

文章编号: 1673-1689(2011)02-0306-05

Fe²⁺ 对太湖蓝藻厌氧发酵产甲烷过程中 关键酶的影响

马素丽, 刘浩, 严群*

(江南大学 环境与土木工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 通过研究不同质量浓度 Fe²⁺ 对太湖蓝藻厌氧消化过程中相关酶活性的影响, 以进一步提高其厌氧产甲烷的能力。结果表明, 当添加 Fe²⁺ 3 mg/L 时, 反应瓶中甲烷积累产量最高, 为 986.7 mL, 比空白对照组提高了 43 倍。同时, 当 Fe²⁺ 质量浓度为 0.5 mg/L 时, 脱氢酶活性达到 118 U, 比空白对照组提高了 76%; 当 Fe²⁺ 质量浓度为 0.5 mg/L 时, BAA-蛋白水解酶活性为 3126.9 U, 比空白对照组提高了 83.4%; 当 Fe²⁺ 质量浓度为 1 mg/L 时, β-葡萄糖苷酶活性达到 47493 U, 比空白对照组提高了 6.3 倍; 当 Fe²⁺ 质量浓度为 3 mg/L 时, F₄₂₀ 摩尔质量为 0.2 mmol/g, 比空白对照组提高了 4.3 倍。

关键词: 太湖蓝藻; 厌氧发酵; Fe²⁺; 甲烷; 酶活

中图分类号: X 705

文献标识码: A

Effect of Fe²⁺ Concentration on the Enzymes during Methane Production from Taihu Blue Algae by Anaerobic Digestion

MA Su-li, LIU Hao, YAN Qun*

(School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The effect of Fe²⁺ concentration on the enzymes during methane generation from Taihu blue-green algae was studied in this manuscript. It was found that the maximum methane yield reached at 986.7 ml when Fe²⁺ concentration was 3 mg/L, and it was about 43 times more than that of the control group. When 0.5 mg/L Fe²⁺ added to the fermentation medium, the activity of dehydrogenase, and BAA-hydrolysing protease was 118 U and 3126.9 U, respectively, and increased 76% and 83.4%, when compared with the corresponding value of the control. The activity of β-glucosidase enzyme reached 47493 U, when Fe²⁺ concentration was 1 mg/L, and it was about 6.3 times more than that of the control group. The coenzyme F₄₂₀ content was 0.2 mmol/g when Fe²⁺ concentration was 3 mg/L, which was about 4.3 times more than that of the control group.

Key words: blue-green algae, anaerobic digestion, Fe²⁺, methane, enzyme activity

收稿日期: 2010-04-20

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划子课题项目(2009BAC52B03); 国家大学生创新性实验计划项目(081029516); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(JUSRP20906)。

* 通信作者: 严群(1972-), 男, 江苏泰兴人, 工学博士, 副教授, 主要从事环境微生物方面的研究。

Email: yanqun@jiangnan.edu.cn

近年来,中国太湖、滇池、巢湖等陆续出现蓝藻暴发现象。尤其是 2007 年夏天太湖蓝藻大规模暴发,给无锡市以及太湖周边其它地区造成了一定程度的生态危机。据统计,2007 年无锡市从太湖里打捞蓝藻共约 30 万 t,2008 年约 50 万 t,2009 年约 40 万 t。目前,从太湖打捞出来的蓝藻大多堆放于池塘,大多未得到及时处理;并且,大量蓝藻堆积,易引起周边环境的二次污染。此外,鉴于藻类中有较高的碳氮含量,因而以其作为底物,与其他工农业废弃物相结合进行厌氧发酵生产甲烷^[1]是将蓝藻资源化利用的有效途径之一。然而,目前采用该法处理的蓝藻量还较低,而需要处理的打捞蓝藻却每年都在急剧增加。为了进一步提高蓝藻厌氧发酵产甲烷的效率,可通过分析蓝藻厌氧消化过程的酶学过程着手,以期找出蓝藻厌氧发酵产甲烷过程中的重要生物化学影响因素。

有机废弃物的厌氧消化过程,其实是各种各样的酶主导的生物化学反应过程,而这些酶的活性通常会受到各种环境因素,尤其是金属离子浓度的影响。金属离子对酶活性的影响包括:激活作用和抑制作用。作为一种重要的金属离子, Fe^{2+} 是一种或多种酶的激活剂。研究表明, Fe^{2+} 可以加速多种酶反应进程^[2]。然而,目前尚没有 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧发酵产甲烷过程中关键作用酶影响作用的报道。

作者研究了不同浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧发酵过程中的几种关键酶,即脱氢酶、BAA-蛋白水解酶、 β -葡萄糖苷酶活性及辅酶 F_{420} 摩尔质量的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

蓝藻:取自无锡市胡埭镇邵家湾蓝藻堆放池,蓝藻中碳的质量分数为 420~450 mg/g(以干物质计),以平均 440 mg/g(干物质 TS)计算,有机质质量分数为碳质量分数的 1.724 倍;蓝藻中氮的质量分数为 64~69 mg/g(以干物质计),以平均 67 mg/g(干物质 TS)计算;蓝藻中磷的质量分数为 6.2~7.4 mg/g(以干物质计),平均以 6.8 mg/g(干物质 TS)计算;蓝藻中灰份的质量分数为 65~100 mg/g(以干物质计),以平均 82 mg/g(干物质 TS)计算。活性厌氧颗粒污泥:取自无锡市宜兴协联热电有限公司。

1.2 实验装置

采用 500 mL 的抽滤瓶作为反应容器,用倒置的量筒作为气体收集装置。反应温度由电热恒温水浴锅控制。气体检测由抽滤瓶上端的气体取样

口取样,发酵液从抽滤嘴取样。

1.3 实验方法

按照蓝藻与活性厌氧颗粒污泥干物质质量之比为 5:1 装料,控制反应容器中干物质总量为 15 g,初始 pH 值调整至 7.4~7.6。之后,用蒸馏水将每个反应罐定容至 700 mL,之后向每个反应瓶内分别加入不同量的 Fe^{2+} ,使每个反应瓶内的 Fe^{2+} 浓度分别为 0、0.5、1、2、3、4 mg/L。在 $(37 \pm 1)^\circ C$ 下进行厌氧发酵。

1.4 分析项目及方法

1.4.1 TS 和 VS 的测定 称重法,见文献[3]。

1.4.2 甲烷成分测定 甲烷含量测定采用气相色谱仪:GC910,上海科创色谱仪器有限公司制造。色谱柱为不锈钢填充柱,填料为 5A 分子筛。柱长为 $1 m \times 6 mm$,柱温 $90^\circ C$,汽化温度 $100^\circ C$,检测器温度 $100^\circ C$,载气为氦气,进样量 100 μL 。

1.4.3 酶活测定方法 脱氢酶活性测定方法见文献[4]。 $37^\circ C$ 下,pH 在 7.4~7.6 时,定义含 lg TS 的底物在 1 h 产生 1 μg TF 为一个酶活单位 U; BAA ($N-\alpha$ -benzoyl-L-arginamide)-蛋白质水解酶活性测定方法见文献[5]。 $37^\circ C$ 下,pH 在 7.4~7.6 时,定义含 lg TS 的底物在 1 h 产生 1 μmol , NH_4-N 为一个酶活单位 U; β 葡萄糖苷酶活性测定方法见文献[6], $37^\circ C$ 下,pH 在 7.4~7.6 时,定义含 lg TS 的底物在 1 h 产生 1 μmol PNP 为一个酶活单位 U;辅酶 F_{420} 摩尔质量测定:紫外分光光度法,见文献[7],单位的底物以 VSS 计。

2 结果与分析

2.1 添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对太湖蓝藻厌氧发酵产甲烷产量的影响

图 1 为添加不同浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧发酵过程产甲烷产量的影响。每个反应瓶中的甲烷一开始随着反应的进行而增加,但到第 10 天后,甲烷产量趋于稳定。同时,随着反应体系中所添加的 Fe^{2+} 质量浓度的增加,甲烷累计产量亦随之上升,其中当 Fe^{2+} 质量浓度为 3 mg/L 时,累计产甲烷量达到最大值 986.7 mL,比对照组提高了 43 倍。而当 Fe^{2+} 质量浓度继续提高时,甲烷累计产量却呈下降趋势。

这可能是由于一定质量浓度的 Fe^{2+} 对厌氧发酵过程中的相关酶系有促进作用,其中当 Fe^{2+} 质量浓度为 3 mg/L 时,其对厌氧发酵过程中起作用的酶活性的促进作用达到最高,可提高厌氧发酵效率。由此可见,在甲烷发酵过程中,添加 Fe^{2+} 不仅

可以提高反应过程中起关键作用的酶的活性,还可以一定程度促进蓝藻的厌氧消化,产生更多的甲烷。

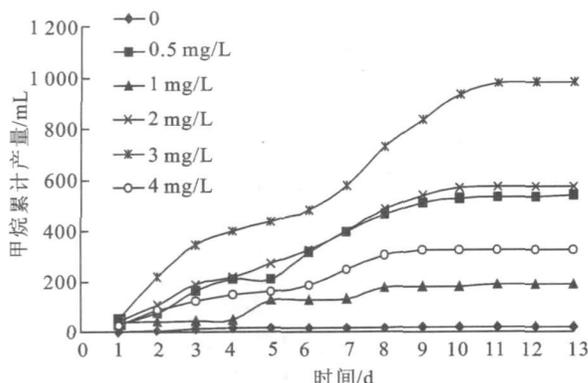


图1 添加不同质量浓度 Fe^{2+} 对太湖蓝藻厌氧发酵产甲烷的影响

Fig. 1 Effect of Fe^{2+} concentration on the methane production from Taihu blue algae

2.2 添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧发酵过程中脱氢酶活性的影响

脱氢酶能酶促脱氢反应,即酶促有机物质脱氢的作用,它由活的生物体产生。在废水生物处理中,由于它可以反映处理体系中活性微生物量及其对有机物的降解活性,因而成为一项指示污泥活性的重要指标^[8-9]。

图2为添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧发酵产甲烷过程中脱氢酶活性的影响。随着蓝藻厌氧消化过程的进行,在发酵初始阶段,各个反应瓶中脱氢酶活性皆呈升高趋势,当到达第3天时,脱氢酶活性达到最高。此后,脱氢酶活性呈下降趋势。同时,随着反应体系中所添加 Fe^{2+} 质量浓度的增加,产甲烷过程中脱氢酶的活性均有不同程度的提高,其中当添加 Fe^{2+} 质量浓度为 0.5 mg/L 时,该酶活性达到最高,为 118 U,比空白对照组提高了 76%,而当 Fe^{2+} 质量浓度继续增加时,脱氢酶活性呈降低趋势。

这可能是由于大多数脱氢酶的天然受体是 NAD^+ 或 NADP^+ ,脱氢酶的底物经这类脱氢酶的催化使 NAD(P)^+ 还原生成 NAD(P)H 。而 Fe^{2+} 是一种还原剂,从而可以协助脱氢酶加速 NAD(P)^+ 的还原速度,进而提高了脱氢酶的活性。

2.3 添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧发酵过程中 BAA-蛋白水解酶活性的影响

BAA-蛋白水解酶是用来催化多肽或蛋白质水解的一种酶。在本厌氧发酵产甲烷的反应体系中,该酶主要作用在水解阶段,将大分子蛋白质水解成较小的氨基酸分子。

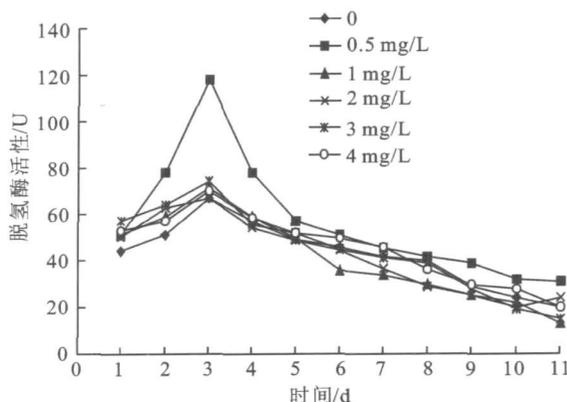


图2 添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧发酵过程中脱氢酶活性的影响

Fig. 2 Effect of Fe^{2+} concentration on the dehydrogenase enzyme during anaerobic digestion from cyanobacteria

图3为添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧产甲烷过程中 BAA-蛋白质水解酶活性的影响。可以看出,随着蓝藻厌氧消化过程的进行,在发酵初始阶段,各反应瓶中的 BAA-蛋白水解酶活性皆呈升高趋势,当到达第10天时, BAA-蛋白水解酶活性达到最高。此后, BAA-蛋白水解酶活性呈降低趋势。同时,随着反应体系中所添加的 Fe^{2+} 质量浓度的增加,产甲烷过程中 BAA-蛋白质水解酶的活性均有不同程度的提高,其中当 Fe^{2+} 质量浓度为 0.5 mg/L 时,该酶活性达到最高,为 3126.9 U,比空白对照组提高了 83.4%,而当 Fe^{2+} 质量浓度继续增加时, BAA-蛋白水解酶活性呈降低趋势。

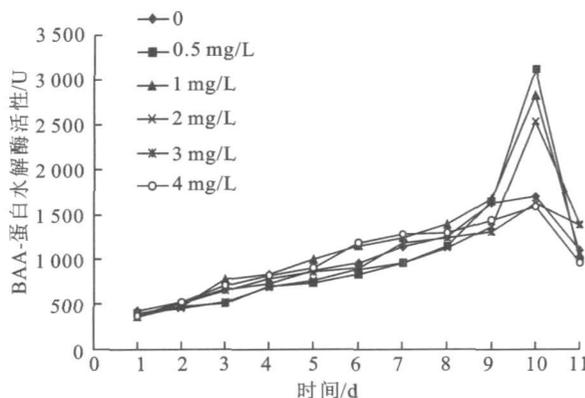


图3 添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对太湖蓝藻厌氧发酵过程中 BAA-蛋白水解酶活性的影响

Fig. 3 Effect of Fe^{2+} concentration on the BAA hydrolysing protease during the anaerobic digestion from Taihu blue algae

一些蛋白水解酶的活性中心包括金属离子和相应氨基酸,或者在起催化作用时,需要金属离子参与。而 Fe^{2+} 可以和某些蛋白水解酶结合,进而使

其发生变构作用, 加强其对相应蛋白质的催化水解作用, 从而提高总体蛋白水解酶的活性。

2.4 添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧发酵过程中 β -葡萄糖苷酶活性的影响

β -葡萄糖苷酶^[10], 又称 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶, 它能够水解结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键, 同时释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基。该酶主要作用在厌氧发酵过程的水解阶段, 用来催化生成 β -D-葡萄糖和相应的配基。

图4为添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧产甲烷过程中 β -葡萄糖苷酶活性的影响。由图4可知, 厌氧发酵整个周期的大部分时段 β -葡萄糖苷酶的活性几乎都维持在较低水平。在发酵初始阶段, 各反应瓶中的 β -葡萄糖苷酶活性皆呈升高趋势, 当蓝藻厌氧消化过程进行到第6天时, 反应系统中 β -葡萄糖苷酶活性达到最高, 此后, β -葡萄糖苷酶活性呈降低趋势。同时, 随着反应体系中所添加的 Fe^{2+} 浓度的增加, 产甲烷过程中 β -葡萄糖苷酶活性均有不同程度的提高, 其中当添加 Fe^{2+} 浓度为 1 mg/L 时, β -葡萄糖苷酶活性达到最高, 为 47 493 U, 比空白对照组提高了 6.3 倍, 而当 Fe^{2+} 质量浓度继续增加时, β -葡萄糖苷酶活性呈降低趋势。

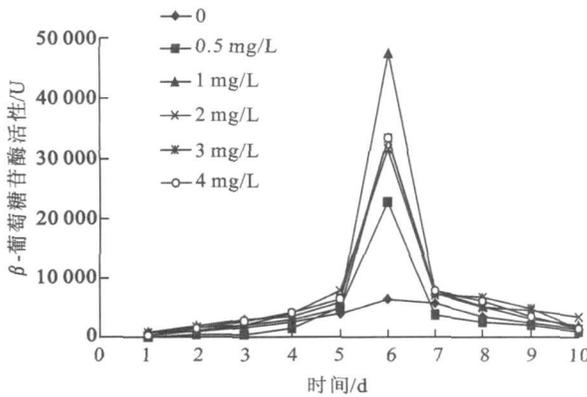


图4 添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对太湖蓝藻厌氧发酵过程 β -葡萄糖苷酶活性的影响

Fig. 4 Effect of Fe^{2+} concentration on the β glucosidase during the anaerobic digestion from Taihu blue algae

据 β -葡萄糖苷酶的催化机理^[11], 该催化反应过程中, 其中一步反应是酶的亲核基团在酸碱催化(提供一个质子)帮助下, 去攻击底物的糖苷键 O 原子, 形成共价的糖基酶中间体 E-S。由于 Fe^{2+} 很容易与 O 原子结合以发生氧化反应, 从而推进了整个催化反应进程。

2.5 添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧发酵过程中辅酶 F_{420} 摩尔质量的影响

作为产甲烷菌所特有的一种辅酶, F_{420} 可作为低电位电子转移的载体, 在甲烷的形成过程中起着重要的作用。在多数情况下, 氧化态的辅酶 F_{420} 充当电子受体被氢化酶催化还原, 还原态的辅酶 F_{420} ($F_{420}H_2$) 则可作为电子供体, 把电子传递给产甲烷过程中需要电子还原的反应。因此, 辅酶 F_{420} 在产甲烷的电子传递链中起着不可忽视的作用^[12]。此外, 在厌氧消化中, 常常可利用辅酶 F_{420} 在 420 nm 波长的紫外光激发下, 能产生自发蓝绿荧光这种荧光特性来鉴别产甲烷菌, 并可据此定性地判断污泥产甲烷活性^[13]。

图5为添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对蓝藻厌氧产甲烷过程中辅酶 F_{420} 摩尔质量的影响。由图5可看出, 在发酵初始阶段, 各反应瓶中的辅酶 F_{420} 摩尔质量逐渐增高, 当到达第9天时, 辅酶 F_{420} 摩尔质量达到最高, 此后, 辅酶 F_{420} 摩尔质量以较快速度下降。同时, 随着反应体系中所添加的 Fe^{2+} 质量浓度的增加, 产甲烷过程中辅酶 F_{420} 摩尔质量均有不同程度的提高, 其中当 Fe^{2+} 质量浓度为 3 mg/L 时, F_{420} 摩尔质量可达到最高值 0.2 mmol/g, 比空白对照组提高了 4.3 倍多。此后, 随 Fe^{2+} 质量浓度升高, 辅酶 F_{420} 摩尔质量反而呈下降趋势。同时, 在 Fe^{2+} 质量浓度为 3 mg/L 时, 甲烷累计产量也很高, 而且总体来看 F_{420} 的量与甲烷产量成正相关。

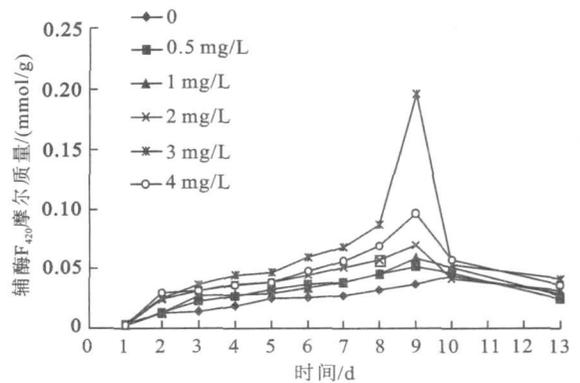


图5 添加不同质量浓度的 Fe^{2+} 对太湖蓝藻厌氧发酵过程辅酶 F_{420} 摩尔质量的影响

Fig. 5 Effect of Fe^{2+} concentration on coenzyme F_{420} during the anaerobic digestion from Taihu blue algae

这可能是由于, 当 Fe^{2+} 质量浓度为 3 mg/L 时, 蓝藻厌氧消化中脱氢酶、BAA-蛋白水解酶及 β -葡萄糖苷酶等相关水解酶系的活性均已有了不同程度的提高, 因而可产生出更多厌氧发酵产甲烷所需的乙酸、氢等重要基质, 因而可相应地促进产甲烷辅酶 F_{420} 的活性, 并最终导致更多甲烷的生成。

3 结 语

本研究表明,作为可影响厌氧消化过程中多种水解酶活性重要因素之一,添加适量质量浓度的 Fe^{2+} ,可大幅提高蓝藻厌氧消化产沼气的甲烷

产量;重要的是, Fe^{2+} 对厌氧产沼气过程中 β -葡萄糖苷酶和辅酶 F₄₂₀ 的促进作用较为明显。然而,要找到真正可行的提高蓝藻厌氧发酵效率的方法,尚需对蓝藻厌氧消化产沼气过程中不同反应阶段的生物化学机制和反应装置的运行条件控制等领域进行深入研究。

参考文献(References):

- [1] 王寿权,严群,阮文权. 蓝藻猪粪共发酵产沼气及动力学研究[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(5): 108- 111.
WANG Shouquan, YAN Qun, RUAN Wenquan. Study on the production and dynamics of methane production by cofermentation of blue green algae and pig manure[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(5): 108- 111. (in Chinese)
- [2] 乐毅全,王士芬. 环境微生物学[M]. 北京:化学工业出版社, 2005: 76- 77.
- [3] Gonze E, Pillot S, Valette E, et al. Ultrasonic treatment of an aerobic activated sludge in a batch reactor[J]. **Chem Eng Process**, 2003, 42: 965- 975.
- [4] Feng HJ, Hu LF, Mahmood Q, et al. Effects of temperature and feed strength on a carrier anaerobic baffled reactor treating dilute wastewater[J]. **Desalination**, 2009, 239: 111- 121.
- [5] Lu SG, Imai T, Ukita M, et al. Start up performances of dry anaerobic mesophilic and thermophilic digestions of organic solid wastes[J]. **J Environ Sci**, 2007, 19: 416- 420.
- [6] Li Y, Christ RJ. Microbial enzymatic activities in aerobic activated sludge model reactors [J]. **Enzyme Microb Tech**, 2006, 39: 568- 572.
- [7] Kim JS, Park CH, Kim TH, et al. Effects of various pretreatment for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge[J]. **J Biosci Bioeng**, 2003, 95 (3): 271- 275.
- [8] 许晓路, 申秀英. 活性污泥活性参数指标的选评[J]. 环境科学, 1993, 14 (2) : 58- 62.
XU Xiaolu, SHEN Xiuying. Evaluation of active indicator of activated sludge[J]. **Environmental Science**, 1993, 14(2) : 58- 62. (in Chinese)
- [9] 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭, 等. 环境工程微生物检验手册[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 163- 165.
- [10] 孟宪文, 宋小红, 陈历俊, 等. β -葡萄糖苷酶的研究进展[J]. 中国乳业, 2009, 10: 42- 43.
MENG Xianwen, SONG Xiaohong, CHEN Lijun, et al. The research of β -glucosidase[J]. **Dairy Industry**, 2009, 10: 42- 43. (in Chinese)
- [11] 潘利华, 罗建平. β -葡萄糖苷酶的研究及应用进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12) : 803- 807.
PAN Lihua, LUO Jianping. Advance in research and application of β -D-glucosidase[J]. **Food Science**, 2006, 27(12) : 803- 807. (in Chinese)
- [12] 尹小波, 连莉文, 徐洁泉, 等. 产甲烷过程的独特酶类及生化监测方法[J]. 中国甲烷, 1998, 16(3) : 9- 10.
YIN Xiaobo, LIAN Liwen, XU Jiequan, et al. Unique enzymes and biochemical monitoring methods in methanogenesis [J]. **China Biogas**, 1998, 16(3) : 9- 10. (in Chinese)
- [13] Dolfing J, Bloemen W. Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments[J]. **Journal of Microbiology Methods**, 1985, 4(1): 1- 12.