

文章编号:1673-1689(2008)05-0045-05

MBR 膜污染层中胞外多糖的分离纯化

孙赛玉^{1,2}, 李秀芬^{*1,2}, 陈坚^{1,2}

(1. 江南大学 环境与土木工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要:探讨了 MBR 膜污染层胞外多糖的分离提取及纯化方法。结果表明,采用 80 ℃ 水浴法提取物中胞外多糖含量为 86.0%,粗多糖经酶解-Sevag 法去除蛋白质,通过 DEAE-纤维 52、Sephacry-400 HR 柱分离纯化得到多糖 EPS-A1。紫外光谱分析多糖 EPS-A1 未见蛋白质与核酸的特征吸收峰,红外光谱分析其具有典型的多糖特征吸收峰。

关键词:污水处理膜生物反应器;胞外多糖;分离纯化

中图分类号:X 703

文献标识码:A

Separation and Purification of Extracellular Polysaccharide from Biofouling Layer of MBR

SUN Sai-Yu^{1,2}, LI Xiu-Fen^{*1,2}, CHEN Jian^{1,2}

(1. School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Separation and purification of extracellular polysaccharide (EPS) from biofouling layer of MBR were investigated. The results showed that the amount of EPS extracted by thermal treatment (80 ℃, 30 min) was 86%. The protein was removed by Sevage method. The EPS was further purified by cellulose chromatography. The purified sample EPS-A1 was separated by Sephacryl S-400 HR column chromatography. Analysis of polysaccharide by UV spectrum showed that there were no absorption peaks of protein and nucleic acid at 280 nm and 260 nm. FT-IR results showed the EPS-A1 had typical absorption peaks of polysaccharide.

Key words: MBR; extracellular polysaccharide; separation and purification

由胞外聚合物导致的生物污染是污水处理膜生物反应器(Membrane bioreactor, MBR)中膜通量下降的主要原因之一,有关膜生物污染层中胞外聚合物含量及其对膜过滤行为的影响研究较

多^[1-4],已取得不少成绩。而微生物胞外多糖(Extra-cellular Polysaccharide, EPS)是胞外聚合物的重要成分。目前胞外聚合物中多糖等的化学组成、性质和结构很少研究。了解多糖的性质结构对解

收稿日期:2007-11-17.

基金项目:国家自然科学基金项目(50678073).

作者简介:孙赛玉(1983-),女,江苏盐城人,工学硕士.

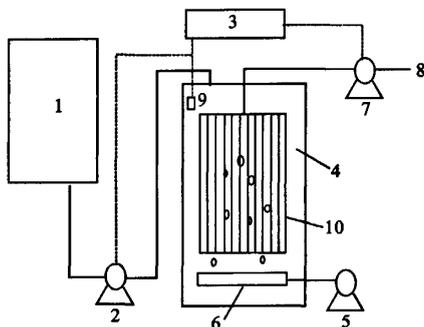
* 通讯作者:李秀芬(1968-),河北深南人,女,工学博士,教授;主要从事环境生物技术方面的研究. Email:lxfen97@163.com.

释 MBR 中膜生物污染层的构造和成因,进而控制膜污染具有重要的现实意义。本研究对膜污染层中 EPS 的分离提取和纯化去蛋白的方法进行了系统考察,得到了 EPS 纯品,为其结构表征和性质分析奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 实验装置

一体式 MBR:天津膜天膜工程技术有限公司提供,有效容积 80 L,膜组件为聚偏氟乙烯(Poly vinylidene fluoride, PVDF)中空纤维膜,膜孔径为 $0.2\ \mu\text{m}$,膜面积为 $1\ \text{m}^2$ 。主体反应器为矩形,有机玻璃制成,整个反应器为全自动控制(见图 1)。



1—进水桶;2—进水泵;3—自动控制柜;4—生物反应器;5—曝气泵;6—微孔曝气管;7—出水泵;8—出水;9—液位器;10—中空纤维膜

图 1 SMBR 实验装置

Fig. 1 Schematic of SMBR

1.2 实验试剂与仪器

DEAE-纤维素 52; Sephacryl S-400 HR; Pharmacia 公司进口分装;中性蛋白酶:诺维信公司产品;考马斯亮蓝 G250;Fluka 进口分装;氢氧化钠、浓硫酸、乙醇、苯酚、二苯胺、甲醛、三氯甲烷、正丁醇、丙酮、乙醚等均为国产分析纯。

超声破碎仪:UP200H 型德国 Hielschel 公司生产;层析装置:上海沪西分析仪器厂生产;高速冷冻离心机:CR22R II 型日本 HITACHI 公司生产;真空冷冻干燥箱:BPH-6123LG 型,上海恒科有限公司产品。

1.3 膜污染层混合液制备

反应器恒通量稳定运行,定期测定进水和出水的 COD、 $\text{NH}_3\text{-H}$ 、DO、pH 值等指标,当膜两侧压差上升至 30 kPa 后,取出膜组件,用去离子水冲洗以除去膜表面少量松散黏附的污泥絮体,后用去离子水人工擦取膜污染层,获得膜污染层混合液。

1.4 胞外多糖分离提取

比较甲醛+NaOH 法、甲醛超声法、热提取法^[5]、10%硫酸提取法,研究适合本实验 EPS 提取的方法(见图 2)。

1.5 粗多糖去蛋白

在 100 mL 粗多糖溶液中添加 5 mg 中性蛋白酶,50 °C 水浴 4 h,80 °C 灭活 5 min,结合 Sevag 法去除蛋白质。多糖溶液与 Sevag 试剂($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}}$ 为 5:1)以体积比 4:1 相混合,振摇 20 min,5 000 r/min 离心 20 min,取出上清液,弃中间蛋白层,重

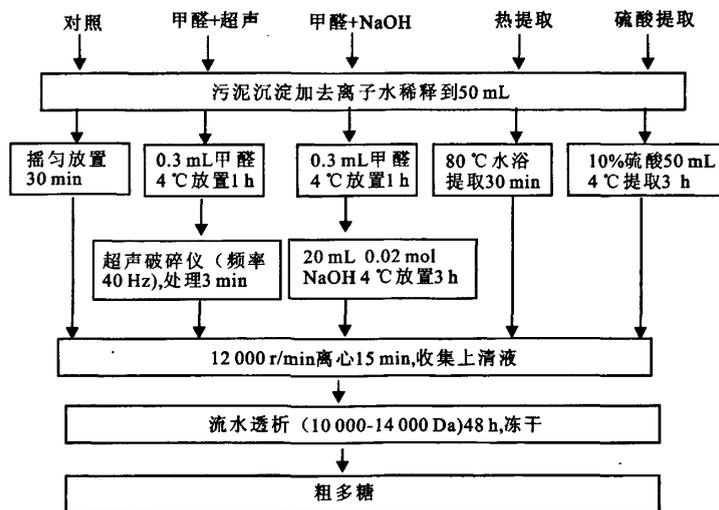


图 2 EPS 提取方法的步骤

Fig. 2 Procedures for EPS extraction

复数次后,3倍体积无水乙醇沉淀,收集多糖,丙酮洗涤,乙醚脱脂,去离子水透析48h,浓缩备用^[11]。

蛋白质含量测定:考马斯亮蓝G-250染色法^[6]。

多糖含量测定:苯酚-硫酸法^[7]。

DNA含量测定:二苯胺比色法^[10]。

1.6 胞外多糖层析纯化

去除蛋白质后多糖浓缩溶液,经2.6cm×20cm的DEAE-纤维素柱分离纯化,加样10mL,pH值6.0,0.01mol/L磷酸缓冲液平衡洗涤后,采用0.1~1mol/L的NaCl梯度洗脱,洗脱体积流量为0.8mL/min,收集5mL/管。苯酚-硫酸法逐管检测^[7],收集洗脱峰部位对应的洗脱液,去离子水透析48h,浓缩备用。

上述多糖浓缩液,经1.0cm×80cm的Sephacryl S-400 HR柱层析,加样5mL,0.1mol/L pH值为7.0磷酸缓冲液洗脱,体积流量为0.5mL/min,收集1.5mL/管。苯酚-硫酸法检测,收集洗脱峰部位对应的洗脱液,去离子水透析48h,冻干得精制胞外多糖。

1.7 胞外多糖纯度分析

精制胞外多糖采用UV-2450型紫外分光光度计在190~400nm区间进行紫外扫描分析。

1.8 胞外多糖红外光谱分析

KBr压片法,采用Nicolet Nexus470型FT-IR光谱仪(Thermo Electron公司)扫描分析。

2 结果讨论

2.1 胞外多糖的提取

EPS与细胞壁结合紧密,需要特定方法才能将其从污泥中分离提出,其不同的提取结果见表1。

表1 不同方法EPS的提取结果对比

Tab.1 Comparison of EPS extracted by various methods

方法	多糖含量 (mg/g MLSS)	蛋白质含量 (mg/g MLSS)	DNA含量 (mg/g MLSS)
对照	19.3	5.4	2.7
甲醛+超声法	53	8.3	4.7
甲醛+NaOH法	50	5.5	5.1
硫酸提取法	32.4	6.5	3.8
热提取法	62.6	7.4	5.5

从表1中可以看出MBR污染层提取到的胞外聚合物中胞外多糖是含量最高的物质,蛋白质和多糖超过总量的90%,胞外多糖含量远高于蛋白质含

量,而DNA质量分数仅占总提取物的7.5%~8.5%。在所有提取方法中,热法提取法对EPS的提取总量最高,测得提取到的胞外多糖质量分数为82.0%,蛋白质质量分数为11.4%,对照方法的EPS提取总量最低。

微量甲醛与细胞膜中氨基、羟基、羧基和巯基等官能团反应,起到加固细胞的作用;后超声处理3min,利用超声波造成空穴,产生压力冲击,在这种冲击力的作用下,提取生物膜的EPS,无大量细胞自溶发生。甲醛处理后NaOH溶液的加入使污泥pH值升高,EPS中酸性基团分离,提高了EPS在水中的溶解和最终的产量^[8]。硫酸提取法污泥pH值低,污泥絮体解散,胞外聚合物溶解度改变,硫酸法提取的胞外聚合物中DNA含量相对较高,多糖含量低,该法提取效果较差。

多糖类物质热稳定性相对较强,热法提取操作相对简单,经比较采用热提取法效率较高,该提取条件对污泥细胞的破坏程度较小。

2.2 胞外多糖去蛋白

采用枯草芽孢杆菌中性蛋白酶水解,部分游离蛋白质及部分与多糖结合的蛋白质被水解,减少了后续有机溶剂除蛋白的次数,从而降低了多糖随凝胶物沉淀而损失的可能,多糖的得率提高,同时粗多糖中蛋白质含量明显降低^[9]。图3表示酶解后胞外多糖溶液采用Sevag法去除蛋白质,随着去蛋白次数的增加,蛋白质含量逐次减少,并且呈良好的线性关系。Sevag法去蛋白质5次后,多糖含量达到95%,因此酶解加Sevag法去除蛋白质效果较好。

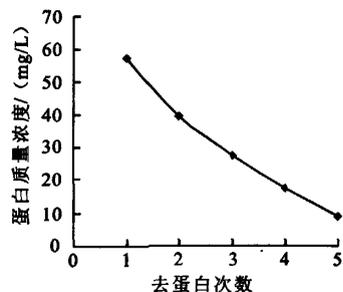


图3 酶解+Sevag法去除蛋白质曲线

Fig.3 Curve of protein removed by enzyme-Sevag method

2.3 胞外多糖层析纯化

多糖去除蛋白质后,透析、冻干制成1mg/mL多糖溶液,由于多糖的粘性比较大,故上柱时的样品量不宜过大,如图4所示的多糖经DEAE-52分

离纯化,苯酚-硫酸法检测多糖洗脱液,显示两个洗脱峰,大部分多糖在较低离子强度下被洗脱出,说明多糖带电荷较少,收集峰-I 对应的洗脱液,透析、冻干得多糖 EPS-A,峰-II 对应的多糖含量很少,未做收集处理。

多糖 EPS-A 经 Sephacryl S-400 HR 层析纯化(见图 5),得到 3 个洗脱峰,其中第 1 个洗脱峰峰形较对称,多糖含量高,这一组分简称为 EPS-A1。第 2 个脱峰峰形不对称,多糖含量少。第 3 个洗脱峰多糖含量很少,这一洗脱峰主要是一些含量很少的一部分小分子多糖和一些没除去的蛋白质。合并第一个洗脱峰 EPS-A1 主峰部位,透析,减压浓缩,乙醇沉淀,冷冻干燥,得到白色蓬松状多糖。

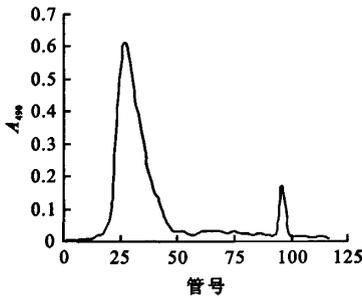


图 4 EPS 离子交换洗脱曲线

Fig. 4 Elution curve of EPS on ion-exchange column

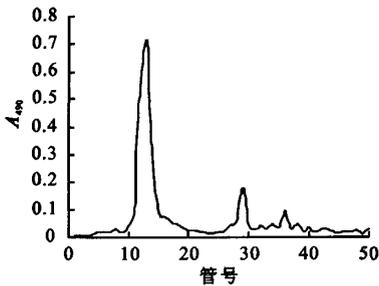


图 5 Sephacryl S-400 HR 洗脱曲线

Fig. 5 Elution curve of EPS-A on Sephacryl S-400 HR column

2.4 EPS-A1 纯度鉴定

经醇析、丙酮洗涤、去除蛋白质、透析、离子及凝胶层析纯化等一系列处理,得到了胞外多糖样品。EPS-A1 冻干后为白色蓬松状固体,溶于水,水溶液为透明胶体,pH 值近中性,不溶于乙醇、丙酮、乙醚等有机溶剂。对所得胞外多糖进行 190~400 nm 波长区间的紫外扫描(见图 6)鉴定,结果表明,260 nm 和 280 nm 处均无明显吸收峰,多糖已基本去除蛋白质、核酸类杂质,说明所得多糖样品的纯度高,可用于后续分析。

2.5 EPS-A1 官能团分析

胞外多糖 EPS-A1 的红外光谱如图 7 所示,所得图谱表现出一般多糖类物质的特征吸收峰。3 600~3 100 cm^{-1} 范围有一个宽的吸收峰,为 O-H 的伸缩振动,2 934 cm^{-1} 处的吸收峰为糖类 C-H 伸缩振动,1 725 cm^{-1} 附近则主要是 C=O 键伸展振动的吸收峰。1 638 cm^{-1} 处为-OH 的弯曲振动吸收峰,1 383 cm^{-1} 处的吸收峰为=CH 的变形吸收峰,1 247 cm^{-1} 处为硫酸基吸收峰,1 051 cm^{-1} 处的吸收峰为 C-O 键振动引起。890 cm^{-1} 处无特征吸收峰,表明含 β -型糖苷键,530 cm^{-1} 的吸收峰是 CCO 变形振动。而 3 422 cm^{-1} 处出现吸收峰则说明在膜污染层的胞外多糖分子间存在氢键。

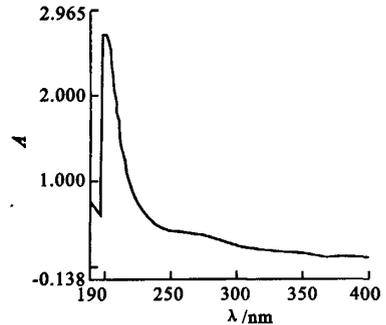


图 6 多糖 EPS-A1 的紫外扫描图

Fig. 6 UV spectrum of EPS

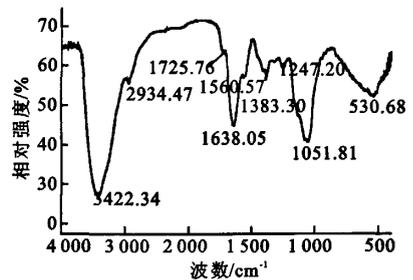


图 7 EPS-A1 的红外光谱图

Fig. 7 FT-IR spectrum of EPS

3 结 语

采用 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热提取、酶解+Sevag 法去蛋白、DEAE-纤维素层析和 Sephacryl S-400 HR 层析,可从 MBR 膜污染层中获得 EPS 纯品。紫外光谱扫描分析表明,该胞外多糖样品不含核酸及蛋白质,红外光谱分析其具有典型的多糖特征吸收峰。EPS-A1 为白色蓬松状固体,溶于水,水溶液透明,pH 近中性。

参考文献(References):

- [1] Jarusutthirak C, Amy G. Role of soluble microbial products(SMP) in membrane fouling and flux decline[J]. *Environ Sci Technol*, 2006,40(3): 969-974.
- [2] Kimura K, Yamamura H, Watanabe Y. Membrane fouling in pilot-scale membrane bioreactors(MBRs) treating municipal wastewater[J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 6293-6299.
- [3] Lei Ji, Zhou Ji ti. Influence of aeration on microbial polymers and membrane fouling in submerged membrane bioreactors [J]. *Journal of Membrane Science*, 2006, 276: 168-177.
- [4] Rosenberger S, Laabs C, Lesjean B, et al. Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment [J]. *Water Research*, 2006, 40: 710-720.
- [5] Liu Hong, Fang Herbert H P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges[J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 95(3): 249-256.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein using the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [7] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科技出版社, 1987.
- [8] Liu H, Fang H H P. Extraction of extracellular polymeric substance(EPS) of sludges[J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 95(3): 249-256.
- [9] 马丽, 覃小林, 刘雄民, 等. 不同的脱蛋白方法用于螺旋藻多糖提取工艺的研究[J]. *食品科学*, 2004, 25(6): 116-119.
- MA Li, TAN Xiao-lin, LIU Xiong-ming, et al. Different de-protein processes for extraction of polysaccharide from spirulina platensis[J]. *Food Science*, 2004, 25(6): 116-119.
- [10] Liu Hong, Fang Herbert H P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges[J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 95: 249-256.
- [11] 徐锡莲, 童微星, 雷引林, 等. 盐藻胞外多糖分离纯化方法研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26(4): 28-33.
- XU Xi-lian, TONG Wei-xing, LEI Yin-lin, et al. Separation and purification of extracellular polysaccharides from du-naliella salina[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(4): 28-33. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)

您的包装能否确保产品的质量安全?

肉眼看得见的问题 您来解决
肉眼看不见的问题 Labthink 来解决



Labthink

要了解, 查信任:

历经生产、运输、仓储、上架销售等各个环节, 如果包装存在任何质量隐患, 都可能导致产品出现霉变、潮解、破损、保质期缩短等严重问题。Labthink兰光——包装检测国际知名品牌, 为您提供全方位包装质量与安全解决方案。

济南兰光机电技术有限公司
咨询热线: 0531-8963155
E-mail: labthink@labthink.cn
www.labthink.cn