



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115746292 B

(45) 授权公告日 2023.12.22

(21) 申请号 202210477115.4

EP 2133419 A1, 2009.12.16

(22) 申请日 2022.05.03

审查员 高斌

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 115746292 A

(43) 申请公布日 2023.03.07

(73) 专利权人 湘潭大学  
地址 411105 湖南省湘潭市雨湖区湘潭大学

(72) 发明人 张鹏 邹奎 刘宏远 曾金玉

(51) Int.Cl.  
C08G 69/10 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 103200827 A, 2013.07.10  
CN 109926029 A, 2019.06.25  
CN 110791534 A, 2020.02.14

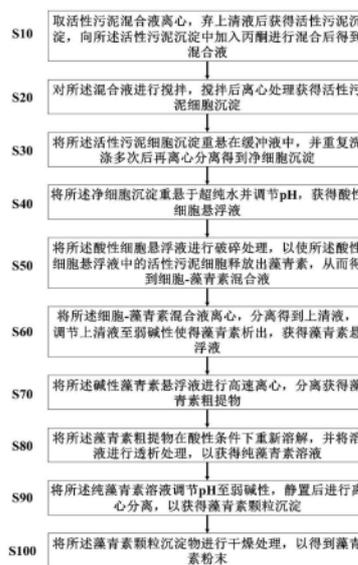
权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

一种活性污泥中藻青素的提取方法

(57) 摘要

本发明属于污泥资源化利用领域,具体涉及一种用于提取活性污泥中藻青素的方法。本发明以活性污泥为原料,经过丙酮预处理后离心分离得到活性污泥细胞沉淀,对细胞沉淀进行多次洗涤并离心分离,而后将净细胞沉淀重悬液在中高温、强酸的条件 下搅拌后收集上清液并调节为弱碱性条件得到藻青素粗提物。再将藻青素粗提物溶解,在酸性条件下进行透析以得到纯藻青素溶液,调节纯藻青素溶液至弱碱性后获得藻青素沉淀,最后将沉淀冷冻干燥以获得藻青素粉末。本发明涉及的藻青素属于活性污泥胞内生物聚合物,是可以从污水处理厂中回收的高附加值生物聚合物。



1. 一种用于提取活性污泥中藻青素的方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - S10、取活性污泥混合液离心,弃上清液后获得活性污泥沉淀,向所述活性污泥沉淀中加入丙酮进行混合后得到混合液;
  - S20、对所述混合液进行搅拌,搅拌后离心处理获得活性污泥细胞沉淀;
  - S30、将所述活性污泥细胞沉淀重悬在缓冲液中,并重复洗涤多次后再离心分离得到净细胞沉淀;
  - S40、将所述净细胞沉淀重悬于超纯水并调节pH,获得酸性细胞悬浮液;
  - S50、将所述酸性细胞悬浮液进行破碎处理,以使所述酸性细胞悬浮液中的活性污泥细胞释放出藻青素,从而得到细胞-藻青素混合液;
  - S60、将所述细胞-藻青素混合液离心,分离得到上清液,调节上清液至弱碱性使得藻青素析出,获得藻青素悬浮液;
  - S70、将所述碱性藻青素悬浮液进行高速离心,分离获得藻青素粗提物;
  - S80、将所述藻青素粗提物在酸性条件下重新溶解,并将溶液进行透析处理,以获得纯藻青素溶液;
  - S90、将所述纯藻青素溶液调节pH至弱碱性,静置后进行离心分离,以获得藻青素颗粒沉淀;
  - S100、将所述藻青素颗粒沉淀物进行干燥处理,以得到藻青素粉末。
2. 根据权利要求1所述的用于提取活性污泥中藻青素的方法,其特征在于:在步骤S10中,所述丙酮按照每1g所述活性污泥沉淀加入15ml~20ml的标准添加。
3. 根据权利要求1所述的用于提取活性污泥中藻青素的方法,其特征在于:在步骤S20中,搅拌转速为1400rpm~1600rpm。
4. 根据权利要求1所述的用于提取活性污泥中藻青素的方法,其特征在于:在步骤S30中,使用的缓冲液为Tris-HCl溶液,所述Tris-HCl溶液浓度为1mol/L。
5. 根据权利要求1所述的用于提取活性污泥中藻青素的方法,其特征在于:在步骤S40中,所述酸性细胞悬浮液的pH为1。
6. 根据权利要求1所述的用于提取活性污泥中藻青素的方法,其特征在于:在步骤S50中,搅拌时间为1h~1.5h,搅拌转速为1400rpm~1600rpm,恒温温度为60℃~65℃。
7. 根据权利要求1所述的用于提取活性污泥中藻青素的方法,其特征在于:在步骤S60中,所述碱性藻青素悬浮液的pH为7.5~8.5,静置条件为:4℃,30min~60min。
8. 根据权利要求1所述的用于提取活性污泥中藻青素的方法,其特征在于:在步骤S80中,使用pH=1的酸性溶液溶解所述藻青素粗提物。
9. 根据权利要求1所述的用于提取活性污泥中藻青素的方法,其特征在于:在步骤S90中,调节所述纯藻青素溶液pH为7.5~8.5。
10. 根据权利要求1所述的用于提取活性污泥中藻青素的方法,其特征在于:在步骤S100中,使用恒温干燥法、干燥器干燥法或冷冻干燥法对所述藻青素颗粒沉淀物进行干燥处理。

## 一种活性污泥中藻青素的提取方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于污泥资源化利用领域,具体涉及一种用于提取活性污泥中藻青素的方法。

### 背景技术

[0002] 目前强调的可持续发展理念对于污水处理系统来说,主要在于中水回用以及从污水中资源的回收。在这种情况下,活性污泥即絮状、颗粒状或生物膜形式的微生物细胞的聚集体,可被视为一种具有高附加值资源的潜在来源。例如,从活性污泥中提取的类海藻酸钠和聚羟基丁酸酯等已经得到了较好的研究和应用,但其他更多的高附加值生物聚合物有待挖掘和回收应用。藻青素作为活性污泥微生物合成的重要胞内生物聚合物之一,因其本身具有丰富的官能团、合成途径简单和产量可观等特点而具备高的应用和回收潜力。

[0003] 藻青素,简称CGP(cyanophycin granule peptide),是继聚 $\gamma$ -谷氨酸和聚 $\epsilon$ -赖氨酸之后的已知自然界中存在的第三种聚氨基酸,可由大多数蓝细菌及一些异养细菌天然合成。藻青素是一种非核糖体合成的氨基酸聚合物,包括由天冬氨酸组成的骨架和精氨酸组成的侧链。由于其特有的化学和材料性质而被广泛应用于食品、医药、化妆品、营养和农业等领域。藻青素可通过将cphA基因在工程菌株中异源表达而进行批量生产。迄今为止,多种工程菌株包括大肠杆菌,恶臭假单胞菌,富养产碱菌,米根霉菌和酿酒酵母菌等已经被用于生产藻青素。

[0004] 目前,藻青素的提取方法已被广泛报道,但均是针对微生物纯菌种或基因工程菌种。由于其获取过程繁琐、限制条件严格和提取成本高的特点导致其并不适用于活性污泥这一复杂微生物群落中。在最近的研究中揭示了活性污泥具备高产藻青素的能力,但目前仍无完整从活性污泥中提取藻青素的方法。为了满足目前实际应用的要求:一方面要求藻青素可以稳定生产,另一方面本着环境友好型原则,实现低成本,易获取和稳定产量。基于此,亟待开发一种从活性污泥中提取藻青素的方法。

### 发明内容

[0005] 本发明提出了一种用于提取活性污泥中藻青素的方法,以解决现有技术中针对藻青素的提取方法仅适用于纯菌种和基因工程菌,而无法适用于从活性污泥中提取得到藻青素的技术问题。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0007] 一种用于提取活性污泥中藻青素的方法,包括以下步骤:

[0008] S10、取活性污泥混合液离心,弃上清液后获得活性污泥沉淀,向所述活性污泥沉淀中加入丙酮进行混合后得到混合液;

[0009] S20、对所述混合液进行搅拌,搅拌后离心处理获得活性污泥细胞沉淀;

[0010] S30、将所述活性污泥细胞沉淀重悬在缓冲液中,并重复洗涤多次后再离心分离得到净细胞沉淀;

- [0011] S40、将所述净细胞沉淀重悬于超纯水并调节pH,获得酸性细胞悬浮液;
- [0012] S50、将所述酸性细胞悬浮液进行破碎处理,以使所述酸性细胞悬浮液中的活性污泥细胞释放出藻青素,从而得到细胞-藻青素混合液;
- [0013] S60、将所述细胞-藻青素混合液离心,分离得到上清液,调节上清液至弱碱性使得藻青素析出,获得藻青素悬浮液;
- [0014] S70、将所述碱性藻青素悬浮液进行高速离心,分离获得藻青素粗提物;
- [0015] S80、将所述藻青素粗提物在酸性条件下重新溶解,并将溶液进行透析处理,以获得纯藻青素溶液;
- [0016] S90、将所述纯藻青素溶液调节pH至弱碱性,静置后进行离心分离,以获得藻青素颗粒沉淀;
- [0017] S100、将所述藻青素颗粒沉淀物进行干燥处理,以得到藻青素粉末。
- [0018] 进一步地,在步骤S10中,所述的活性污泥来自:絮体污泥、生物膜或颗粒污泥。所述的丙酮添加量标准为:每1g活性污泥沉淀样品中加入15ml~20ml丙酮。
- [0019] 进一步地,在步骤S20中,所述的搅拌转速为1400rpm~1600rpm,使得混合溶液充分搅拌。
- [0020] 进一步地,在步骤S30中,所述的细胞洗涤缓冲液为Tris-HCl溶液,所述的Tris-HCl溶液浓度为1mol/L,pH=8。
- [0021] 进一步地,在步骤S40中,所述的酸性细胞悬浮液的pH为1。
- [0022] 进一步地,在步骤S50中,所述的酸性细胞悬浮液搅拌时间为1h~1.5h,搅拌转速为1400rpm~1600rpm,恒温的温度为60℃~65℃。
- [0023] 进一步地,在步骤S60中,所述的碱性细胞悬浮液的pH为7.5~8.5。静置条件为:4℃,30min~60min。
- [0024] 进一步地,在步骤S70中,所述的碱性细胞悬浮液离心条件为:4℃下 25000×g离心15min。
- [0025] 进一步地,在步骤S80中,所述的藻青素提取物的溶剂为pH=1的酸性溶液,所述透析液pH=1。
- [0026] 进一步地,在S90中,所述的弱碱性纯藻青素悬浮液pH为7.5~8.5。静置条件为:4℃,30min~60min。
- [0027] 进一步地,在S100中,所述的干燥处理包括恒温干燥法、干燥器干燥法或冷冻干燥法,干燥时间为25h~30h。
- [0028] 本发明提供了一种用于提取活性污泥中藻青素的方法中的上述一个或多个技术方案具有以下的技术效果:
- [0029] (1) 本发明为活性污泥提取藻青素提供了一种新方法。
- [0030] (2) 通过对活性污泥进行一系列的处理得到藻青素,提取过程实现了活性污泥资源化,提取物质也为活性污泥中生物聚合物的应用研究提供了新思路。
- [0031] (3) 本发明的反应条件温和,操作简单,重现性好,在污泥资源化利用领域具有良好的应用前景。

## 具体实施方式

[0032] 为使本发明实施例的目的、技术方案和技术效果更加清楚,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。结合本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0033] 本发明实施例说明书中所提到的相关成分的重量不仅仅可以指代各组分的具体含量,也可以表示各组分间重量的比例关系,因此,只要是按照本发明实施例说明书相关组分的含量按比例放大或缩小均在本发明实施例说明书公开的范围之内。具体地,本发明实施例说明书中所述的重量可以是 $\mu\text{g}$ 、 $\text{mg}$ 、 $\text{g}$ 、 $\text{kg}$ 等化工领域公知的质量单位。

[0034] 本申请提供了一种用于提取活性污泥中藻青素的方法,该方法以污泥为原料,经过丙酮预处理后高速离心分离得到活性污泥细胞沉淀,再将细胞沉淀重悬液在中高温酸性条件下进行强烈搅拌,收集上清液并调节为弱碱性条件得到藻青素颗粒悬浮液,随后低温静置离心分离得到藻青素粗提物。最后将离心得到的藻青素粗提物溶解后在酸性溶液中进行透析,以得到纯藻青素溶液。纯藻青素溶液调节为弱碱性条件得到纯藻青素悬浮液,悬浮液离心分离后收集沉淀进行冷冻干燥得到纯藻青素粉末。

[0035] 本发明提供的用于提取活性污泥中藻青素的方法,通过对活性污泥聚集体进行高速离心处理、丙酮预处理和酸处理等过程,成功提取了活性污泥中的藻青素。提取的藻青素与目前研究所报道的纯菌种或基因工程菌种提取的藻青素有着一致的性质,在弱碱性溶液中呈现墨绿色凝胶状,干燥后呈现浅黄色粉末状。

[0036] 如图6~9所示,活性污泥中藻青素的红外光谱图表明在 $3448\text{cm}^{-1}$ 处有着明显的O-H伸缩振动, $2923\text{cm}^{-1}$ 附近的吸收峰为亚甲基- $\text{CH}_2$ -的反伸缩振动和伸缩振动吸收峰。而藻青素支链上羧基上的-OH伸缩振动和C-H弯曲振动的组合频出现在 $2372\text{cm}^{-1}$ 处。在 $1758\text{cm}^{-1}$ 处的峰可归为羰基的特征吸收峰。在 $1635\text{cm}^{-1}$ 处的尖峰可归为-C=NH的吸收峰。N-H变形振动相当于- $\text{CH}_2$ 的剪式振动方式,其二级倍频吸收带在 $1080\text{cm}^{-1}$ ,面外弯曲振动在 $560\text{cm}^{-1}$ 。在 $1384\text{cm}^{-1}$ 、 $1151\text{cm}^{-1}$ 来源于C-N和C-O的伸缩振动吸收峰。藻青素溶液的紫外-可见光吸收光谱表明在 $193\text{nm}$ 处出现了明显的吸收峰,这表明了活性污泥藻青素中酰胺键的存在。除此之外,高效液相色谱(HPLC)测试结果表明活性污泥中提取的藻青素水解产物主要是天冬氨酸和精氨酸,这与纯菌种、基因工程菌种中所报道的藻青素组成结果一致。

[0037] 综上所述,从活性污泥中提取的藻青素具有与目前已经报道的藻青素有着相似的化学基团与结构组成,说明本方法成功提取了活性污泥中的藻青素。

[0038] 如附图1所示,本发明实例提供的用于提取活性污泥中藻青素的方法,其包括以下步骤:

[0039] S10、取活性污泥混合液离心,弃上清液后获得活性污泥沉淀,向所述活性污泥沉淀中加入丙酮进行混合后得到混合液;

[0040] S20、对所述混合液进行搅拌,搅拌后离心处理获得活性污泥细胞沉淀;

[0041] S30、将所述活性污泥细胞沉淀重悬在缓冲液中,并重复洗涤多次后再离心分离得到净细胞沉淀;

[0042] S40、将所述净细胞沉淀重悬于超纯水并调节pH,获得酸性细胞悬浮液;

[0043] S50、将所述酸性细胞悬浮液进行破碎处理,以使所述酸性细胞悬浮液中的活性污

泥细胞释放出藻青素,从而得到细胞-藻青素混合液;

[0044] S60、将所述细胞-藻青素混合液离心,分离得到上清液,调节上清液至弱碱性使得藻青素析出,获得藻青素悬浮液;

[0045] S70、将所述碱性藻青素悬浮液进行高速离心,分离获得藻青素粗提物;

[0046] S80、将所述藻青素粗提物在酸性条件下重新溶解,并将溶液进行透析处理,以获得纯藻青素溶液;

[0047] S90、将所述纯藻青素溶液调节pH至弱碱性,静置后进行离心分离,以获得藻青素颗粒沉淀;

[0048] S100、将所述藻青素颗粒沉淀物进行干燥处理,以得到藻青素粉末。

[0049] 具体地,上述步骤S10中,活性污泥可以来自于絮体污泥、生物膜或颗粒污泥。截止2020年全国县城干污泥产生量1699187吨,污泥处置设施建设固定资产投资11.64亿元。本发明实例通过对活性污泥中藻青素进行提取,提供了一种新的污泥处置方案。

[0050] 作为优选实例,在步骤S10中,采用丙酮对活性污泥沉淀进行混合,即使用丙酮作为预处理试剂对活性污泥沉淀进行预处理。其中,丙酮的作用是溶解活性污泥细胞的膜磷脂,使活性污泥细胞通透化,从而使藻青素能够被提取出来,并且,丙酮作为预处理试剂,还可以保证蛋白和多糖类不受影响。

[0051] 在一些实例中,活性污泥选自絮体污泥,所述的预处理按照每1g絮体污泥添加15ml丙酮的标准进行混合。

[0052] 具体地,上述步骤S20中,在丙酮的作用下,通过集热式磁力搅拌器强力搅拌混合液使得活性污泥细胞通透性得到进一步改善。再通过高速离心机高速离心分离出活性污泥细胞沉淀。这有助于后续对藻青素这一胞内聚合物的提取。

[0053] 在一些实例中,搅拌条件为:1500rpm,30min。高速离心条件为:室温下25000×g离心15min。

[0054] 具体地,上述步骤S30中,使用缓冲液对活性污泥细胞沉淀进行重复洗涤,去除活性污泥中溶解性微生物产物,以确保后续藻青素的纯度。其中,缓冲液可以为PBS溶液或Tris-HCl溶液。

[0055] 作为优选实例,洗涤缓冲液为Tris-HCl溶液。Tris-HCl溶液具有可调整的适宜pH缓冲作用和盐平衡的作用,不会破坏生物蛋白的结构和生物特性。

[0056] 在一些实例中,细胞洗涤缓冲液为:1mol/L Tris-HCl溶液(pH=8)。

[0057] 具体地,在步骤S40和S50中,利用藻青素可以溶解在酸性条件下的特性,调节净细胞悬浮液为酸性条件。活性污泥细胞破碎处理,即通过进一步破碎酸性细胞混合液中的细胞使其释放出藻青素。可采用的破碎方法有:强力搅拌破碎或使用超声波细胞破碎仪破碎等。

[0058] 作为优选实例,破碎细胞方法为:中高温强力搅拌。搅拌破碎方法反应条件温和,操作简单,重现性好。

[0059] 在一些实例中,S40步骤中调节净细胞悬浮液pH为1。通过集热式磁力搅拌器进行恒温高速搅拌,搅拌条件为:时间为1h,转速为1400rpm,温度为60℃。

[0060] 具体地,在步骤S60和S70中,高速离心分离酸性细胞悬浮液上清液,利用藻青素在弱碱性条件下不溶的特性,调节所述上清液为弱碱性条件,具体地,调节上清液pH至7.5~

8.5.静置一段时间后,高速离心分离获得藻青素粗提物,其中,静置的条件为:4℃,30min~60min。

[0061] 在一些实例中,酸性细胞悬浮液上清液pH调节到7.5。高速离心条件为:4℃下25000×g离心15min。静置条件为:4℃,30min。

[0062] 具体地,在步骤S80和S90中,为了进一步提纯藻青素粗提物,通过透析对藻青素粗提物进行纯化。目前研究已报道的藻青素分子量在20kDa~30kDa之间,本发明使用3kDa~5kDa透析袋对溶解后的藻青素进行处理。对透析后的藻青素溶液调节pH至弱碱性(pH=7.5~8.5),离心分离以获得纯藻青素颗粒沉淀。

[0063] 在一些实例中,藻青素溶剂为:0.1mol/L的盐酸溶液。透析袋规格为3.5kDa。弱碱性藻青素溶液pH=7.5。离心条件为4℃下25000×g离心15min。

[0064] 具体地,在步骤S100中,为了对藻青素进行干燥,使用的方法为恒温干燥法、干燥器干燥法或冷冻干燥法中的其中任一种。干燥时间为25h~30h。

[0065] 作为优选实例,采用冷冻干燥法进行干燥处理。具体地,冷冻干燥不同于普通的恒温干燥,物料中的水分基本上在0℃以下的冰冻的固体表面升华而进行干燥,因此,干燥后的产品体积不变、疏松多孔。

[0066] 在一些实例中,对离心沉淀后的纯藻青素颗粒进行冷冻干燥,条件为:冷冻温度为-40℃,干燥时间为25h。

[0067] 本申请提供的用于提取活性污泥中藻青素的方法,提供了一种从活性污泥中提取藻青素的新途径,其通过对活性污泥进行一系列的处理得到藻青素,提取过程实现了活性污泥的资源化,提取物质也为污泥中生物聚合物的研究提供了新思路;此外,本申请用于提取活性污泥中藻青素的方法,操作简单,重现性好,在藻青素提取领域具有很好的应用前景。

[0068] 请参阅图1至图9,以下结合附图及具体的实施例对本申请的用于提取活性污泥中藻青素的方法进行详细说明。

[0069] 实施例一:

[0070] 在本实施例中,从絮体污泥中提取藻青素聚合物的具体步骤如下:

[0071] 取一定体积的絮体污泥混合液分装于50ml离心管中,通过台式高速离心机进行离心分离,离心条件为:室温条件下4000×g离心20min。丢弃上清液后获得絮体污泥沉淀样品,共取3g离心沉淀样品于150ml锥形瓶中,并加入45ml丙酮溶液搅拌混匀。通过集热式磁力搅拌器对上述的混合液进行高速搅拌,搅拌条件为:1400rpm,35min。反应完成后分装至50ml离心管,通过台式高速离心机在室温条件下以25000×g离心15min,获得活性污泥细胞沉淀物。随后将所得的絮体污泥细胞沉淀物重悬在浓度为1mol/L的Tris-HCl缓冲液(pH=8)中重复洗涤3次,然后通过台式高速离心机在室温条件下以25000×g离心15min得到絮体污泥净细胞沉淀物。

[0072] 再将所述絮体污泥净细胞沉淀物重悬于50ml超纯水中并调节pH=1,获得酸性条件下的絮体污泥净细胞悬浮液。将所述酸性净细胞悬浮液通过集热式磁力搅拌器在65℃,1400rpm条件下强力搅拌1h,使得絮体污泥细胞破裂并释放出藻青素。随后将细胞-藻青素悬浮液在室温条件下以25000×g离心15min分离得到上清液并调节上清液pH=7.5,使得藻青素沉淀,然后将弱碱性藻青素悬浮液在4℃条件下静置30min,沉淀的藻青素呈现墨绿

色,如图2所示。最后将所述藻青素碱性悬浮液在4℃条件下以25000×g离心15min,分离获得藻青素粗提物。

[0073] 将所述的藻青素粗提物在0.1mol/L的盐酸中重新溶解,溶解的藻青素使用3500Da的透析袋透析24h即可获得纯藻青素溶液。将所述的纯藻青素溶液重新调节为pH=7.5以获得藻青素悬浮液。将所述的藻青素悬浮液在4℃下以25000×g离心15min以获得藻青素颗粒沉淀物,将颗粒沉淀物冷冻干燥24h即可得到藻青素粉末,干燥后的藻青素为粉末状呈现浅黄色,如图3所示。

[0074] 对比例一:

[0075] 本对比例基本原理同实施例一,区别在于:实施例一中活性污泥来自絮体污泥,本实施例中的活性污泥来自生物膜。

[0076] 具体地,从生物填料上刮取生物膜。取上述从生物填料上刮取的生物膜混合液,分装于50ml离心管中,通过台式高速离心机进行离心分离,离心条件为:室温条件下4000×g离心20min。丢弃上清液后获得生物膜污泥沉淀样品,共取3g离心沉淀样品于150ml锥形瓶中,并加入45ml丙酮溶液搅拌混匀。通过集热式磁力搅拌器对上述的混合液进行高速搅拌,搅拌条件为:1400rpm,35min。反应完成后分装至50ml离心管,通过台式高速离心机在室温条件下以25000×g离心15min,获得活性污泥细胞沉淀物。随后将所得的生物膜污泥细胞沉淀物重悬在浓度为1mol/L的Tris-HCl缓冲液(pH=8)中重复洗涤3次,然后通过台式高速离心机在室温条件下以25000×g离心15min得到生物膜污泥净细胞沉淀物。

[0077] 再将所述生物膜污泥净细胞沉淀物重悬于50ml超纯水中并调节pH=1,获得酸性条件下的生物膜污泥净细胞悬浮液。将所述酸性净细胞悬浮液通过集热式磁力搅拌器在65℃,1400rpm条件下强力搅拌1h,使得生物膜污泥细胞破裂并释放出藻青素。随后将所述悬浮液在室温条件下以25000×g离心15min分离得到上清液并调节上清液pH=7.5,使得藻青素悬浮液,然后将弱碱性悬浮液在4℃条件下静置30min,沉淀的藻青素同样呈现墨绿色。最后将所述藻青素碱性悬浮液在4℃条件下以25000×g离心15min,分离获得藻青素粗提物。

[0078] 将所述的藻青素粗提物在0.1mol/L的盐酸中重新溶解,溶解的藻青素使用3500Da的透析袋透析24h即可获得纯藻青素溶液。将所述的纯藻青素溶液重新调节为pH=7.5以获得藻青素颗粒。将所述的藻青素碱性悬浮液在4℃下以25000×g离心15min以获得藻青素颗粒沉淀物,将沉淀物冷冻干燥24h即可得到藻青素粉末,干燥后的藻青素同样为粉末状呈现浅黄色。

[0079] 实施例二:

[0080] 本实例从絮体污泥、生物膜两种不同形态的活性污泥中提取得到的藻青素含量进行了表征,将实施例一、对比例一中的藻青素干燥粉末进行称重,每组三个平行样本。如图5所示,在本实施例中絮体污泥中藻青素的提取量为 $100.4 \pm 9.4 \text{ mg/g}_{\text{干污泥}}$ ,生物膜中藻青素的提取量为 $66.1 \pm 8.1 \text{ mg/g}_{\text{干污泥}}$ 。

[0081] 实施例三:

[0082] 如图6至图9所示,将本实例一得到的藻青素粉末进行相关表征,图6为藻青素的红外光谱图,由图可知,在 $3448 \text{ cm}^{-1}$ 处有宽而强的谱带可认为是羧基二聚体形成氢键后的O-H伸缩振动, $2923 \text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰为藻青素结构中亚甲基- $\text{CH}_2$ -的反伸缩振动和伸缩振动

吸收峰。COOH中-OH伸缩振动和C-H弯曲振动的组合频出现在 $2372\text{cm}^{-1}$ 处。在 $1780\sim 1878\text{cm}^{-1}$ 处呈现多个锯齿状吸收峰,二异丁胺在 $1667\sim 1820\text{cm}^{-1}$ 范围内也出现类似吸收峰,因此推测此吸收峰的出现与藻青素中与两个碳元素相连接的 $-\text{NH}_2$ 基团有关。在 $1758\text{cm}^{-1}$ 处的峰可归为羰基的特征吸收峰。在 $1635\text{cm}^{-1}$ 处的尖峰可归为 $-\text{C}=\text{NH}$ 的吸收峰。 $\text{N-H}$ 变形振动相当于 $-\text{CH}_2$ 的剪式振动方式,其二级倍频吸收带在 $1080\text{cm}^{-1}$ ,面外弯曲振动在 $560\text{cm}^{-1}$ 。在 $1384\text{cm}^{-1}$ 、 $1151\text{cm}^{-1}$ 来源于C-N和C-O的伸缩振动吸收峰。图7为藻青素溶液的紫外-可见光光谱,200nm前达到的峰值与前人所报道的结果一致,其他波长处则无明显吸收峰。

[0083] 综上所述,从活性污泥中提取得到的藻青素具有与目前已经报道的藻青素有着相似的化学基团与结构组成,说明本方法成功提取了活性污泥中的藻青素。

[0084] 图8为高效液相色谱(HPLC)测试,主要分析藻青素水解后的氨基酸组分,以50mM的醋酸铵和40%的甲醇为流动相。结果与天冬氨酸与精氨酸标样液相色谱图(图9)比对,停留时间一致,说明活性污泥中提取的藻青素主要由天冬氨酸和精氨酸组成。

[0085] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

#### 附图说明

[0086] 图1是本发明实施例提供的活性污泥中藻青素提取方法的流程示意图;

[0087] 图2是本发明实例中弱碱性条件下藻青素悬浮液图;

[0088] 图3是本发明实例中藻青素冷冻干燥后的外观图;

[0089] 图4是本发明实例中的藻青素沉淀的显微镜图;

[0090] 图5是本发明实例中不同类型活性污泥藻青素提取量图;

[0091] 图6为本发明实例中藻青素粉末的红外光谱图;

[0092] 图7为本发明实例中藻青素的紫外光谱图;

[0093] 图8为本发明实例中藻青素水解后的液相色谱图;

[0094] 图9为天冬氨酸精氨酸标准品的液相色谱图。

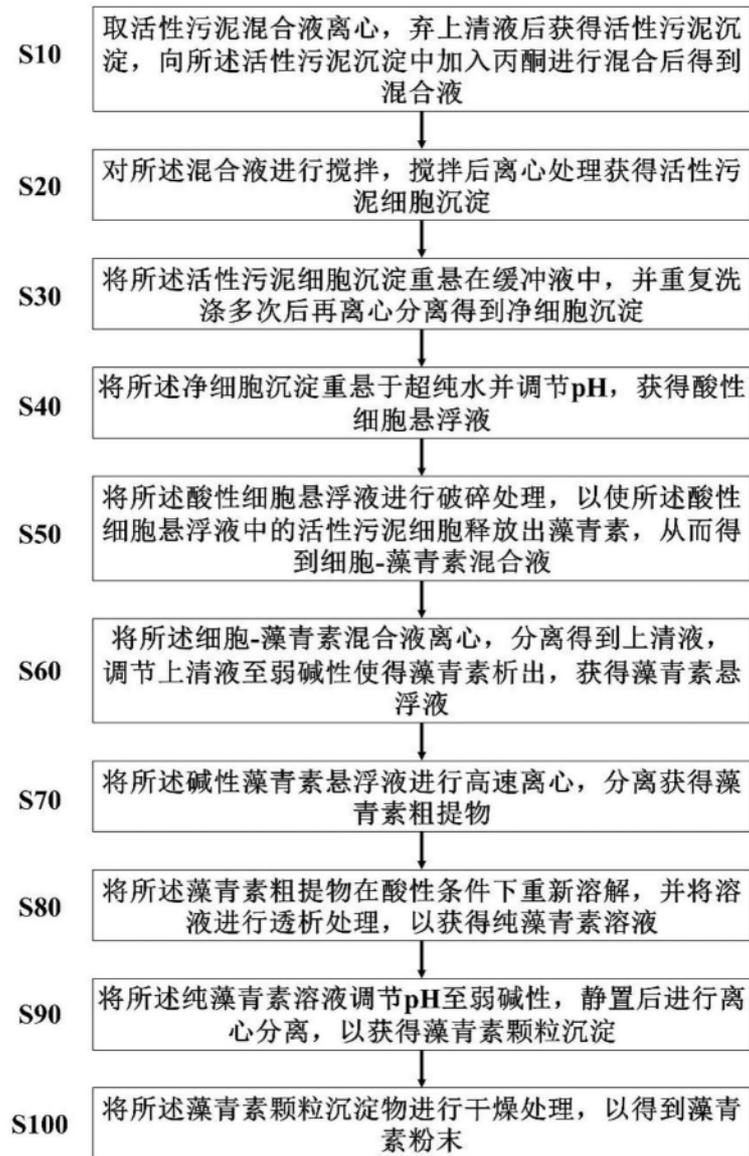


图1



图2

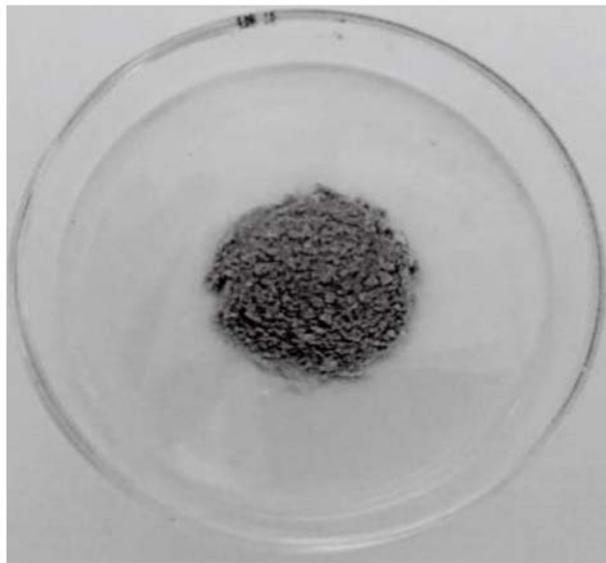


图3

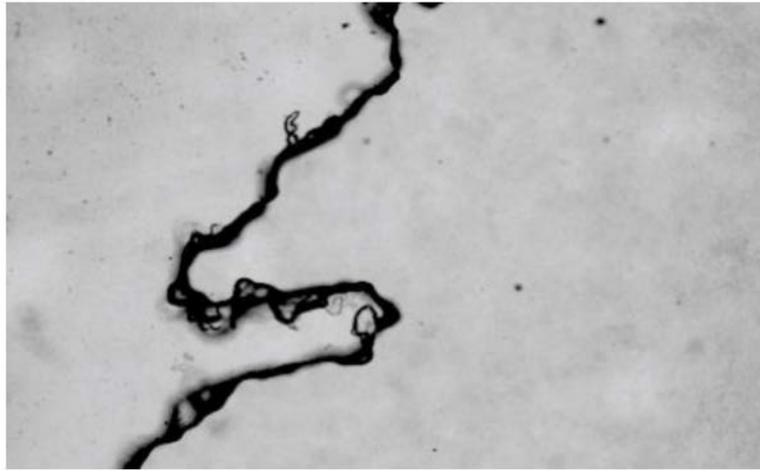


图4

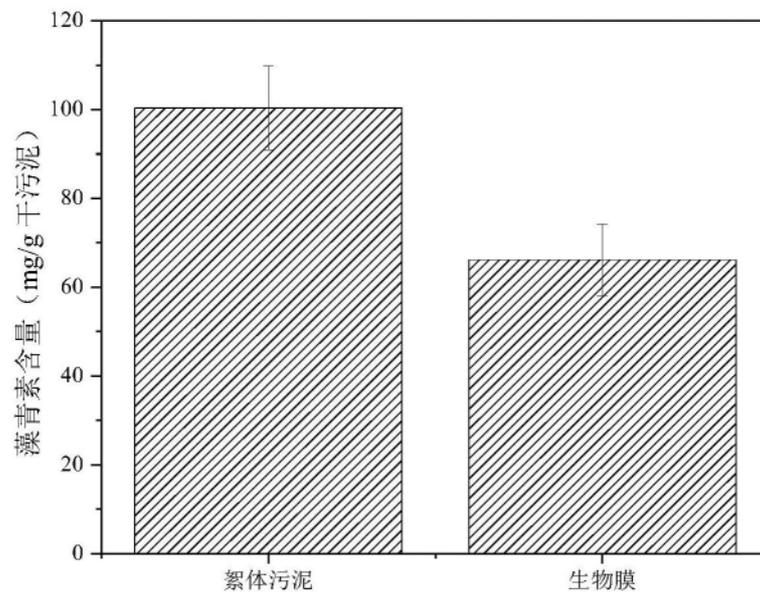


图5

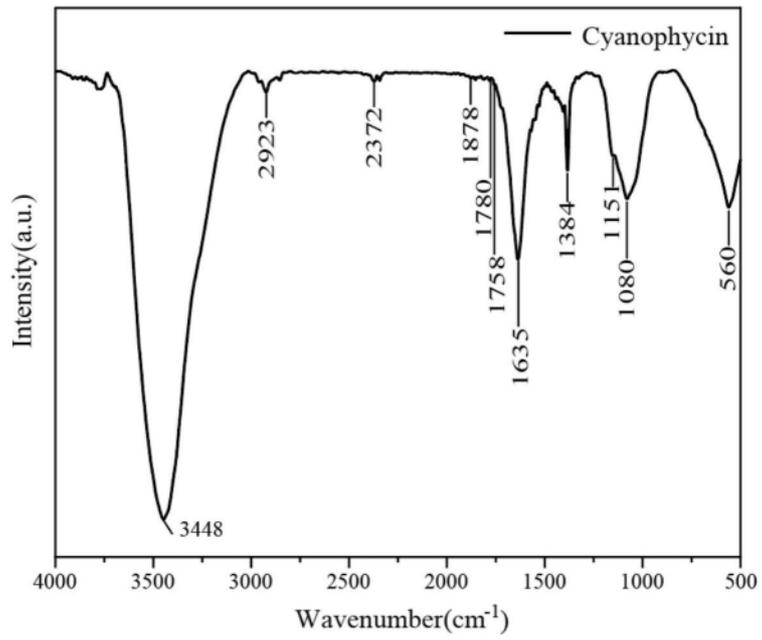


图6

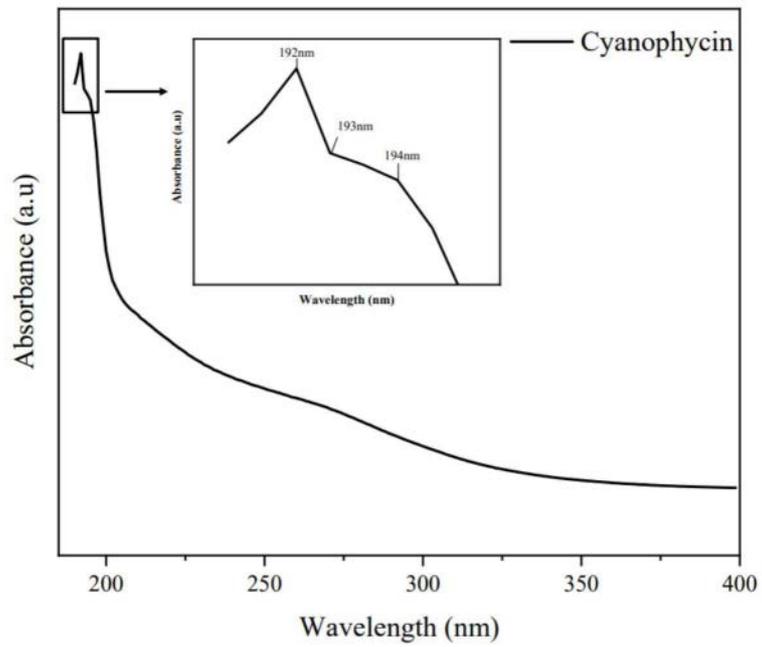


图7

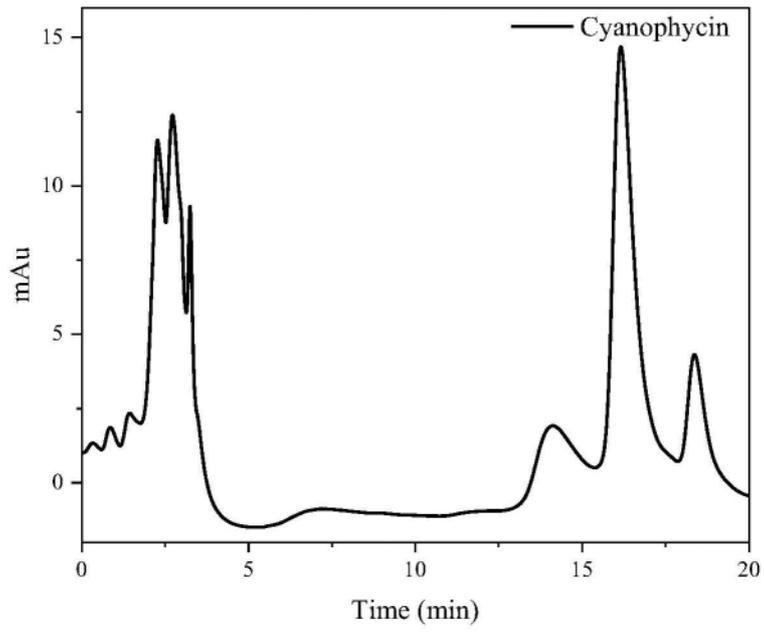


图8

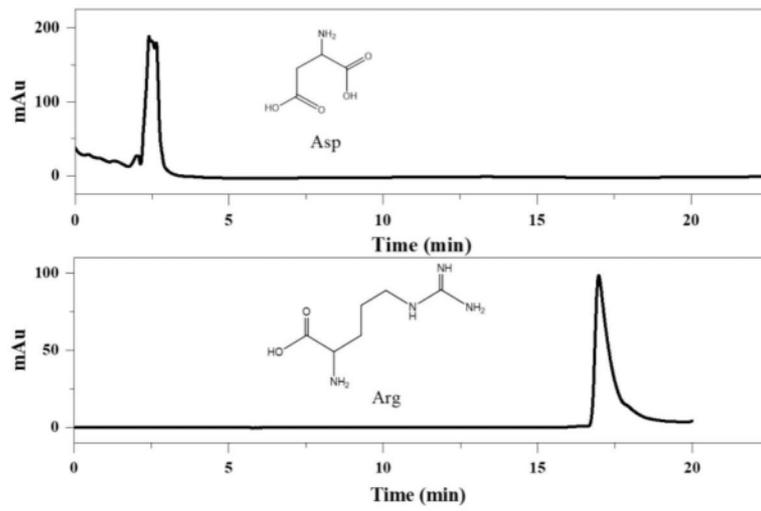


图9