<sup>[39]</sup>。Hwang 等<sup>[5]</sup>发现,在 pH 值为 3.3 时城市污泥蛋白质回收率最高,其结论与本研究相符。

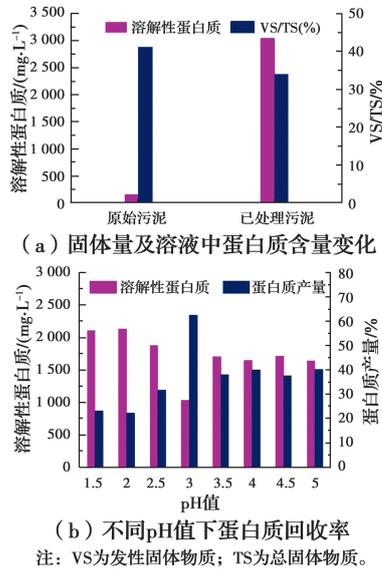


图 5 热碱处理后污泥固体量和溶液中溶解性蛋白质的变化及 pH 值对蛋白质回收率的影响

Fig. 5 Changes in sludge solids and soluble protein of solution after thermal-alkali pretreatment and effect of pH on protein recovery yield

## 4 结论与展望

采用热碱法、超声-碱联合法、溶菌酶法分别对剩余污泥进行预处理,得出最优预处理条件,对比提取效率可看出:热碱法(pH 值 13、温度 140 °C、时间 1.5 h, 2 062.98 mg/L) > 超声联合碱法(pH 值 12、功率 5 W/mL、时间 30 min, 497.76 mg/L) > 溶菌酶法(pH 值 7、酶浓度 200 mg/g、时间 6 h, 269.95 mg/L),对热碱法提取的上清液采用等电点法回收蛋白质,在 pH 值为 3 时蛋白质的回收率最高,为 62.42 %。

剩余污泥中的蛋白质具有较大的利用潜能,但目前蛋白质的提取方法仍存在能耗大、二次污染等问题,许多技术和应用环节还不够成熟,仍需要不断完善。因此,在剩余污泥蛋白质的提取及应用上还可开展大量的研究工作。

## 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, 43(12): 1-5.  
DAI X H. Consideration on the necessity and urgency of stabilization treatment of sewage sludge in urban sewage treatment plants [J]. Water & Wastewater Engineering, 2017, 43(12): 1-5. (in Chinese)
- [2] APPELS L, BAEYENS J, DEGRÈVE J, et al. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge [J]. Progress in Energy and Combustion Science, 2008, 34(6): 755-781.
- [3] FENG L Y, LUO J Y, CHEN Y G. Dilemma of sewage sludge treatment and disposal in China [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(8): 4781-4782.
- [4] XIAO K K, ZHOU Y. Protein recovery from sludge: a review [J]. Journal of Cleaner Production, 2020, 249: 119373.
- [5] HWANG J, ZHANG L, SEO S, et al. Protein recovery from excess sludge for its use as animal feed [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(18): 8949-8954.
- [6] PERVAIZ M, SAIN M. Protein extraction from secondary sludge of paper mill wastewater and its utilization as a wood adhesive [J]. Bioresources, 2011, 6(2): 961-970.
- [7] LI P, DENG F, ZHU H B, et al. Study of a complex protein foaming agent from disintegrated brewery sludge supernatant [J]. Desalination and Water Treatment, 2017, 95: 200-207.
- [8] VELUCHAMY C, KALAMDHAD A S. Enhancement of hydrolysis of lignocellulose waste pulp and paper mill sludge through different heating processes on thermal pretreatment [J]. Journal of Cleaner Production, 2017, 168: 219-226.
- [9] DASGUPTA A, CHANDEL M K. Enhancement of biogas production from organic fraction of municipal solid waste using hydrothermal pretreatment [J]. Bioresource Technology Reports, 2019, 7: 100281.
- [10] RAJESH BANU J, ARULAZHAGAN P, ADISH KUMAR S, et al. Anaerobic co-digestion of chemical- and ozone-pretreated sludge in hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor [J]. Desalination and Water Treatment, 2015, 54(12): 3269-3278.

- [11] LIU X L, LIU H, DU G C, et al. Improved bioconversion of volatile fatty acids from waste activated sludge by pretreatment [J]. *Water Environment Research*, 2009, 81(1): 13-20.
- [12] GAO J L, WENG W, YAN Y X, et al. Comparison of protein extraction methods from excess activated sludge [J]. *Chemosphere*, 2020, 249: 126107.
- [13] 郝晓地, 蔡正清, 甘一萍. 剩余污泥预处理技术概览 [J]. *环境科学学报*, 2011, 31(1): 1-12.  
HAO X D, CAI Z Q, GAN Y P. Review of pretreatment technologies for excess sludge [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(1): 1-12. (in Chinese)
- [14] TYAGI V K, LO S L. Enhancement in mesophilic aerobic digestion of waste activated sludge by chemically assisted thermal pretreatment method [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 119: 105-113.
- [15] CHANG C J, TYAGI V K, LO S L. Effects of microwave and alkali induced pretreatment on sludge solubilization and subsequent aerobic digestion [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17): 7633-7640.
- [16] CHEN J, LIU S, WANG Y, et al. Effect of different hydrolytic enzymes pretreatment for improving the hydrolysis and biodegradability of waste activated sludge [J]. *Water Science and Technology*, 2018, 2017(2): 592-602.
- [17] KJELDAHL J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern [J]. *Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 1883, 22(1): 366-382.
- [18] 韩富亮, 袁春龙, 郭安鹊, 等. 二喹啉甲酸法(BCA)分析蛋白多肽的原理、影响因素和优点 [J]. *食品与发酵工业*, 2014, 40(11): 202-207.  
HAN F L, YUAN C L, GUO A Q, et al. The principle, influence factors and advantages of bicinchoninic acid method (BCA) for protein and peptide assay [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2014, 40(11): 202-207. (in Chinese)
- [19] 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.  
CUI J, DONG A J, ZHANG W J, et al. Experimental investigation of extracting protein by alkaline thermal sludge hydrolysis from sludge [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 3(10): 1889-1892. (in Chinese)
- [20] 翟世民, 肖本益, 郭雪松, 等. 响应面优化热碱回收污泥蛋白质条件的研究 [J]. *给水排水*, 2016, 42(Sup1): 113-117.  
ZHAI S M, XIAO B Y, GUO X S, et al. Study on response surface optimization of protein conditions for thermal-alkali recovery of sludge [J]. *Water & Wastewater Engineering*, 2016, 42(Sup1): 113-117. (in Chinese)
- [21] 康晓荣. 超声联合碱促进剩余污泥水解酸化及产物研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.  
KANG X R. Study on hydrolysis and acidification of activated sludge enhanced by ultrasound combined with alkaline [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2013. (in Chinese)
- [22] 陆钧皓. 复合酶水解法提取剩余污泥中蛋白质的研究 [D]. 上海: 东华大学, 2015.  
LU J H. Extraction of proteins from excess activated sludge by composite enzymatic hydrolysis [D]. Shanghai: Donghua University, 2015. (in Chinese)
- [23] LEE I, HAN J I. The effects of waste-activated sludge pretreatment using hydrodynamic cavitation for methane production [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, 20(6): 1450-1455.
- [24] HÄNER A, MASON C A, HAMER G. Death and lysis during aerobic thermophilic sludge treatment: Characterization of recalcitrant products [J]. *Water Research*, 1994, 28(4): 863-869.
- [25] 盛广宏, 陈蓓蓓, 刘金凤. 热碱处理破解污泥效果研究 [J]. *环境科技*, 2013, 26(2): 38-42.  
SHENG G H, CHEN B B, LIU J F. Investigation on sludge hydrolysis by alkaline-thermal treatment [J]. *Environmental Science and Technology*, 2013, 26(2): 38-42. (in Chinese)
- [26] CARRÈRE H, DUMAS C, BATTIMELLI A, et al. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 183(1/2/3): 1-15.
- [27] 李刚, 王格格, 陆江银, 等. 干馏法处理污泥制备生物炭的研究进展 [J]. *现代化工*, 2015, 35(2): 32-35.  
LI G, WANG G G, LU J Y, et al. Research progress in preparation of biochar from sewage sludge by dry distillation method [J]. *Modern Chemical Industry*, 2015, 35(2): 32-35. (in Chinese)
- [28] FAN S S, TANG J, WANG Y, et al. Biochar prepared from co-pyrolysis of municipal sewage sludge and tea

- waste for the adsorption of methylene blue from aqueous solutions: Kinetics, isotherm, thermodynamic and mechanism [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2016, 220: 432-441.
- [29] LI H, JIN Y Y, MAHAR R, et al. Effects and model of alkaline waste activated sludge treatment [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 5140-5144.
- [30] 张婧伟, 白周央, 杨树成. 超声-碱预处理以促进污泥水解效率的研究进展[J]. *工业水处理*, 2020, 40(4): 12-17.
- ZHANG J W, BAI Z Y, YANG S C. Research progress on the improvement of hydrolysis efficiency by ultrasonic-alkali pretreatment of sludge [J]. *Industrial Water Treatment*, 2020, 40(4): 12-17. (in Chinese)
- [31] FENG R, ZHAO Y Y, BAO C G. Sonochemistry in China [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1997, 4(2): 183-187.
- [32] TIEHM A, NICKEL K, ZELLHORN M, et al. Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization [J]. *Water Research*, 2001, 35(8): 2003-2009.
- [33] 杨洁, 季民, 韩育宏, 等. 污泥碱解和超声破解预处理的效果研究[J]. *环境科学*, 2008, 29(4): 1002-1006.
- YANG J, JI M, HAN Y H, et al. Effect of alkaline and ultrasonic pretreatment on the sludge disintegration [J]. *Environmental Science*, 2008, 29(4): 1002-1006. (in Chinese)
- [34] 戴前进, 方先金, 邵辉煌. 城市污水处理厂污泥厌氧消化的预处理技术[J]. *中国沼气*, 2007, 25(2): 11-14, 19.
- DAI Q J, FANG X J, SHAO H H. Pretreatment methods of anaerobic digestion of sludge from wastewater treatment plant [J]. *China Biogas*, 2007, 25(2): 11-14, 19. (in Chinese)
- [35] SUZUKI Y, KONDA E, HONDOH H, et al. Effects of temperature, pressure, and pH on the solubility of triclinic lysozyme crystals [J]. *Journal of Crystal Growth*, 2011, 318(1): 1085-1088.
- [36] DAVIDSSON Å, WAWRZYNCZYK J, NORRLÖW O, et al. Strategies for enzyme dosing to enhance anaerobic digestion of sewage sludge [J]. *Journal of Residuals Science and Technology*, 2007, 4(1): 1-7.
- [37] SOUCY J, KOUBAA A, MIGNEAULT S, et al. The potential of paper mill sludge for wood-plastic composites [J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 54: 248-256.
- [38] PELLEGRINI A, THOMAS U, VON FELLEBERG R, et al. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, 72(3): 180-187.
- [39] 秦晓. 剩余污泥中蛋白质的分离及其性质分析[D]. 天津: 天津大学, 2012.
- QIN X. Separation of protein from excess sludge and analysis of the protein properties [D]. Tianjin: Tianjin University, 2012. (in Chinese)

(编辑 章润红)