

文章编号: 1673 1689(2011)01-0113-05

# 木薯酒精废水高温厌氧消化系统中酶的提取与分布的研究

王柯<sup>1,2</sup>, 毛忠贵\*<sup>1,2</sup>, 张成明<sup>1,2</sup>, 张庆华<sup>1,2</sup>, 陈程<sup>1,2</sup>,  
王欣<sup>1,2</sup>, 姜立<sup>1,2</sup>, 何江<sup>1,2</sup>, 张建华<sup>1,2</sup>, 张宏建<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 木薯酒精废水中固形物(干基)的主要成分为纤维素和半纤维素,分别为 30% 和 18%。由于内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖苷酶(CMC 酶)和木聚糖酶在高温厌氧消化过程中对纤维素和半纤维素的水解起关键作用,作者比较了从厌氧污泥中提取 CMC 酶和木聚糖酶的 6 种方法,并分析了其在厌氧污泥中的分布情况。结果表明,用质量分数 1% Triton X-100 来提取 CMC 酶和木聚糖酶是一种高效且温和的酶提取方法,且至少有占总酶质量 90% 的 CMC 酶和 70% 的木聚糖酶分布在污泥絮凝体(细胞表面或胞外聚合物)中。

**关键词:** 木薯酒精废水; 高温厌氧消化; 内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖苷酶(CMC 酶); 木聚糖酶; 胞外聚合物  
中图分类号: TS 262.2 文献标识码: A

## Studies on the Extraction and Distribution of the Enzymes in the Thermophilic Anaerobic Digestion System of Cassava Ethanol Wastewater

WANG Ke<sup>1,2</sup>, MAO Zhong-gui\*<sup>1,2</sup>, ZHANG Cheng-ming<sup>1,2</sup>, ZHANG Qing-hua<sup>1,2</sup>,  
CHEN Cheng<sup>1,2</sup>, WANG Xin<sup>1,2</sup>, JIANG Li<sup>1,2</sup>, HE Jiang<sup>1,2</sup>,  
ZHANG Jia-hua<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong-jian<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;  
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The main components of the solid content in the cassava ethanol wastewater were cellulose and hemicellulose, which account for about 30% and 18%, respectively. Because the endo- $\beta$ -1,4-glucanase(CMCase) and xylanase played a key role in hydrolyzing cellulose and hemicellulose during the thermophilic anaerobic digestion process, six methods for extracting CMCase and xylanase from the anaerobic sludge were compared and the distribution of these enzymes in the sludge was also investigated in this study. The results demonstrated the extraction of CMCase and xylanase using 1% Triton X-100 was an efficient and gentle method,

收稿日期: 2010-04-09

基金项目: 国家“863”项目(2008AA10Z338)。

\* 通信作者: 毛忠贵(1954-), 男, 江苏南京人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事生物资源高值化和清洁生产研究。Email: maozg@vip.163.com

meanwhile, at least 90% of CMCase and 70% of xylanase were immobilized on the flocs (the surface of cells or the extracellular polymeric substances).

**Key words:** cassava ethanol wastewater, thermophilic anaerobic digestion, endo- $\beta$ -1,4 glucanase (CMCase), xylanase, extracellular polymeric substances

燃料酒精作为一种可以代替石油等化石燃料的可再生的绿色能源,一直受到广泛的关注。在生产燃料酒精的众多原料中,木薯作为一种非粮原料,由于其具有不占耕地、产量高、分布广等优点,已被公认为是一种很有潜力的燃料酒精生产原料。然而,木薯酒精生产过程会产生大量的废水。一般而言,每生产1 t燃料酒精约排放12 t左右的高浓度、高悬浮物(主要为纤维类物质)、酸性较强的废水。酒精废水的治理问题已成为制约整个燃料酒精行业大规模发展的瓶颈。作者在多年实践基础上,提出了木薯燃料酒精“零能耗,零污染”发展趋势的观点<sup>[1]</sup>,为木薯燃料酒精废水的处理提供了一条崭新的思路。

实现木薯燃料酒精“零能耗、零污染”的关键是,在木薯酒精废水的厌氧消化过程中提高废水中纤维类物质向甲烷转化的效率,并将废水中的COD浓度降低至某一水平以利于其循环使用<sup>[2]</sup>。在厌氧消化过程中,只有小分子物质( $1 \times 10^6$ )才能穿过细胞膜进入细胞参与新陈代谢。大分子有机物质(如纤维素、蛋白质、脂肪等)必须经过一系列的酶解反应水解为小分子物质,才能被污泥中的微生物吸收利用<sup>[3-5]</sup>。由于纤维类物质较难被生物水解,因此,纤维类物质的水解即成为整个厌氧消化过程的限速步骤。催化这些水解反应的纤维素酶、半纤维素酶等水解酶在厌氧消化过程中发挥着重要的作用,它们的活性能够直接反映微生物水解纤维类物质的能力。因此,研究酒精废水厌氧消化系统中这些水解酶的活性及分布特性,对监控厌氧消化过程,优化厌氧消化操作,提高纤维类物质向甲烷转化的转化率,都有着积极的作用。

近年来,从酶学角度对废水生物处理系统进行研究已引起国内外越来越多学者的重视<sup>[3-4,6-8]</sup>。这些研究主要是针对废水处理系统中酶的活性及分布展开,研究发现,厌氧反应区没有厌氧污泥的水相中酶含量很少,酶主要分布在厌氧污泥的絮凝体中(或吸附于细胞表面,或包埋在胞外聚合物中)<sup>[3-4]</sup>。因此,为了研究酶的活性,首先需要从絮凝体中将酶提取出来。然而到目前为止,还没有从

絮凝体中提取酶的标准方法。目前,国内外在这方面的研究主要是针对市政垃圾等的生物处理系统中的水解酶进行的,而关于木薯酒精废水厌氧消化系统中水解酶的研究却没人涉及。

作者通过对木薯酒精废水的成分分析,找出废水固形物中的主要成分,以此为依据,研究木薯酒精废水高温厌氧消化系统中相应水解酶的提取方法及分布情况。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

**1.1.1 原料** 木薯酒精废水:取自作者所在实验室10 L酒精发酵罐木薯酒精发酵所得废水;厌氧污泥样品:取自作者所在实验室运行的UASB(upflow anaerobic sludge bed)反应器,反应器有效容积为12 L,其中反应区为10 L,沉降区为2 L,以恒温循环水浴控制反应区温度在 $(60 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,水力停留时间6 d。

**1.1.2 主要试剂** D-木糖:分析纯,中国惠兴生化试剂有限公司产品;无水葡萄糖:分析纯,国药集团化学试剂有限公司产品;木聚糖:分析纯,北京拜尔迪生物技术公司产品;羧甲基纤维素钠:化学纯,国药集团化学试剂有限公司产品;Triton X-100:分析纯,广东省汕头市西陇化工厂产品;其他试剂均为分析纯。

**1.1.3 主要仪器** UV-2100分光光度计:尤尼可(上海)仪器有限公司产品;TG328A型分析天平:上海天平仪器厂产品;3K15台式冷冻离心机:德国SIGMA公司产品;GZX-9246M BE电热鼓风干燥箱:上海博迅有限公司医疗设备厂产品;箱式电阻炉:上海光地仪器设备有限公司产品;低温恒温槽:宁波天恒仪器厂产品;GZ型悬臂式恒速强力电动搅拌机:保利科研器械有限公司产品;SHZ3型水循环真空泵:河南省巩义市杜甫仪器厂产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 木薯酒精废水水质分析方法** 木薯酒精废水水质分析方法如表1所示。

**1.2.2 酶的提取方法** 取厌氧污泥300 mL,10

000 g 下离心 20 min, 收集上清液, 用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 取滤液, 使用前保藏于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。离心所得的沉淀物用 pH 8.0 的 Tris 缓冲液重新悬浮至 300 mL。将该悬浮液平均分为 6 份(每份 50 mL), 其中 1 份用超声波破碎提取, 另外 5 份分别加入一定量的提取剂(如图 1 所示), 以 600 r/min 的转速搅拌提取 1 h。将提取过的悬浮液于 10 000 g 下离心 20 min, 取上清液, 用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤, 取滤液, 使用前保藏于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

表 1 木薯酒精废水水质分析方法

Tab. 1 Methods for water quality characters analysis of cassava alcohol stillage

项目	分析方法	项目	分析方法
比重	APHA <sup>[8]</sup>	粗脂肪	索氏提取法
固形物量	APHA <sup>[8]</sup>	纤维素	范氏法
COD	重铬酸钾法	半纤维素	范氏法
pH	pH 测定仪	木质素	范氏法
粗蛋白	凯氏定氮法	灰分	APHA <sup>[8]</sup>

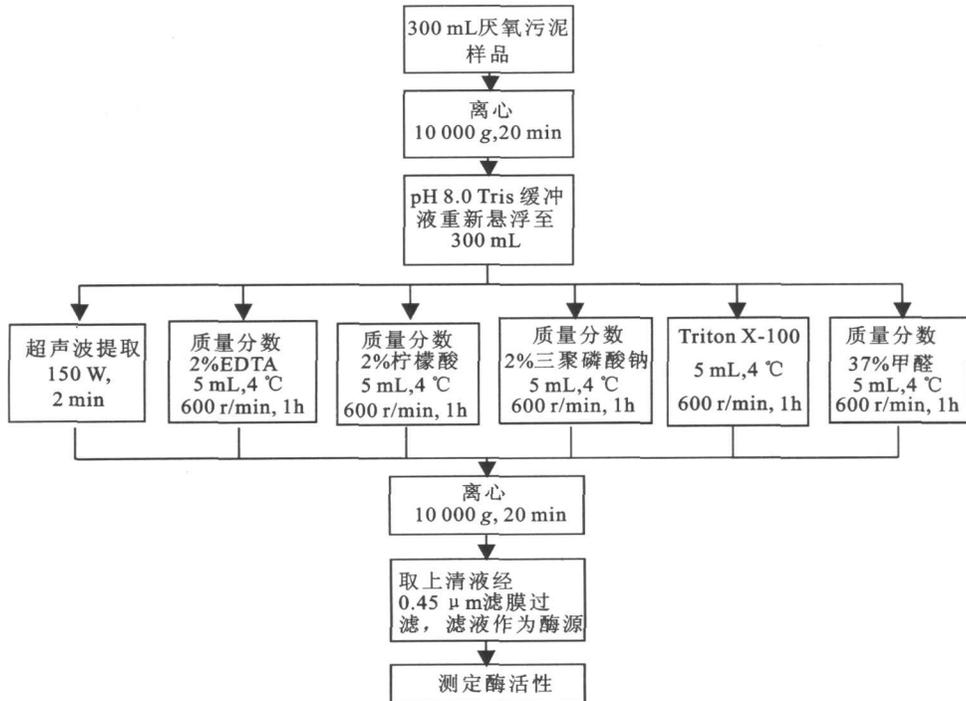


图 1 厌氧污泥中酶的提取过程

Fig. 1 Extraction processes of enzymes in the anaerobic sludge

**1.2.3 酶活力定义及测定方法** 酶活力单位定义: 在最适反应条件下, 每克挥发性悬浮物每分钟产生 1  $\mu\text{mol}$  产物所需的酶量定义为一个酶活力单位( $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$ )。

CMC 酶和木聚糖酶活性测定所用底物分别为羧甲基纤维素钠和木聚糖, 具体方法分别见参考文献[10]和[11]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 木薯酒精废水水质分析

在木薯酒精废水中纤维素、半纤维素和灰分是木薯酒精废水固形物中含量最多的 3 种物质, 分别约占固形物干质量的 30%、18% 和 13%。其中纤维素和半纤维素是固形物中的主要成分, 其被微生物

降解利用的程度很大部分决定了厌氧处理系统 COD 的去除率和甲烷产量。然而纤维素和半纤维素是多糖类大分子物质, 不能被微生物直接吸收利用, 只能先经过水解酶的水解作用生成单糖或低聚糖, 才能被微生物吸收用于新陈代谢。因此选择 CMC 酶和木聚糖酶作为研究对象, 研究其分布情况和提取方法。

### 2.2 不同酶提取方法的比较

图 2 显示, 酶的活性大小很大程度上依赖所采用的提取方法。对于 CMC 酶, 酶活性由高到低依次为: Triton X-100 提取液 > 超声波提取液 > EDTA 提取液 > 柠檬酸提取液 > 三聚磷酸钠提取液 = 高温出水上清液 > 甲醛提取液; 对于木聚糖酶, 酶活性由高到低依次为: Triton X-100 提取液 > 超声

波提取液> 高温出水上清液> 甲醛提取液> 三聚磷酸钠提取液> 柠檬酸提取液> EDTA 提取液。Triton X-100 提取液中两种酶活性都是最高的, 得到 CMC 酶和木聚糖酶活性分别为  $0.57 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$  和  $0.94 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{g})$ <sup>[12]</sup> 提到酶通过疏水结构结合在污泥絮凝体(胞外聚合物或细胞表面), 而 Triton X-100 是一种非离子洗涤剂, 它通过疏水作用与酶结合, 从而将其从污泥絮凝基质中释放出来。超声波的提取所得酶液中两种酶活性仅次于 Triton X-100 提取液, 超声波能显著破坏污泥的絮凝结构, 从而释放包埋在污泥絮凝基质上的大量酶<sup>[13]</sup>。EDTA、柠檬酸、三聚磷酸钠都属于阳离子结合剂, 它们通过与酶上的多价金属离子结合, 释放吸附在污泥絮凝基质中的酶<sup>[14]</sup>。

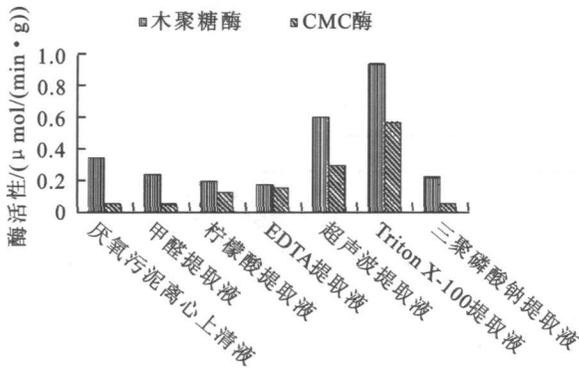


图2 不同处理条件下所得酶液酶活性

Fig. 2 Enzyme activity of enzyme extracts under different treatment conditions

考虑到好的提取方法不仅要有高的提取效率, 还要使细胞的破碎程度较小, 因此, 比较了所采用的提取方法对细胞的破碎情况。由于细胞破碎会释放其中的核酸物质, 因此可以用提取液中核酸的量来表征细胞的破碎程度。利用核酸及蛋白定量测定仪对7种酶液中的核酸含量进行了测定, 结果如图3所示。可以看出, Triton X-100 提取液中核酸含量非常低, 柠檬酸和三聚磷酸钠提取液中核酸含量是大约是其2倍, EDTA 提取液中的核酸含量最高, 是 Triton X-100 提取液的8倍, 这个结果和参考文献[15]所得结论一致。这可能是因为 EDTA 与污泥中微生物细胞膜上的某些阳离子螯合, 并将其从膜上除去, 从而导致细胞的破裂, 进而使胞内的核酸物质释放出来<sup>[16]</sup>。

从高提取效率和低细胞破裂程度考虑, 对于厌氧污泥中 CMC 酶和木聚糖酶, 使用 Triton X-100 提取是一个高效且温和的方法。

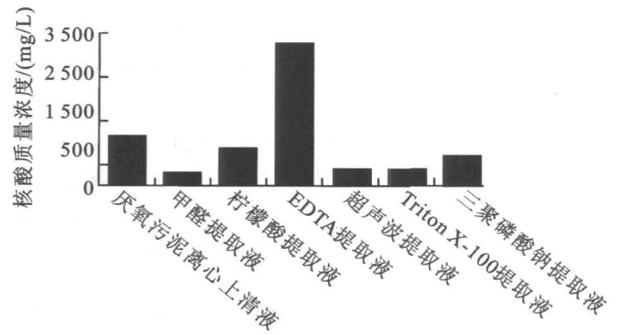


图3 不同处理条件下酶液中的核酸质量浓度

Fig. 3 Nucleic acid content of enzyme extracts under different treatment condition

### 2.3 酶的分布情况

掌握酶在厌氧污泥中酶的分布情况非常重要, 因为在废水处理降解有机物的过程中酶活性能够反映微生物活性<sup>[17]</sup>。对酶在厌氧污泥反应区不同部位中分布情况的了解可以帮助我们更全面的认识和理解废水的生物处理过程, 也可以指导厌氧反应器的设计和运行控制, 对提高废水 COD 去除率, 提高纤维类物质向甲烷转化的转化率, 以及更好地控制生物处理过程有所帮助。将 Triton X-100 提取液中 CMC 酶、木聚糖酶活性与厌氧污泥离心上清液中的这两种酶活性比较, 可以发现占总酶质量至少 90% 的纤维素酶和至少 70% 的半纤维素酶分布在污泥中胞外聚合物上或细胞表面。这与参考文献[3]和[4]研究所得的结论一致。然而, 对于酶与絮凝体中的何种物质结合以及酶吸附在絮凝体基质上的机理并不十分清楚, 需要进一步深入研究。

### 3 结语

对木薯酒精废水固形物(干基)中主要有机成分分为纤维素和半纤维素, 分别约占质量分数 30% 和 18%。高温厌氧处理过程中, 纤维素酶和半纤维素酶在这两种物质水解的过程中发挥着关键的作用, 因此选择这两种酶作为研究对象。考虑到好的提取方法要有相对较高的提取效率和低的细胞破裂程度, 对于厌氧污泥中的 CMC 酶和木聚糖酶, Triton X-100 提取是一个高效且温和的酶提取方法。在高温厌氧处理系统中, 纤维素酶和半纤维素酶主要存在于污泥絮凝体基质(胞外聚合物或细胞表面)中, 分别为占系统中总酶质量的 90% 和 70%, 而清水相中的纤维素酶和半纤维素酶的酶质量分别占系统中总酶质量的 10% 和 30%。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] 毛忠贵, 张建华. 酒精制造的“零能耗零污染”趋势[J]. 生物工程学报, 2008, 24(6): 946– 949.  
MAO Zhong-gui, Zhang Jiar-hua. Trend of “zero energy consumption and wastewater” in fuel[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2008, 24(6): 946– 949.
- [ 2 ] 张静, 翟芳芳, 张建华等. 酒精沼气双发酵偶联中厌氧沼气的发酵行为[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(2): 376– 281.  
ZHANG Jing, ZHAI Fang-fang, ZHANG Jiar-hua, et al. The behavior of anaerobic fermentation in the technique of alcohol fermentation cooperate with methane fermentation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(2): 376– 281.
- [ 3 ] Cadoret A, Conrad A, Block J C. Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002, 31(1– 2): 179– 186.
- [ 4 ] Frolund B, Griebe T, Nielsen PH. Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1995, 43(4): 755– 761.
- [ 5 ] Sheng GP, Yu HQ. Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy[J]. **Water Research**, 2006, 40(6): 1233– 1239.
- [ 6 ] Goel R, Mino T, Saton H. Enzyme activity under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor[J]. **Water Research**, 1998, 32(7): 2081– 2088.
- [ 7 ] Nielsen PH, Roslev P, Dueholm T, et al. Microthrix parvicella, a specialized lipid consumer in anaerobic– aerobic activated sludge plants[J]. **IWA Publishing**, 2002, 73– 80.
- [ 8 ] Whiteley C G, Heron P, Pletschke B, et al. The enzymology of sludge solubilisation utilising sulphate reducing systems properties of proteases and phosphatases[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2002, 31(4): 419– 424.
- [ 9 ] Eaton A D, Clesceri L S, Rice E W, et al. Standard Methods for the examination of water and wastewater[M]. Washington D.C.: American Public Health Association (APHA), 1995.
- [ 10 ] Ghose T K. International union of pure and applied chemistry (IUPAC) measurement of cellulase activities[J]. **Pure and Applied Chemistry**, 1987, 59: 257– 268.
- [ 11 ] Bailey M J, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity[J]. **Journal of Biotechnology**, 1992, 3: 286– 290.
- [ 12 ] Gessesse A, Dueholm T. Lipase and protease extraction from activated sludge[J]. **Water Research**, 2003, 37: 3652– 3657.
- [ 13 ] Yu GH, He PJ, Shao LM, et al. Enzyme activities in activated sludge flocs[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2007, 77(3): 605– 612.
- [ 14 ] Burgess J E, Pletschke B I. Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A mini– review[J]. **Water SA**, 2008, 34(3): 343– 349.
- [ 15 ] Liu Hong, Herber H P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges[J]. **Journal of Biotechnology**, 2002, 95: 249– 256.
- [ 16 ] Wingender J, Neu T R, Flemming H C. Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structures and function[J]. **Springer Verlag, Germany**, 1999.
- [ 17 ] Nybroe O, Jorgensen P E, Henze M. Enzyme activities in waste water and activated sludge[J]. **Water Research**, 1992, 26: 579– 584.