

# Extractie en onderzoek van proteïnen uit actief-slib

## 1. Inleiding

De biologische behandeling van huishoudelijk en industrieel afvalwater, terwijl ze een probleem van vervuiling oplost, leidt tot de produktie van vaste afval: slib.

In Groot-Brittannië zou aldus van één tot twee miljoen ton droge stof jaarlijks geproduceerd worden [1]. Alle methodes voor de slibverwijdering tot op heden in gebruik zijn gebaseerd op een 'wegwerp'-technologie, zoals verbranding, anaërobe afbraak, drogen, verspreiden op land of in zee enz. Op de lange duur zal ook dit probleem



PROF. DR. H. VERACHTERT  
Laboratorium voor industriële  
Microbiologie & Biochemie,  
Katholieke Universiteit, Leuven



IR. J. HOUTMEYERS  
Bursaal IWONL,  
Laboratorium voor industriële  
Microbiologie & Biochemie,  
Katholieke Universiteit, Leuven

echter op een meer socio-economische manier moeten aangepakt worden [2].

Alternatieve methoden, waarvan sommige op beperkte schaal worden toegepast, zijn composteren en gebruik in land- en tuinbouw, de extractie uit slib van chemische produkten zoals nucleïnezuuren, vitamines en aminozuren, de omvorming tot olie en plastics en uiteindelijk de aanwending van slib voor voedingsdoeleinden.

Volgens Corti [3] zou 1 kg gedroogd actief-slib dezelfde voedingswaarde hebben als een halve liter melk. Deze vaststelling van academische aard heeft in elk geval geleid naar meer onderzoek over de samenstelling van biologisch slib en het mogelijk gebruik in de veevoeding [4, 5, 6, 7, 8, 9]. Om redenen van hygiëne en toxicologie werd het gebruik van slib in de voeding afgeremd. Om dit probleem te omzeilen kan men het slib eerst chemisch behandelen. Zo bekomt men door verhitting i.a.v. zwaveldioxyde een produkt dat op melasse lijkt [10]. Partiële hydrolyse van slib en gebruik van het hydrolysaat voor de produktie van nieuwe celproteïnen kan een andere mogelijkheid zijn, al lijkt het proces zeer omslachtig. Op onze beurt hebben we getracht het probleem van de hygiëne en de toxicologie op te lossen door slib te behandelen met alkalische oplossingen en op die manier een proteïne-isolaat te bekommen, hetgeen een betere verteerbaarheid zou moeten verzeke-

ren en kan leiden tot een vermindering van het nucleïnezuurgehalte of van andere ongewenste componenten.

## 2. Materiaal en methoden

### 2.a. Slibsoorten

Bij deze studie werden 8 verschillende slibsoorten gebruikt.

Dit waren:

- Retourslib van een actief-slibinstallatie voor de zuivering van gemeentelijk afvalwater (30.000 i.e.) met lage druk persluchtbeluchting (Inka-systeem).
- Retourslib van een actief-slibinstallatie voor de zuivering van industrieel afvalwater (155.000 i.e.) met turbine oppervlaktebeluchters.
- Bezonden bacteriebedslib van een installatie voor zuivering van gemeentelijk afvalwater (55.000 i.e.).
- Anaëroob vergist slib van een installatie voor de anaërobe slibgisting van primair slib en bacteriebedslib van een zuiveringsinstallatie voor gemeentelijk afvalwater (55.000 i.e.).

e. Spuislib van een zuiveringsinstallatie voor gemeentelijk afvalwater met een mechanische zuivering voor 400.000 i.e. en een biologische zuivering voor 150.000 i.e. Het slib is een mengsel van primair en secundair slib.

f. Het tot 30 % droge stof ingedikt slib van een ontwateringsinstallatie voor slib 'e'. De slibkoek werd bekomen van een roterende trommelfilter. Kalk en ijzertrichloride werden toegevoegd als conditioneringsmiddelen.

g. Spuislib van een oxidatiesloot voor de zuivering van gemeentelijk afvalwater (10.000 i.e.).

h. Actief-slib van een zuiveringsinstallatie voor de vloeïemest van 1.100 kalveren. Deze installatie is uitgerust met een turbine oppervlaktebeluchter.

Voor de slibsoorten 'a' en 'b' werd de methode voor proteïne-extractie geoptimaliseerd; ze werd dan toegepast op de andere slibsoorten.

2.b. *Bepaling van drogestof- en asgehalte*  
Drogestofgehalten werden bepaald na het uitdampen van een bepaald volume of een bepaalde hoeveelheid nat gewicht op 80 °C en het drogen op 105 °C tot constant gewicht. Asgehalten werden bepaald na verhitting van een bepaalde hoeveelheid droge stof op 55 °C tot de stalen een witte of roodbruine kleur hadden [11].

### 2.c. Proteïnebepalingen

Proteïne-bepalingen gebeurden volgens de

biureetmethode [12] of volgens een micro-Kjeldahlmethode [13] met aflezing van de optische dichtheid bij 410 nm. Enkele malen werd ook de proteïne-bepaling volgens Lowry [14] uitgevoerd. Steeds werd runderserumalbumine (15,7 % N) als standaard gebruikt.

### 2.d. Koolhydraatbepalingen

Voor bepaling van het koolhydraatgehalte werd gebruik gemaakt van het anthrone-reagens [12].

### 2.e. Aminozuurontleding

De basische, neutrale en zure aminozuren werden bepaald op een automatisch apparaat volgens de methode van Spackman *et al.* [15]. De zwavelhoudende aminozuren werden bepaald volgens de methode van Moore [16]. Tryptofaan werd bepaald na alkalische hydrolyse en gelfiltratie [17]. Beschikbaar lysine werd bepaald volgens de Silcockmethode [18].

### 2.f. Verteerbaarheidsproeven

De bepaling van de proteïnen, afgebroken met pepsine in HCl, werd uitgevoerd volgens de Aangenomen Methoden voor het Ontleden van Veevoerders [11]; de proteïnen werden evenwel bepaald volgens de micro-Kjeldahlmethode.

'Steady-state'-verteerbaarheidsproeven werden uitgevoerd volgens een methode beschreven door Bauer-Staeb & Bouvard [19]. De proteïnen werden samen met proteolytische enzymen (pepsine, gevolgd door pancreatine) geïncubeerd in een ultrafiltratiecel (Amicon 10 ml 'stirred cell' voorzien van een membraan UM-10 met een scheidingsgrens van 10.000 Dalton). De afbraakprodukten van de proteïnen werden continu uit het reactiemilieu verwijderd met een buffer die doorheen de ultrafiltratiecel werd geperst.

### 2.g. Extractieproeven

Deze werden uitgevoerd met bekertjes van 1 tot 3 liter op een magnetische roerder uitgerust met een elektrische verwarmingsplaat. De temperatuurregeling gebeurde met behulp van een contactthermometer. Meestal werd uitgegaan van een slibcentrifugaat, dat in suspensie werd gebracht in een gegeven hoeveelheid NaOH-oplossing van een bepaalde concentratie en die op 65 °C voorverwarmd was. Soms werd aan de originele slib suspensie zelf een meer geconcentreerde NaOH-oplossing toegevoegd, zodat de verhoudingen van de eindconcentraties van het slib (droge stof) en de NaOH dezelfde werden als bij de methode waarbij van een slibcentrifugaat werd uitgegaan. Na een bepaalde extractietijd werd de suspensie gedurende 20 minuten

gecentrifugeerd. Alle centrifugaties gebeurden bij 3.000 g. Het extract werd vervolgens met HCl aangezuurd tot de gewenste pH. Om een betere centrifugeerbaarheid van de proteïnen te bekomen werden deze gedeneureerd door verwarming tot 80 °C. Na afkoeling werden de neergeslagen proteïnen dan gedurende 30 minuten afgecentrifugeerd.

Van de verschillende frakties werden het proteïnegehalte en het volume of het gewicht bepaald. Zo kon de totale proteïne-inhoud van elke fractie berekend worden.

De rendementen van de verschillende stappen werden als volgt uitgedrukt:

Het extractierendement is de verhouding van de totale proteïne-inhoud van het afgecentrifugeerde extract tot deze van het te extraheren slib, vermenigvuldigd met 100. Het neerslagrendement is de verhouding van de totale proteïne-inhoud van de proteïneerslag tot die van het extract, vermenigvuldigd met 100.

Het globale rendement is de verhouding van de totale proteïne-inhoud van de proteïneerslag tot die van het te extraheren slib, vermenigvuldigd met 100.

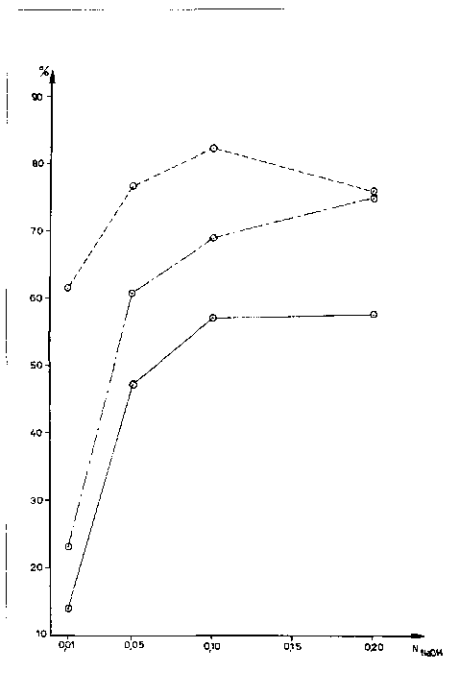
### 3. Resultaten en discussie

#### 3.a. Alkalische extractie van proteïnen uit actief-slib. Optimalisatie van de methode

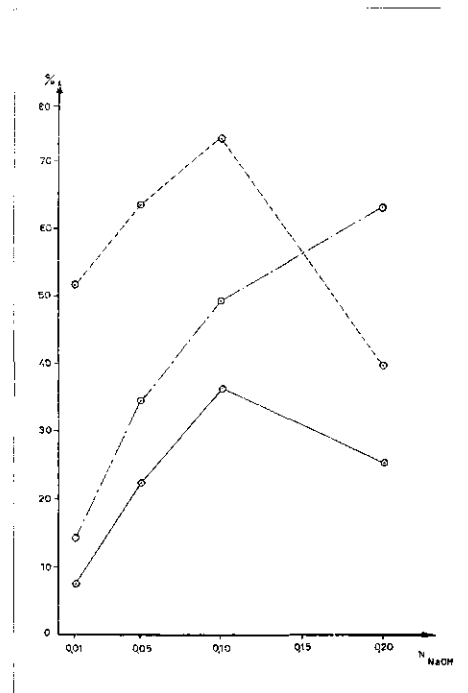
Proteïnen werden reeds vroeger door alkalische extractie bekomen uit biologisch materiaal, o.a. uit bladeren of uit sojabonen [20]. In tegenstelling met plantaardig materiaal bezitten de bacteriën (actief-slib) stevige celwanden en bestaan er geen methoden om deze eerst op industriële schaal te verbrijzelen. In die optiek werd in een eerste fase gewerkt met relatief sterk geconcentreerde oplossingen van NaOH (5 %) voor de extracties [21, 22]. Spoedig bleek echter dat goede resultaten ook met minder geconcentreerde NaOH oplossingen konden bekomen worden.

In tabel I zijn verschillende gebruikte concentraties aan NaOH weergegeven. Telkens werden de extracties doorgevoerd gedurende 30 min. op 65 °C. Voor slib 'a' werd een slibcentrifugaat aangewend waarvan het drogestofgehalte tot 7,25 % kwam te liggen. Voor slib 'b' werd zowel een slibcentrifugaat gebruikt als de originele slibsuspensie zelf. Beide laatste experimenten gaven dezelfde resultaten. Voor het slibcentrifugaat zijn de opgegeven concentraties aan NaOH deze van de oplossing voor de toevoeging van het slib, zodat de eindconcentraties nog wat lager liggen. Uit de tabel I blijkt duidelijk dat de extractierendementen stijgen met de concentratie aan NaOH.

Voor één van de extracten (met 0,1 N



Afb. 1 - Invloed van de NaOH-concentratie op het extractierendement (---), het neerslagrendement (—) en het globale rendement (···) bij extractie van slib 'a'.



Afb. 2 - Invloed van de NaOH-concentratie op het extractierendement (---), het neerslagrendement (—) en het globale rendement (···) bij extractie van slib 'b'.

TABEL I - Invloed van de NaOH-eindconcentratie op het extractierendement.

NaOH-conc. N	slib 'a' 1		slib 'b' 2	
	prot. geh. g/l	extractie-rendement %	prot. geh. g/l	extractie-rendement %
0,01	1,75	23	1,18	14
0,05	4,15	61	2,65	35
0,10	4,70	69	3,30	49
0,20	4,90	75	4,20	63

1 slib 'a': 40 g slibcentrifugaat met een drogestofgehalte van 7,25 % en een proteïnegehalte van 42 % van de droge stof (biureetmethode) werd geëxtraheerd met 200 ml NaOH van de gegeven concentraties.

2 slib 'b': 200 ml met een drogestofgehalte van 1,15 % en een proteïnegehalte van 56 % van de droge stof (biureetmethode) werd geëxtraheerd na toevoeging van 20 ml NaOH met een concentratie van 10 x de aangegeven waarde.

NaOH) werd dan de optimale pH bepaald om de geëxtraheerde proteïnen neer te slaan. De resultaten zijn weergegeven in tabel II.

De optimale pH lijkt hier merkkelijk lager te liggen dan voor sojaproteïnen, welke 4,8 was [23] of voor bladeiwitten, welke 5 was [24]. De supernatans, bekomen na verwijdering van de proteïneerslag, werd bij 2 °C gedialyseerd m.b.v. membranen met doorlaatbaarheidsgrens tot 10.000-15.000 Dalton. Na 12 en 24 uur werden resp. 71 % en 75 % van de stikstofhoudende bestanddelen teruggevonden in het dialysaat. De proteïnen die niet werden neergeslagen op pH 3,5 zijn dus bijzonder

TABEL II - Invloed van de pH op het neerslagrendement.

pH	slib 'a' 1		slib 'b' 2	
	prot. geh. g/l	neerslag-rendement %	prot. geh. g/l	neerslag-rendement %
6,0	2,70	7	—	—
5,0	2,50	14	—	—
4,0	1,30	55	1,04	68
3,5	0,95	67	0,85	74
3,0	0,95	67	1,0	69
2,5	0,96	67	1,06	68

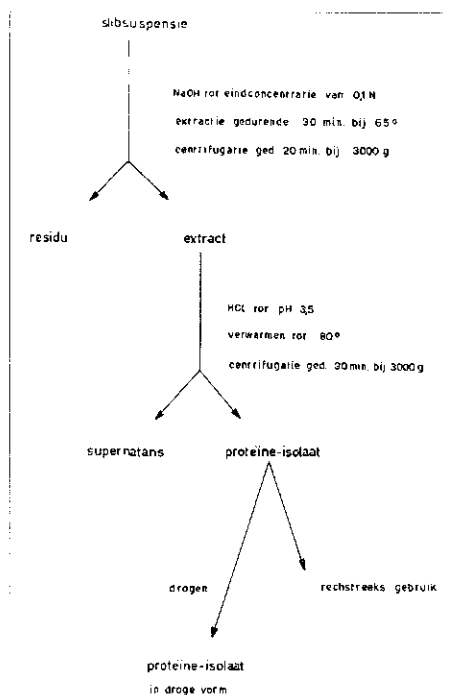
1 slib 'a': 75 ml extract (NaOH 0,1 N, proteïnegehalte = 4,7 g/l (biureetmethode)) wordt met HCl 1 N aangezuurd tot de gegeven pH, verwarmd tot 80°, afgekoeld en afgecentrifugeerd.

2 slib 'b': 75 ml extract (NaOH 0,1 N, proteïnegehalte = 3,3 g/l (biureetmethode)) wordt met HCl 1 N aangezuurd tot de gegeven pH, verwarmd tot 80°, afgekoeld en afgecentrifugeerd.

peptiden en proteïnen met laag moleculair gewicht.

Voor de verschillende NaOH-extracten werd dan een proteïneerslag gemaakt door aanzuren tot op pH 3,5. Op die manier kon in functie van de NaOH concentratie het neerslagrendement en het globale rendement bepaald worden. Dit is weergegeven in afbeeldingen 1 en 2. Voor beide slibssoorten blijkt dat een optimaal neerslagrendement werd bekomen na extractie met NaOH 0,1 N. De lagere rendementen bij hogere NaOH concentratie kunnen verklaard worden door een sterkere hydrolyse van de proteïnen gedurende de extractie.

Uiteindelijk werd met een 0,1 N NaOH concentratie en neerslagvorming op pH 3,5 nog het effect van de extractieduur onderzocht. De resultaten in tabel III tonen aan dat een extractieduur van 30 min. aanvaardbaar is. Het is opmerkelijk dat voor slib 'b' steeds lagere extractierendementen en globale rendementen worden bekomen dan voor slib 'a'. Dit is waarschijnlijk reeds een eerste aanduiding dat de fysiologische toestand van de cellen (het slib) een invloed kan hebben op de proteïne-extracties. Slib 'a' is afkomstig van een installatie waar met lange slibverblijftijden wordt gewerkt en heeft blijkbaar meer partieel geautolyseerde cellen. Slib 'b' daarentegen komt van een installatie waar met korte slibverblijftijden wordt gewerkt. Een extractieduur van 30 min. op 65 °C en neerslagvorming bij pH 3,5 blijken dus aanvaardbare rendementen te geven aan proteïnen. Uit tabel IV blijkt bovendien dat een verhouding van 67 ml NaOH 0,1 N oplossing per gram droge slibstoffen optimaal is voor het globaal rendement. Al verlopen de extracties wel beter met een verhouding van 200 ml NaOH 0,1 N per gram droge



Afb. 3 - Extractieschema voor proteïnen uit zuiveringsslib.

TABEL III - Invloed van de extratietijd op de verschillende rendementen.

extrac-tietijd min.	prot.geh. extract g/l	extractie-rendement %	neerslag-rendement %	globaal rendement %
10	3,2	49	72	35
20	3,4	52	—	—
30	3,6	55	72	40
40	3,9	60	—	—
50	3,9	60	64	38
60	4,0	62	—	—
70	4,1	63	59	37
80	4,2	65	—	—
100	4,5	69	54	38

2.000 ml slib 'b' (proteïnegehalte = 7,2 g/l (biureetmethode)) wordt verwarmd tot 65° en er wordt 200 ml NaOH 1 N toegevoegd. Elke 10 minuten wordt 100 ml slib afgetapt, afgecentrifugeerd en het extractrendement bepaald. Op 50 ml extract wordt het neerslagrendement bepaald.

TABEL IV - Invloed van de gebruikte hoeveelheid NaOH 0,1 N op de verschillende rendementen.

hoeveelheid (ml) NaOH 0,1 N per g slib d.s.	prot.geh. extract g/l	extractie-rendement %	neerslag-rendement %	globaal rendement %
40	10,5	54	67	36
67	7,9	60	71	43
133	3,9	64	62	40
200	2,8	67	58	39

40 g slibcentrifugaat (slib 'a') met een drogestofgehalte van 7,50 % (totaal 3 g droge slibstoffen) en een proteïnegehalte van 48 % van de droge stof (biureetmethode) werd geëxtraheerd met verschillende hoeveelheden NaOH 0,1 N.

slibstoffen, dan is het neerslagrendement toch merkkelijk lager. Dit is blijkbaar te verklaren door de lagere proteïneconcentratie in het extract. Voor alle voorgaande rendementsbepalingen moet aangestipt worden dat de residuele geëxtraheerde slibneerslag niet werd nagewassen, hetgeen onvermijdelijk leidt tot een verlies aan proteïnen. In werkelijkheid zullen alle rendementen dus wat hoger liggen dan aangegeven.

3.b. Comparatief onderzoek op verschillende slibsoorten

Verskillende slibsoorten werden eerst afgecentrifugeerd en de neerslagen gewassen met water. Slib 'f' werd als dusdanig gebruikt. Per gram droge stof werd dan

67 ml NaOH 0,1 N toegevoegd en de extracties doorgevoerd gedurende 30 min. op 65 °C. Door de donkere kleur van extracten bekomen met sommige slibsoorten kon de biureetmethode niet worden toegepast en werd hier steeds de micro-Kjeldahlbepaling uitgevoerd voor de bepaling van proteïnen.

Uit tabel V blijkt eerst en vooral dat het gehalte aan proteïnen van de verschillende slibsoorten nogal sterk kan variëren. Voor actief-slib (a, b en h) is dit gehalte het hoogst en komen de gevonden waarden overeen met deze van andere auteurs [4, 6, 25, 26, 27]. Bacteriebedslib (c) bevat veel minder proteïnen en het gehalte komt overeen met dit van mengsels van primair en secundair slib (d, e). Het slib 'f' bevat weinig proteïnen maar dit is niet verwonderlijk aangezien het conditioneringsmiddelen bevat (kalk en ijzertrichloride).

Oxydatieslootslib (g) heeft een proteïnegehalte intermediair tussen dit van actief-slib en van het mengsel van primair en secundair slib. De extractierendementen zijn voor alle slibsoorten zeer goed.

De neerslagrendementen zijn voor de meeste slibsoorten ook goed uitgezonderd voor slib 'c' en 'f'. De verschillen kunnen natuurlijk te wijten zijn aan het feit dat een pH van 3,5 niet voor alle slibsoorten de optimale pH is. Mits één uitzondering liggen de globale rendementen steeds hoger dan 30 %. Wanneer de verschillende proteïne-neerslagen, na lyofilisatie, ontleed worden, ziet men dat overal een sterk aan

TABEL VI - Samenstelling van enkele proteïne-isolaten na lyofilisatie (in % van de droge stof).

slib-soort	prot.geh. (Kjeldahl)	prot.geh. (Lowry)	koolhydr. gehalte	asgehalte
a	78	70	5,2	11,8
c	40	45	6,4	24,1
d	54	55	5,6	19,7
e	52	47	4,2	19,8
h	70	64	5,1	16,3

TABEL V - Vergelijking van verschillende slibsoorten naar hun proteïnegehalte en hun extraheerbaarheid.

d.s.-gehalte slib-centrifugaat soort (%)	prot. geh. slib (% v. d.s.)	tot. hoev. slib gebruikt bij extractie (g)	tot. hoev. prot. ge-extraheerd (g)	extractie-rendement (%)	tot. hoev. prot. neerslagen (g)	neerslag-rendement (%)	globaal rendement (%)	prot.geh. isolaat (ge-lyofiliseerd) (% v. d.s.)	
a	7,5	45	13,50	8,78	65	5,88	67	44	78
b	9,9	56	16,80	9,07	54	5,53	61	33	70
c	13,8	28	8,40	6,38	76	2,62	41	31	40
d	18,4	19	5,70	4,10	72	2,09	51	37	54
e	24,4	21	6,30	3,84	61	2,31	60	37	52
f	28,0	12	3,60	1,98	55	0,89	45	24	62
g	11,6	34	10,20	7,75	76	5,43	70	53	60
h	7,3	55	16,5	12,71	77	7,88	62	47	70

30 g droge stof van een gewassen slibcentrifugaat werden geëxtraheerd met 2.000 ml NaOH 0,1 N gedurende 30 minuten bij 65°. Het afgecentrifugeerde extract (20 minuten, 3.000 g) werd aangezuurd tot pH 3,5 en verwarmd tot 80°. De neerslagen proteïnen werden afgecentrifugeerd (30 minuten, 3.000 g). De proteïnebepalingen werden uitgevoerd volgens de micro-Kjeldahlmethode.

proteïnen aangerijkt isolaat werd bekomen. De neerslagen werden niet gewassen zodat een hoog zoutgehalte mag verwacht worden (tabel VI). Verwijdering van de zouten zal dus zeker leiden naar een nog rijker preparaat aan proteïnen. Het koolhydraat-gehalte van de proteïne-isolaten is zeer laag.

### 3.c. Kwalitatieve samenstelling van de proteïnepreparaten

#### 3.c.1. Aminozuursamenstelling

Voor verschillende slibsoorten werd de aminozuursamenstelling bepaald, zowel voor het ruwe slib als voor de proteïne-isolaten. De resultaten zijn weergegeven in tabel VII. Hieruit blijkt dat de extractieprocedures niet schadelijk zijn en dat geen noemenswaardige hoeveelheden aan aminozuren verloren gaan. In tabel VIII zijn de verhoudingen (in %) weergegeven van elk der essentiële aminozuren ten opzichte van hun gehalte in ei-proteïnen. Het laagste van deze percenten bepaalt de 'chemical score'. Methionine blijkt duidelijk het eerste limiterende aminozuur. In vergelijking met andere 'single cell'-, plant- en dierproteïnen zijn de proteïnen uit slib van goede kwaliteit met uitzondering van de zwavelhoudende aminozuren (tabel IX).

#### 3.c.2. Verteerbaarheid

Voor twee slibsoorten werd de *in vitro* verteerbaarheid bepaald van de proteïne-isolaten. De resultaten vindt men in tabel X.

## 4. Bespreking en besluit

De kwalitatieve samenstelling van verschillende onderzochte slibsoorten vertoont een grote gelijkheid, hetgeen niet gevonden werd voor wat betreft de kwantitatieve samenstelling. Onder niet al te strenge voorwaarden konden proteïne-isolaten bekomen worden met extractierendementen die te vergelijken zijn met deze bekomen voor bacterie-, gist- en algencellen, die vooraf werden gebroken met glazen parels [31]. Extractie onder strengere voorwaarden moet worden vermeden omwille van de nefaste invloed van een sterke alkalische behandeling op de aminozuursamenstelling en de verteerbaarheid van proteïnen [32]. Vooral lysine en zwavelhoudende aminozuren zijn base-gevoelig.

Door  $\beta$ -eliminatie van cystine kan dehydroalanine worden gevormd, dat als reactief intermediair additiereacties kan ondergaan met andere aminozuren of amines en zwavelverbindingen ter vorming van verschillende nieuwe aminozuren zoals bijv. lysinoalanine [33], lanthionine [34], ornithinoalanine [35] en  $\beta$ -aminoalanine [36]. Bij de gebruikte extractie-

TABEL VII - Aminozuursamenstelling in g/16 g N van verschillende slibsoorten (S) en hun proteïne-isolaten (P).

aminozuur	a S	a P	c S	c P	d S	d P	e S	e P	h S	h P
asparaginezuur	9,9	11,5	9,1	10,5	9,1	10,1	10,1	6,8	8,7	10,4
threonine	5,3	5,7	4,8	6,0	4,7	4,6	6,2	5,9	4,6	4,7
serine	4,1	4,3	4,7	4,7	4,4	4,1	5,3	6,1	3,7	3,8
glutaminezuur	9,5	10,4	10,3	10,8	9,4	10,7	11,9	11,5	8,2	9,8
proline	3,5	4,0	6,3	7,2	4,1	4,1	4,5	4,2	3,2	3,7
glycine	5,6	6,1	5,6	6,9	6,3	6,1	6,4	5,1	5,0	5,8
alanine	7,0	7,7	7,5	7,4	6,2	6,4	7,0	10,0	6,3	7,1
valine	5,6	6,8	6,0	7,3	5,5	6,0	6,2	6,1	5,0	6,2
isoleucine	3,9	5,0	4,4	8,6	3,8	5,1	4,7	3,5	3,5	4,4
leucine	6,7	8,5	5,8	8,4	6,2	8,5	7,7	6,7	5,8	7,2
tyrosine	3,1	4,3	3,5	3,7	3,5	3,6	4,3	2,0	2,5	4,3
fenylalanine	4,4	5,9	4,4	6,9	5,2	5,5	4,8	3,4	3,2	4,4
lysine	4,7	5,2	6,2	6,5	5,4	5,8	5,1	5,0	5,4	5,0
beschikb. lysine	3,5	5,0	5,0	5,3	4,5	4,0	4,0	3,9	4,7	4,4
histidine	1,5	1,9	3,8	3,4	2,0	2,2	1,7	1,3	1,5	1,8
arginine	4,9	5,7	6,3	6,7	4,2	5,0	4,6	4,4	4,7	4,5
methionine	0,6	0,7	0,6	1,1	0,9	1,5	1,6	0,6	1,4	1,4
cystine	0,8	0,5	0,5	0,4	0,7	0,65	0,7	0,4	0,4	0,3
tryptofaan	2,0	2,4	1,0	1,9	1,0	1,7	1,2	1,3	1,3	2,2

Zie sectie: Materiaal en Methoden.

TABEL VIII - Verhoudingen (in %) van het gehalte van elk aminozuur t.o.v. zijn gehalte in ei-proteïnen.

aminozuur	ei-prot. g/16 g N	a S	a P	c S	c P	d S	d P	e S	e P	h S	h P
threonine	4,6	115	124	104	130	102	100	135	128	100	102
valine	6,3	89	108	95	116	87	95	98	97	79	98
isoleucine	5,6	70	89	79	154	68	91	84	63	63	79
leucine	9,8	68	87	59	86	63	87	79	68	59	73
fenylalanine	6,2	71	95	71	111	84	89	77	55	52	71
lysine	7,5	63	69	83	87	72	77	68	67	72	67
beschikb. lysine	7,5	47	67	67	71	60	53	53	52	63	59
histidine	3,0	50	63	127	113	67	73	57	43	50	60
arginine	6,8	72	84	94	99	62	74	68	65	69	66
methionine	4,0	15	18	15	28	23	38	40	15	35	35
tryptofaan	1,45	138	166	69	131	69	117	83	90	90	152

aS = slibsoort a, aP = proteïne-isolaat a, enz.

TABEL IX - Vergelijking van de aminozuursamenstelling van slibproteïnen en van proteïne-isolaten, bekomen uit slib, met enkele andere proteïnebronnen.

amino- zuur	FAO- referentie	geëxtrah.				BP-gist 'G' 1	BP-gist 'L' 1	algen Spi- rulina 2	bacteriën WO- 100 6 <sup>2</sup>	bacte- riën B <sub>1</sub> SNO <sub>3</sub> <sup>3</sup>	proteïne isolaat uit	
		caseïne 2	sojaboon- meel 1	vis- meel 1	zuive- rings- slib 4						zuive- rings- slib 4	
threonine	2,8	4,9	4,0	4,2	4,9	5,4	5,4	4,0	4,4	5,1	5,4	
valine	4,2	7,2	5,0	5,2	5,9	5,8	7,5	4,9	6,2	5,7	6,5	
isoleucine	4,2	6,1	5,4	4,6	5,1	5,3	6,4	4,3	4,5	4,1	5,3	
leucine	4,8	9,2	7,7	7,3	7,4	7,8	10,4	6,3	7,5	6,4	7,9	
tyrosine	—	6,3	2,7	2,9	3,6	4,0	5,0	3,1	3,6	3,4	3,6	
fenylalanine	2,8	5,0	5,1	4,0	4,3	4,8	5,4	4,1	4,3	4,4	5,2	
lysine	4,2	8,2	6,5	7,0	7,4	7,8	4,4	5,4	4,8	5,4	5,5	
histidine	—	3,1	2,4	2,3	2,1	2,1	—	—	1,8	2,1	2,1	
arginine	—	4,1	7,7	5,0	5,1	5,0	—	—	5,1	4,9	5,3	
methionine	2,2	2,8	1,4	2,6	1,8	1,6	2,9	2,6	2,3	1,0	1,1	
cystine	2,0	0,34	1,4	1,0	1,1	0,9	—	—	1,3	0,6	0,45	
tryptofaan	1,4	1,7	1,5	1,2	1,4	1,3	1,5	0,8	2,4	1,3	1,9	

<sup>1</sup> Shacklady [28] <sup>2</sup> Vanbelle [29] <sup>3</sup> D'Mello [30]

<sup>4</sup> Deze cijfers zijn gemiddelde waarden van de gegevens in tabel VII.

methode komt deze invloed van de alkalische behandeling op de aminozuursamenstelling van de proteïnen uit het slib enkel tot uiting in een daling van het cystine-gehalte met gemiddeld 25 %. Op het lysinegehalte is die invloed, mede door het grotere gehalte aan lysine t.o.v. cystine, niet meer waar te nemen.

TABEL X - Verteerbaarheid van enkele proteïne-isolaten.

slibsoort	met pepsine			residu
	in HCl	onder 'steady-state'-voorw. pepsine	pancreatine	
a	65 %	7,9 %	70,9 %	22 %
h	68 %	6,8 %	70,8 %	21 %
ei-albumine	—	12,2 %	83,6 %	4,2 %

Zie sectie: Materiaal en Methoden.

TABEL XI - Eventuele dagelijkse produktie van proteïne-isolaat voor verschillende types van zuiveringsinstallaties.

installatie	overeenkomende onderzochte slibsoort	slib- produktie * g d.s./inw.d.	proteïne- geh. (slib) % v. d.s.	globaal rendement %	hoeveelheid prot.-isolaat g prot./inw.d.
oxidatiebedden, hoog belast					
— secundair slib	c	20	28	31	1,74
— primair + secundair slib (uitgegist)	d	48	19	37	3,37
actief-slib, hoog belast					
— secundair slib	a	31	45	44	6,14
— primair + secundair slib	e	79	21	37	6,14
oxidatiesloot	g	40	34	53	7,21

\* Deze gegevens werden overgenomen uit Koot [38].

In de bekomen proteïne-isolaten is het profiel van de essentiële aminozuren goed uitgezonderd voor de zwavelhoudende aminozuren. De isolaten zouden dus kunnen aangerijkt worden met synthetische methionine. Hiervan wordt zowel de D- als de L-vorm benut en bovendien is dit een van de goedkoopste aminozuren. Vergelijken met een prijs van 80 BF/kg voor DL-methionine, kost L-lysine. HC1 150 BF/kg, DL-tryptofaan 750 BF/kg en L-threonine 2.000 BF/kg [37]. Een algemeen schema voor de bereiding van proteïne-extracten wordt voorgesteld in afb. 3. Het zou nochtans wenselijk zijn dat voor elke slibsoort eerst de voornaamste parameters worden bepaald zoals de optimale eindconcentratie aan NaOH en de optimale pH van neerslagvorming. Op basis van de gevonden proteïnegehalten van het slib en de bekomen globale rendementen werd voor verschillende zuiveringsinstallaties gezocht naar een dagelijks rendement aan proteïnen.

Dit is weergegeven in tabel XI. Hieruit blijkt dat het hoogste rendement bekomen wordt bij een oxidatiesloot. De reden voor een hoger rendement bij een oxidatiesloot t.o.v. een actief-slibinstallatie ligt in een hoger globaal rendement voor de proteïne-extractie; dit hogere rendement kan een gevolg zijn van een hoger gehalte aan partieel geautolyseerde cellen in het oxidatiesloot-slib. Ook voor de zuiveringsinstallatie voor industrieel afvalwater (slib 'b') werd berekend hoeveel proteïne-isolaat (op basis van 100 % proteïnen) zou kunnen geproduceerd worden. Met een afvalstroom van 70 m<sup>3</sup>/uur en ongeveer 8.000 mg COD/l zouden per dag ongeveer 13.440 kg COD in de installatie terecht komen.

Op het laboratorium werd voor het actief-slib onder analoge belastingvoorwaarden de slibaangroei bepaald in een bio-oxidatie-apparaat volgens Busch [39]; deze was 0,2 g droog slib per g verwijderde COD.

Aldus zou per dag ongeveer 2.690 kg slib droge stof moeten afgevoerd worden. Daar dit slib voor 56 % van de droge

stof uit proteïnen bestaat en deze proteïnen met een globaal rendement van 33 % onder vorm van isolaat konden verkregen worden, zouden zo per dag  $2.690 \times 0,56 \times 0,33 = 497$  kg proteïnen kunnen bekomen worden; per jaar zou dit 181.400 kg proteïnen opleveren. Aan een prijs van 20 BF/kg, zoals voor 'single cell'-proteïnen [40], zou dit per jaar een bedrag betekenen van 3,6 miljoen BF. Verschillende problemen zijn echter nog op te lossen: Een rationele produktie van slibproteïnen kan maar best geschieden wanneer er voldoende grondstoffen (slib) aangevoerd kunnen worden. Wat zal de bestemming zijn van het extractie-residu? Wat zal de bestemming zijn van het supernatans na het bekomen van de proteïne-neerslag? Wat zal de kostprijs zijn van het produkt? Wat is de kwaliteit van het produkt (gehalte aan zware metalen, aan nucleïne-zuren, aan onbekende toxische verbindingen)? Doch waarschijnlijk zal het probleem van de recuperatie van nuttige produkten uit afvalstoffen meer en meer op sociaal vlak moeten gezien worden dan van zuiver economisch standpunt uit, en van dat standpunt uit is het dus zeker dat uit slib proteïnen kunnen gewonnen worden. Voor grote veeteeltbedrijven is het misschien mogelijk het proteïne-extract te neutraliseren en het als dusdanig te verbuiken voor het mengen met andere voeders. Dit vermijdt dan de neerslagvorming en -recuperatie en het drogen, hetgeen een enorme besparing aan apparatuur en energie kan betekenen. Heel wat meer onderzoek is zeker gewenst, en niet in de minste mate onderzoek naar voedingswaarde *in vivo* en eventuele toxische verbindingen.

## 5. Dankwoord

De auteurs danken Dr. Ir. W. Vervack (Centre de Zootechnie, Lovenjoel, Université Catholique de Louvain) voor de technische hulp geboden bij de aminozuur-ontleding, alsmede de Directeur van het Centrum, Prof. A. de Vuyst.

## Literatuur

- Gale, R. S., 1972, Symp. Incin. *Refuse and Sludge*, Southampton Univ., 4th January.
- Forster, C. F., 1973, *Sludge - waste of raw material?* Eff. Wat. Trt. J., 13, 697-699.
- Corti, U. A., 1953, *Chemical studies of the proteins in activated sludge from sewage disposal plants*, Schweiz. Z. Hydrol. (Switz.), 15, 152-157.
- Behrens, U. en Sattler, K., 1961, *Obtention of valuable substances in biological purification of industrial effluents*, Microbiologia, 31, 344-349.
- Ono, H., 1971, in Sakaguchi, K., Uemura, T. en Kinoshita, S., ed., *Biochemical and Industrial Aspects of Fermentation*, 297-306, Tokyo.
- Poincelot, R. P., 1972, *The biochemistry and methodology of composting*, The Connecticut Agricultural Experiment Station, Bulletin 727.
- Rohrer, E., 1970, *Verfahren zur Gewinnung eines Füttermittels aus Abwasserklärslamm*, Offenlegungsschrift 1936 580, Aktenzeichen P19375805, Anmelder E. Rohrer, Vertreter A. von Kreisler et al., Land: Schweiz, Deutsches Patentamt.
- Greiser, C. L., 1971, *Wat. Wastes Engng.*, 8, 34.
- Bringmann, G. et al., 1969, *Gesundheitsingenieur*, 90, 219.
- Bouthilet, R. J. en Dean, 1970, *Adv. Wat. Wat. Polutt. Res.*, III, 31/1.
- Belgisch Ministerie van Landbouw, 1973, *Aangenomen methoden voor het ontleiden van veevoeders*.
- Herbert, D., Phipps, P. J. en Strange, R. E., 1971, *Chemical analysis of microbial cells, Methods in Microbiology*, vol. 5B, 209-344, ed. J. R. Norris en D. W. Ribbons, Academic Press, London and New York.
- Strauch, L., 1965, *Ultramikro-Methode zur Bestimmung des Stickstoffes in biologischem Material*, Z. Klin. Chem., 3, 165-167.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Fahr, A. L. en Randall, R. J., 1951, *Protein-measurement with the folin-phenol reagent*, J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Spackman, D. H., Stein, W. H. en Moore, S., 1958, *Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids*, Anal. Chem., 30, 1190-1206.
- Moore, S., 1963, *On the determination of cystine as systemic acid*, J. Biol. Chem., 238, 235-237.
- De Vuyst, A., Vervack, W., Vanbelle, M., Foulon, M. en Teller, E., 1974, *Importance des conditions d'hydrolyse des protéines pour le dosage du tryptophane*, Rev. Ferm. et Ind. Alim., 29, 81-86.
- Roach, A. G., Sanderson, P. en Williams, D. R., 1967, *Comparison of methods for the determination of available lysine value in animal and vegetable protein sources*, J. Sci. Fd Agric., 18, 274-278.
- Bauer-Staeb, G. en Bouvard, F., 1973, *An in vitro model for the determination of amino acid availability and digestion kinetics of protein containing foods and its application to yeast*, Lebensm.-Wiss. u. Technol., 6, 219-223.
- Morrison, J. E., en Pirie, N. W., 1961, *The large-scale production of protein from leaf extracts*, J. Sci. Fd Agric., 12, 1-5.
- Geenen, P., 1973, *Onderzoek naar het proteïne-gehalte van slib afkomstig van de biologische zuivering van afvalwaters, inclusief vloeimeest van veeteeltbedrijven*, Eindwerk, Fac. Landbouwwetenschappen, Katholieke Universiteit Leuven.
- Geenen, P., 1973, *Valorisatie van het slib (abstract)*, Agricultura, 21, 207.
- Gruell, E. H. M., 1974, *Gestructureerde plant-*

- aardige proteïnen voor de menselijke voeding*, Chem. Weekblad, 70, 17-21.
24. Adriaens, L., 1973, *La valorisation de vegetaux par l'extraction des protéines*, Revue de l'agriculture, 16, 449-459.
25. Baars, J. K., 1965, *Bacteriologie der methaan-gisting*, Cursus slibverwerking, Leiden.
26. Pillai, S. C., Mohan Rao, G. J., Krishnamurthy, K. en Prabhakara Rao, A. V. S., 1953, *Amino acids in sewage and activated sludge*, Current Sci. (India), 22, 235.
27. Sridhar, M. K. C. en Pillai, S. C., 1973, *Proteins in waste water sludges*, J. Water Poll. Control Fed., 45, 1595-1600.
28. Shacklady, C. A., 1974, *Response of livestock and poultry to SCP*, in 'Single Cell Protein' (Proceedings of the International Symposium held in Rome, Italy, on November 7-9, 1973), 115-128, ed. P. Davis, Academic Press, London - New York - San Francisco.
29. Vanbelle, M., 1974, *Nieuwe inzichten in de eiwitvoorziening voor de mens*, Het Ingenieursblad, 43, 343-368.
30. D'Mello, J. P. F., 1972, *A study of the amino acid composition of methane utilizing bacteria*, J. Appl. Bacteriol., 35, 145-148.
31. Hedenskog, G., Mogren, H., en Enebo, L., 1970, *A method for obtaining protein concentrates from micro organisms*, Biotechnol. Bioeng., 12, 947-959.
32. De Groot, A. P. en Slump, P., 1969, *Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value*, J. Nutr., 98, 45-56.
33. Bohak, Z., 1964, *N $\epsilon$ -(DL-2-amino-2 carboxyethyl)-L-lysine, a new amino acid formed on alkaline treatment of proteins*, J. Biol. Chem., 239, 2878-2887.
34. Mellet, P. en Swanepoel, O. A., 1965, *The modification of native and denatured keratin by alkali*, Naturwissenschaften, 52, 495-496.
35. Ziegler, K., Melchert, I. en Lurken, C., 1967, *N $\delta$ -(2-amino-2 carboxyethyl)-ornithine, a new amino acid from alkali-treated proteins*, Nature, 214, 404-405.
36. Asquith, R. S. en Carthew, P., 1972, *An investigation of the mechanism of alkaline degradation of cystine in intact protein*, Biochim. Biophys. Acta, 278, 8-14.
37. Vanbelle, M., 1974, *Nieuwe inzichten in de eiwitvoorziening voor onze huisdieren*, Het Ingenieursblad, 43, 369-377.
38. Koot, A. C. J., 1974, *Behandeling van afvalwater*, Waltman, Delft.
39. Busch, A., 1959, *Laboratory unit for bench scale studies*, Water and Sewage Works, 106, 254-256.
40. Abbott, J. C., 1974, *Economics of single cell protein in relation to world protein supplies*, in 'Single Cell Protein' (Proceedings of the International Symposium held in Rome, Italy, on November 7-9, 1973), 25-45, ed. P. Davis, Academic Press, London - New York - San Francisco.

