

生活污水中蛋白质测试方法研究

黄满红^{1,2} 李咏梅^{2*} 顾国维²

(1 东华大学环境科学与工程学院, 上海 201620;

2 同济大学环境科学与工程学院国家污染控制与资源化重点实验室, 上海 200092)

摘要 分别用 Folin 酚改进法、考马斯亮兰法和紫外分光光度法等 3 种测试方法测试了上海市某小区生活污水中的蛋白质含量, 对这 3 种测试方法进行了比较, 并采用氨基酸仪分析了生活污水中蛋白质水解后的氨基酸化学组成。试验结果表明, Folin 酚改进法测试蛋白质浓度的准确性与精确性优于考马斯亮兰法和紫外分光光度法, 可用于测定生活污水中蛋白质的浓度; 氨基酸仪法测得该生活污水中含有 17 种氨基酸, 其中最多的为谷氨酸 (3.6 mg/L), 含量最低的是脯氨酸 (0.8 mg/L); 所测生活污水中蛋白质 COD 占总 COD 的 18.9%。

关键词 生活污水 蛋白质 Folin 酚改进法 考马斯亮兰法 紫外分光光度法 氨基酸

中图分类号 X703.1 **文献标识码** A **文章编号** 1673-9108(2009)03-0417-05

Study on determination methods of proteins in domestic wastewater

Huang Manhong^{1,2} Li Yongmei² Gu Guowei²

(1. College of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620;

2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092)

Abstract Proteins in domestic wastewater were measured by three methods (modified Folin-phenol method, Bradford method and spectrophotometer method). The chemical composition of proteins in domestic wastewater were also investigated with amino acids analyzer. The results showed that the Folin-phenol method was a more sensitive and accurate method than Bradford method and spectrophotometer method in determining proteins in domestic sewage. The wastewater was analyzed by amino acids analyzer after being hydrolyzed to amino acids. The amino acids analyzer method gave us the information about the amino acids that constitute proteins in wastewater. There are 17 kinds of amino acids determined in the wastewater. Among the amino acids, the concentration of glutamic acid is 3.6 mg/L, which is the highest of all the amino acids; the lowest is proline (0.8 mg/L). The results also indicated that the COD of proteins is about 18.9 percents of the total COD in the domestic wastewater.

Key words domestic wastewater; proteins; modified Folin-phenol method; Bradford method; spectrophotometer method; amino acids

蛋白质是由氨基酸组成的高分子有机物质, 在米、麦、大豆和肉类等物质中广泛存在, 它是自然界存在最多、分布最广的一类重要的有机化合物。人类排泄物及生产活动中产生的废弃物、动植物残片等将大量的蛋白质带入生活污水中, 成为污水中的主要有机污染物之一; 同时它可以提供生物处理中细胞生长、更新、修复所需要的氨基酸, 是微生物的良好碳源和氮源^[1]。因此了解污水中蛋白质的浓度和组成, 不仅可提供污水中该类有机物组成的详细信息, 而且可为更深刻地理解污水处理过程中相关碳源和氮源的转化提供帮助^[2]。国际水质协会提出的活性污泥模型中, 对其有机组分进行了分类,

很好地反映了生化反应中电子传递的本质, 但是没有对蛋白质等单个有机物的迁移转化过程进行研究。事实上, 污水中 50% ~ 60% 的溶解性有机碳是蛋白质、油脂以及糖类, 由于没有准确快速的测定方法, 这些大分子有机物在城市污水处理厂去除没有

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50138010, 50578114); 东华大学基金资助 (113-10-0044018); 上海市重点学科建设项目 (B604)

收稿日期: 2008-07-20; **修订日期:** 2008-07-29

作者简介: 黄满红 (1978 ~), 女, 博士, 讲师, 主要从事水污染控制和监测方面的研究工作。E-mail: egghmh@163.com

* 通讯联系人, E-mail: liyongmei@tongji.edu.cn

得到很好的研究。目前国内外关于生活污水中蛋白质的相关研究较少,也没有测定生活污水中蛋白质的标准方法。

本研究以上海市某大型居民小区生活污水为研究对象,对 Folin 酚法、考马斯亮兰法和紫外分光光度法测定生活污水的准确性和抗干扰性进行了比较;并在食品中蛋白质分析方法^[3,4]的基础上,采用氨基酸仪法分析污水中蛋白质水解后的氨基酸组成,以期为准了解生活污水中蛋白质组成提供一个新的途径。

1 实验材料和方法

1.1 实验用水

本研究所用生活污水取自上海某大型居民小区污水收集站。经测定,该生活污水平均 COD 为 497.8 mg/L, TOC 为 125.6 mg/L, SS 为 230 mg/L, TP 为 4.3 mg/L, $\text{NH}_4\text{-N}$ 为 30.9 mg/L。

1.2 Folin 酚法

Folin 酚法最早由 Lowry 提出,并确定了蛋白质浓度测定的基本步骤^[5]。往 10 mL 具塞试管中加入 1 mL 待测溶液或蒸馏水,然后各管内加入试剂甲 5 mL,混合后在 20~25℃ 下放置 10 min,然后加入 0.5 mL 试剂乙,立即混合均匀 30 min 后,以不含蛋白质的试管为对照,与其他试管内的溶液依次用分光光度计于 750 nm 波长下比色,实验设 3 个平行样。试剂甲:(A)称取 10 g Na_2CO_3 、2 g NaOH 和 0.25 g 酒石酸钾钠,溶解后用蒸馏水定容至 500 mL。(B)称取 0.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,溶解后用蒸馏水定容至 100 mL。每次使用前将 (A)液 50 份与 (B)液 1 份混合,即为试剂甲。试剂乙:在 1.5 L 容积的磨口回流器中加入 100 g 钨酸钠 ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)和 700 mL 蒸馏水,再加 50 mL 85%磷酸和 100 mL 浓盐酸充分混匀,接上回流冷凝管,以小火回流 10 h。回流结束后,加入 150 g 硫酸锂和 50 mL 蒸馏水及数滴液体溴,开口继续沸腾 15 min,驱除过量的溴,冷却后溶液呈黄色(倘若仍呈绿色,再滴加数滴液体溴,继续沸腾 15 min)。然后稀释至 1 L,过滤,滤液置于棕色试剂瓶中保存,使用前大约加水 1 倍,使最终浓度相当于 1 mol/L。

1.3 考马斯亮兰染色法

用考马斯亮兰作为染色剂是由 Bradford 最早开发的方法^[6]。取待测溶液或蒸馏水(空白)1 mL,加入 5 mL 考马斯亮兰溶液(考马斯亮蓝 G_{250} 100 g 溶

于 50 mL 95%乙醇中,加 100 mL 85%磷酸混匀,配成原液。临用前取原液 15 mL,加蒸馏水至 100 mL,用滤纸过滤后,最终浓度为 0.01%)。

1.4 紫外分光光度计法

由于蛋白质分子中酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键,因此蛋白质具有吸收紫外线的性质,吸收高峰在 280 nm 处^[7]。取待测溶液或蒸馏水(空白)1 mL 加入试管,并加入 4 mL 蒸馏水,摇匀。选用光程为 1 cm 的石英比色杯,在 280 nm 波长处分别测定各管溶液的 A_{280} 值,实验设 3 个平行样。

1.5 氨基酸仪分析法

蛋白质经盐酸水解为游离氨基酸,流动相推动氨基酸经氨基酸分析仪的离子交换柱分离后,与茚三酮溶液产生颜色反应。

1.5.1 污水样品的预处理

污水经冷冻干燥后,得到浅灰色粉末状固体,准确称取一定量样品放入水解管中(精确到 0.0001 g),然后在水解管中加 10~15 mL 6 mol/L 的盐酸,再把水解管放入冷冻剂中,冷冻 3~5 min,再接到真空泵的抽气管上,抽真空(近 0 psi),然后充入高纯氮气;再抽真空充氮气,重复 3 次后,在充氮气状态下封口。将已封口的水解管放在 110 ± 1 的恒温干燥箱内,水解 18 h 后,取出冷却。打开水解管,将水解液过滤后,用去离子水多次冲洗水解管,将水解液全部转移到 50 mL 容量瓶内,用去离子水定容。吸取滤液 1 mL 于 5 mL 容量瓶内,用真空干燥器在 40~50℃ 干燥,残留物用 1~2 mL 水溶解,再干燥,反复进行 2 次,最后蒸干,用 1 mL pH 2.2 的柠檬酸钠缓冲液溶解,供仪器测定分析。

1.5.2 氨基酸测定仪及定性和定量方法

氨基酸自动测定仪为 Hitachi 835-50(日本),阳离子交换柱为璜酸型 Na^+ 型。采用保留时间定性,外标法进行定量。

2 结果与讨论

2.1 Folin 酚法及其改进法测定生活污水中的蛋白质

Folin 酚法测定蛋白质含量的过程包括 2 步反应:第 1 步是在碱性条件下蛋白质与 Cu^{2+} 作用生成络合物;第 2 步是此络合物还原 Folin 试剂(磷钼酸和磷钨酸试剂),生成深蓝色的化合物,且颜色深浅与蛋白质的含量成正比关系,吸收峰在 750 nm。

由于 Folin 酚法中蛋白质在 750 nm 处有吸收峰外,腐殖质物质在该处也有吸收^[8]。为此用腐殖酸

和牛血清白蛋白为标样,测定了在蛋白质和腐殖质同时存在的条件下的吸光度值,如图 1 所示。

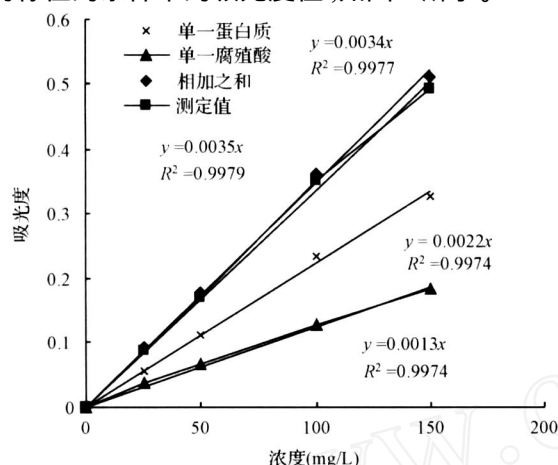


图 1 有腐殖酸存在时蛋白质吸光度变化

Fig 1 Adsorbance changes of proteins while humic acids exist

由图 1 可知,在蛋白质和腐殖酸同时共存的水溶液(实验浓度范围 0 ~ 150 mg/L)中,其实际测得的吸光度值小于蛋白质和腐殖酸单独测得的吸光度之和,说明腐殖酸的存在对蛋白质的测定有一定影响。

由于生活污水中不可避免地含有部分腐殖质物质,为了减少生活污水中腐殖质对蛋白质测定的影响,对蛋白质的测定进行部分的改进。由于发现不加硫酸铜指示剂时,蛋白质所引起的吸光度降低 80%,而由腐殖酸引起的吸光度不变^[8]。所以在改进实验过程中,设置 2 个平行,其中一个加入硫酸铜指示剂,其吸光度记为吸光度 1,此时测得的吸光度由蛋白质和腐殖酸共同产生;另一个不加硫酸铜指示剂,其吸光度记为吸光度 2,此时测得的吸光度由 20%的蛋白质和腐殖酸所共同产生。即:

吸光度 1 = 吸光度(蛋白质) + 吸光度(腐殖酸)

吸光度 2 = 0.2 × 吸光度(蛋白质) + 吸光度(腐殖酸)

则蛋白质的吸光度 = 1.25 × (吸光度 1 - 吸光度 2),由此可计算出蛋白质的浓度。

2.2 考马斯亮兰染色法

图 2 给出了考马斯亮兰法在 595 nm 下测定牛血清白蛋白和同等条件下加有生活污水的水样测试结果。

从图中可以看到,考马斯亮兰法用牛血清白蛋白做标准的标线和同等条件下加有生活污水的水样测试线的斜率基本相同,表明该生活污水中不含有干扰考马斯亮兰法准确性的物质,可以用来测试该城市污水中的蛋白质。

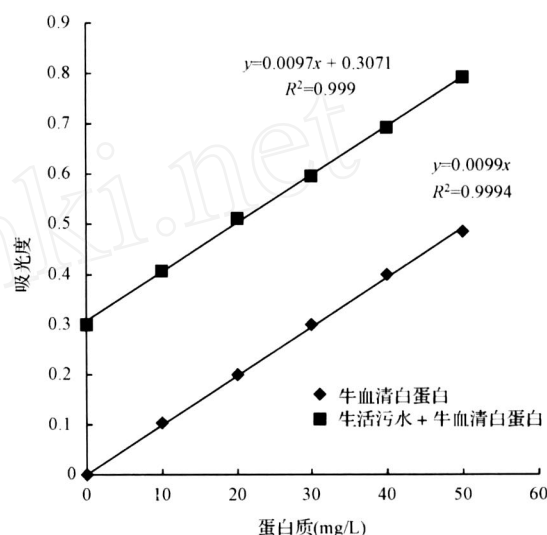


图 2 生活污水对考马斯亮兰染色法测定蛋白质的影响

Fig 2 Effects of domestic wastewater on Bradford method in determining proteins

2.3 紫外分光光度计法

图 3 给出了紫外分光光度法测定牛血清白蛋白和同等条件下加有生活污水的水样测试结果以及考虑到核酸等紫外线吸收物质进行修正后的结果(吸光度 = $1.45A_{280} - 0.74A_{260}$)。

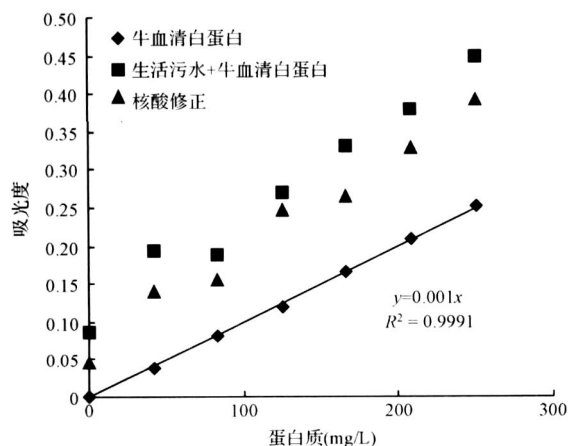


图 3 生活污水对紫外分光光度法测定蛋白质的影响

Fig 3 Effects of domestic wastewater on spectrophotometer method in determining proteins

从该图可知,在生活污水中蛋白质浓度较低时,

线性关系较差,即使经过校正,测定结果也不理想。

2 4 比色法测定蛋白质的比较

为了比较 Folin 酚改进法、考马斯亮兰比色法与紫外分光光度法测定蛋白质浓度的准确性和精确

性,本研究采取上述 3 种比色法对牛血清白蛋白和 DNA 标准溶液以及生活污水中的蛋白质浓度进行了测试,每个样品设 3 个平行样,其结果如表 1 所示。

表 1 Folin 酚改进法、考马斯亮兰比色法与紫外分光光度法对单一物质和实际废水的测定比较
Table 1 Comparison of modified Folin-phenol method, Bradford method and spectrophotometer method

样 品	标准浓度 C(mg/L)	Folin 酚改进法			考马斯亮兰比色法			紫外分光光度法		
		X	RSD	(X - C) / C	X	RSD	(X - C) / C	X	RSD	(X - C) / C
牛血清白蛋白	60	61.5	1.49	2.5	62.23	2.87	3.72	65.7	4.19	9.5
DNA	0	0	-	0	0.48	10.1	-	61	5.32	-
未过滤生活污水	-	62.94	4.9	-	15.56	34.21	-	-	-	-
过滤后的生活污水	-	44.71	5.66	-	4.44	20.33	-	-	-	-

以牛血清白蛋白计; 测试均值 (mg/L); 相对标准偏差 (%); 相对误差 (%)

由表 1 可知,利用 Folin 酚改进法、考马斯亮兰比色法测定该生活污水中蛋白质物质时,其准确性较好,但在相同浓度 (60 mg/L) 时,考马斯亮兰比色法受到 DNA 等的影响;在实验浓度范围 (0 ~ 150 mg/L) 内, Folin 酚改进法测定生活污水中的蛋白质的相对标准偏差 (RSD) < 6%,准确性和精确性都优于其他 2 种比色法,且不受 DNA 的影响。

为了进一步了解蛋白质的组成,采用了氨基酸分析仪法对生活污水中蛋白质的组成进行了详细分析。

2 5 氨基酸仪分析法测定蛋白质的组成

测定结果表明,生活污水中的蛋白质组成中共有 17 类氨基酸,各类氨基酸的含量如表 2 所示。

表 2 生活污水中各氨基酸浓度
Table 2 Amino acids concentrations of domestic wastewater

名称	浓度 (mg/L)	名称	浓度 (mg/L)
甘氨酸	1.7	组氨酸	1.7
丙氨酸	2.0	苏氨酸	1.4
缬氨酸	2.0	脯氨酸	0.8
亮氨酸	2.0	胱氨酸	0.7
异亮氨酸	1.5	酪氨酸	1.1
天冬氨酸	3.1	蛋氨酸	0.9
谷氨酸	3.6	苯丙氨酸	1.5
精氨酸	1.2	赖氨酸	1.7
丝氨酸	0.9	总氨基酸	27.8

从表 2 可以看到检测结果中,生活污水所含蛋白质的氨基酸组成中谷氨酸含量最高,天冬氨酸次之,脯氨酸含量最低。没有检测到鸟氨酸,这可能和鸟氨酸在日常生活和饮食中不常用到有关。

从表 2 还可以看到,各种氨基酸的总和为 27.8 mg/L,远低于 Folin 酚法的结果,说明水样可能水解不完全,也可能因为水中腐殖质物质的存在使污水中蛋白质含量测定结果偏高。由于水解法相对来说繁琐,且操作难度大,因此在考虑蛋白质一大类物质的测定时, Folin 酚改进法更为合适。

2 6 与其他研究者的比较

由于蛋白质的分子组成为 $C_{16}H_{24}O_5N_4$,其 COD 当量为 1.50 g COD / g 蛋白质。从而,可换算得生活污水中蛋白质物质的总 COD 当量浓度为 94.4 mg/L,约占生活污水 COD 总浓度的 18.9%。表 3 列出了国外同类研究中蛋白质物质与生活污水总 COD 浓度的比值。

表 3 一些研究中城市污水中蛋白质占 COD 的比例
Table 3 Proportions of proteins to COD in sewage

研究者	COD (mg/L)	蛋白质占 COD 比例 (%)	测试方法
Heukelekian ^[9]	203	31	Folin 酚法
Naikis ^[10]	394	15	Folin 酚法
Henze ^[11]	530	8	未说明
Tanaka ^[12]	269	12	考马斯亮兰法
Raukjaer ^[6]	未说明	28	Folin 酚法
本研究	497.85	18.9	Folin 酚法

从表 3 可以看到,本研究所得的生活污水中蛋白质与 COD 总浓度的比值与国外同类研究相吻合(该数值在 8% ~ 31% 之间波动)。

3 结 论

通过上述研究分析,可得出如下结论:

(1) 采用 Folin 酚改进法测试生活污水中蛋白质浓度的准确性与精确性优于考马斯亮兰法和紫外分光光度法,可以用于监测生活污水中蛋白质的浓度,但此法不能得到污水中蛋白质的详细化学组成。

(2) 氨基酸仪法能得出污水中蛋白质的详细化学组成情况,即各种氨基酸的浓度,但是该法操作较为复杂,且可能水解不完全。

(3) 所测试的生活污水中蛋白质物质约占 COD 总浓度的 18.9%。

(4) 采用氨基酸仪法测得所测的生活污水中的蛋白质组成中含有 17 种氨基酸,其中最多的为谷氨酸 (3.6 mg/L),含量最低的是脯氨酸 (0.8 mg/L)。

参 考 文 献

- [1] Metcalf & Eddy, Inc 废水工程:处理与回用 (第 4 版,影印版). 北京:清华大学出版社,2003 38 ~ 45
- [2] Dignac M. F., Ginestet P., Ryback D., et al Fate of wastewater organic pollution during activated sludge treatment-nature of residual organic matter Wat Res, 2000, 34(17): 4185 ~ 4194
- [3] 杨品红,张倩,谢春华,等. 洞庭青鲫肌肉营养成分分析及营养价值评定. 动物学杂志, 2008, 43(1): 102 ~ 108
- [4] 张艳红,陈兆慧,王德萍,等. 红枣中氨基酸和矿质元素含量的测定. 食品科学, 2008, 29(1): 263 ~ 265
- [5] Gaudy A. E. Colorimetric determination of protein and carbohydrate Indust Wat Wastes, 1962, 7: 17 ~ 22
- [6] Raunkjer K., Thorkild H. J., Nielsen P. H. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipids in domestic wastewater Wat. Sci Tech, 1994, 28: 251 ~ 262
- [7] Ronald B., Stephen O. Molecular indicators of the sources and transformations of dissolved organic matter in the Mississippi river plume Organic Geochemistry, 2001, 32(4): 597 ~ 611
- [8] Førlund B., Griebel T., Nielsen P. H. Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 43: 755 ~ 761
- [9] Heukelekian H., Balmat J. L. Chemical composition of particulate fractions of domestic sewage Sewage Ind Wastes, 1959, 31: 413 ~ 423
- [10] Naik N., Henefeld-Fourrier S., Rebhun M. Volatile organic acids in raw wastewater and in physico-chemical treatment Wat Res, 1980, 14: 1215 ~ 1223
- [11] Henze M. Characterization of wastewater for modeling of activated-sludge processes Wat Sci Tech, 1992, 25(6): 1 ~ 15
- [12] Tanaka S., Ichikawa T., Matsuo T. Removal of organic constituents in municipal sewage using anaerobic fluidized sludge blanket and anaerobic filter Wat Sci Tech, 1991, 23: 1301 ~ 1310