

改进的氨水法提取活性污泥中聚-3-羟基丁酸酯的试验

林东恩¹, 高振忠², 张逸伟¹, 沈家瑞³

(1 华南理工大学 应用化学系, 广东 广州 510640; 2 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642;

3 华南理工大学材料学院, 广东 广州 510640)

摘要: 改进的氨水法提取活性污泥中聚-3-羟基丁酸酯(poly-3-hydroxybutyrate, PHB)的实验表明: 提取率为 63.65%, 纯度为 95.59%(w)。它是一种对环境污染较小, 成本较低的提取方法。

关键词: 活性污泥; 可生物降解塑料; 聚-3-羟基丁酸酯; 提取

中图分类号: X703

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)03-0093-02

聚-3-羟基丁酸酯(Poly-3-hydroxybutyrate, 简称 PHB)是许多原核微生物在不平衡生长条件(如缺乏氮、氧、镁)下合成的胞内能量和碳源储藏性聚合物, 是一种完全可生物降解的热塑性聚酯^[1]。PHB 在废水生物处理中起着重要的作用。国外已有关于利用活性污泥合成 PHB 进行污泥资源化和减量化的报道^[2,3], 笔者也开展了剩余污泥在厌氧和好氧条件下积累 PHB 水平以及不同碳源对 PHB 结构影响的研究^[4,5]。在以往发表的利用活性污泥积累 PHB 的报道中, 关于 PHB 产率的报道大部分是利用气相色谱计算出来的, 没有真正把 PHB 从细胞中提取出来^[2]。为此, 笔者对活性污泥中 PHB 的提取方法进行探索, 为污水处理厂剩余污泥的开发利用及减量化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

活性污泥驯化、培养以及积累 PHB 见文献^[4]; 丙酮、氯仿、甲醇均为分析纯(市售)。

1.2 PHB 的提取方法

1.2.1 次氯酸钠-氯仿法 见文献^[6]。

1.2.2 改进的氨水提取法 把积累了 PHB 的活性污泥(MLSS 为 4 000~5 000 mg/L)及废水加热至沸腾 10 min, 然后转移到-5℃下冷冻干燥脱水, 菌体置于 3 L 配有电磁搅拌和球形冷凝管及尾气吸收装置的三口烧瓶里, 加入 1 mol/L 的氨水 2 L, pH=11.4, 水浴加热, 控温 45℃, 搅拌 1 h。离心, 氨水层棕色, 底部有不溶于氨水的物质, 小心分离氨水层与不溶物。不溶物用 10 mL 的丙酮洗涤 2 次, 剩余物用 10 mL 的氯仿抽提, 滤去不溶物。氯仿浓缩, 加甲醇沉淀出白色 PHB 颗粒, 抽滤, 风干。

1.3 PHB 的分析方法

PHB 的含量采用紫外分光光度法测定^[1,5]。

2 结果与讨论

PHB 以颗粒状态被细胞壁、细胞膜包裹在细胞中, 需要破胞后才能将 PHB 提取出来, 因此 PHB 的提取成为降低 PHB 生产成本的关键技术。对于纯种培养合成 PHB, 例如真养产碱杆菌生产 PHB, 采用的提取方法主要有次氯酸钠法、有机溶剂法、次氯酸钠-氯仿法^[6]以及酶法等。次氯酸钠法引起 PHB 的分子量严重降解, 有机溶剂法带来严重的环境污染, 而酶法成本高, 次氯酸钠-氯仿法适合实验室采用。为了避免采用有机溶剂对环境的污染, 从环保的角度出发, 目前研究的重点是水相法提取 PHB。

文献^[7]介绍采用氨水破胞提取 PHB, 并指出氨水提取法只适合于 *Azotobacter vinelandii* UWD 菌种, 因为这种菌种的细胞脆性大, 容易破胞, 而其他菌种则提取率低。由于氨水提取法成本低, 没有有机溶剂提取所带来的污染问题, 因此笔者尝试采用氨水法提取活性污泥 PHB。

文献^[7]介绍采用热氨水破胞后, 将剩余物用水洗涤, 抽滤即得 PHB, 产物纯度达 90%(w), 内含 10%(w)的杂质, 其中大部分为蛋白质。笔者按照文献^[7]的方法进行操作, PHB 的产量比测定值还高, 可见, 热氨水提取后的剩余物除了 PHB 外, 还存在没有破胞的细胞, 在显微镜下还能看见一些完整的细胞结构。实验发现把积累了 PHB 的活性污泥及废水体系加热至沸腾 5 min, 马上把体系转移到-5℃的冰箱里进行冷冻, 可以增加细胞的脆性。采用热氨水提取后对剩余物增加丙酮洗涤的步骤, 使没有破胞的细胞在丙酮作用下破胞以及残存的细胞组织转移到丙酮相里。经过这样处理得到 PHB 的粗产品, 元素分析值为: w(C): 54.22%; w(H): 6.01%; w(N): 3.45%。而理论值应是: w(C): 55.81%, w

(H): 6.97%, w(N): 0%. PHB 本身并不含氮, 粗产物中含氮, 说明粗产物中含有杂质, 杂质的来源很复杂, 大部分是蛋白质^[7], 也有一部分是细胞组织, 为了使问题简单化, 笔者做出了杂质全部为蛋白质的假设, 则蛋白质占粗产品的 20.3%(w)[按一般蛋白质含 w(N)为 17%来计算], 因此, 粗产品中 w(PHB)

只有 79.7%. 而采用次氯酸钠-氯仿法提取的 PHB 纯度较高, 元素分析值为: w(C): 55.17%; w(H): 6.78%; w(N): 0.53%, 同理计算得出蛋白质含量为 3.12%(w), 则 PHB 的含量达 96.88%(w). 由于采用氨水所提取 PHB 的纯度不高, 得到 PHB 粗产品后采用 10 mL 氯仿进行抽提, 得到比较好的结果(表 1).

表 1 3 种聚-3-羟基丁酸酯(PHB)的提取方法的比较
Tab. 1 The comparison of three methods for extracting poly-3-hydroxybutyrate (PHB)

提取方法 extraction method	PHB 测定值 amount of PHB detected/(g·L ⁻¹)	产物 product			
		提取量 extract yield/(g·L ⁻¹)	w(N)/%	w(PHB)/%	提取率 recovery ratio/%
次氯酸钠-氯仿 sodium hypochlorite-chloroform	1.013	0.820 5	0.53	96.88	78.46
氨水提取法 aqueous NH ₃ method	1.007	0.846 5	3.45	79.70	67.00
改进的氨水法 improved aqueous NH ₃ method	1.017	0.677 2	0.75	95.59	63.65

1) 提取率= 产物的提取量× PHB 质量分数/ PHB 测定值

从表 1 中得知, 采用改进的氨水法, PHB 的提取率与氨水法接近, 但纯度大幅度提高, 与次氯酸钠-氯仿法相近. 虽然改进的氨水法在提取率上偏低, 但其优势在于所用的有机溶剂量比次氯酸钠-氯仿法减少, 而且氨水里所包含的破碎的细胞组织可以经过一些提纯处理得到蛋白质、N-乙酰氨基葡萄糖等成分, 为实现活性污泥合成 PHB 的绿色生产提供一条可能途径, 这是次氯酸钠-氯仿法无法比拟的.

3 结论

采用氨水法提取活性污泥中 PHB, 提取率达 67.00%, 纯度 79.70%(w), 采用改进的氨水法提取 PHB, 提取率为 63.65%, 纯度为 95.59%(w). 这 2 种方法比次氯酸钠-氯仿法对环境造成的污染少, 深入研究有待进一步展开.

参考文献:

[1] LEE S Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates [J]. Biotechnol Bioeng, 1996, 49(1): 1—14.

[2] SATOH H, IWAMOTO Y, MATSUO T. Activated sludge as a possible source of biodegradable plastic[J]. Wat Sci Tech, 1998, 38(2): 103—109.
[3] MA C K, CHUA H, YU P, et al. Optimal production of poly-hydroxyalkanoates in activated sludge biomass[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000, 84(6): 981—989.
[4] 林东恩, 张逸伟, 郭世强, 等. 活性污泥好氧-厌氧合成聚-3-羟基丁酸酯[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2002, 30(9): 100—104.
[5] 林东恩, 张逸伟, 韦朝海, 等. 外加碳源的活性污泥合成生物降解塑料 PHAs 的试验研究[J]. 环境科学, 2003, 24(2): 97—101.
[6] HAHN S K, CHANG Y K, KIM B S, et al. Communication to the editor optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44 (2): 256—261.
[7] WILLIAM J P, ANTHONY C. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of Poly-3-hydroxybutyrate[J]. Applied Environmental Microbiology, 1993, 59(12): 4236—4244.

Recovery of Poly-3-Hydroxybutyrate by Improved Method of Aqueous NH₃ from Activated Sludge

LIN Dong-en¹, GAO Zhen-zhong², ZHANG Yi-wei¹, SHEN Jia-rui³

(1 Department of Applied Chemistry, South China Univ. of Tech., Guangzhou 510640 China; 2 College of Forestry, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; 3 College of Material, South China Univ. of Tech., Guangzhou 510640 China)

Abstract: The recovery method for PHB from activated sludge was investigated in this paper. An improved aqueous NH₃ method to extract PHB, which allowed lower pollution and cost, was discussed. PHB recovery rate and purity could reach 63.65% and 95.59%(w) respectively.

Key words: activated sludge; biodegradable plastic; poly-3-hydroxybutyrate; recovery

【责任编辑 李晓丹】