



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810182500.6

[43] 公开日 2009年6月17日

[11] 公开号 CN 101455285A

[22] 申请日 2008.12.9

[21] 申请号 200810182500.6

[71] 申请人 首都师范大学

地址 100048 北京市西三环北路 105 号

[72] 发明人 季宏兵 朱毅 江用彬 朱先芳  
丁淮剑

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 4 页

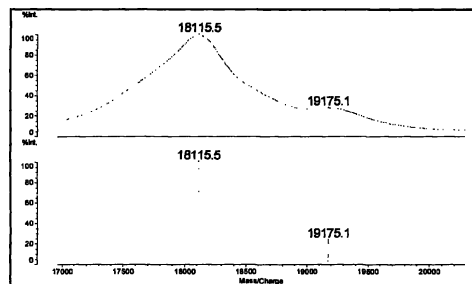
[54] 发明名称

一种重金属污染螺旋藻的处理方法

[57] 摘要

一种利用被重金属轻度污染的螺旋藻提取藻蓝蛋白，并以其藻渣为主要基质吸附清除污染水体中铅、砷、镉的方法，属于环境生物技术领域。该方法可广泛应用于工业化生产而未达到市场准入标准的轻度重金属污染螺旋藻的无害化处理。本方法的主要特点在于利用轻度重金属污染仅只停留在细胞壁上的特点，用改进纯化方法获得符合安全标准的，同时有更高经济价值的螺旋藻深加工产品藻蓝蛋白，附图为提取出藻蓝蛋白的质谱图；并固定化其藻渣，制备获得铅、砷、镉等重金属生物吸附剂。

藻蓝蛋白质谱图谱



1. 一种重金属污染螺旋藻的处理方法，其主要过程包括：确定重金属铅、镉、砷主要吸附在受污染螺旋藻藻壁，可提取出不受污染的藻蓝蛋白，剩余藻渣用于重金属污染污水处理的生物吸附剂；其特征是：

(1) 用反复冻融、超声破碎等传统方法获取受污染螺旋藻藻蓝蛋白粗提液，用改进的硫酸铵分级盐析技术，以及离子交换层析柱纯化获得高纯度藻蓝蛋白；

(2) 用海藻酸钠固定化破壁后剩余藻渣与粉碎花生壳混合物，获得螺旋藻渣生物吸附剂，用于重金属铅、镉、砷单一或复合污染水体的清洁处理；

2. 根据权利要求1所述的螺旋藻，其中螺旋藻为两大经济螺旋藻种之钝顶螺旋藻、极大螺旋藻，同时该螺旋藻在生产、收获、包装、运输等过程中被重金属轻度污染，略超过中国食品重金属标准；

3. 根据权利要求1所述的花生壳，其中花生壳为普通市售花生的外壳。

## 一种重金属污染螺旋藻的处理方法

### 技术领域

本发明属于环境生物技术领域，具体涉及一种利用被重金属铅、镉、砷污染的螺旋藻提取藻蓝蛋白，并以其藻渣为主要基质吸附清除污染水体中铅、镉、砷的方法。

### 背景技术

我国目前除了新疆和西藏，其他省份几乎都有螺旋藻保健食品的生产企业，中国保健协会保健品市场工作委员会专家王珏说“实力较小的企业存在重金属等含量超标的问题。这样的保健食品不仅起不到螺旋藻应有的保健功效，还可能危害消费者的身体健康。”一些学者也撰文指出“同样不可忽视的是重金属污染。如果水中含有汞、铅等有毒元素，很容易被螺旋藻吸收、富集。”国内已有厂家开始在积极探寻应对措施，将重金属污染控制的技术难题公开招标解决。本发明人做的相关试验也表明，螺旋藻的重金属污染是确实存在的。其严重程度甚至超过文献报道。2008年昆明市对市面上23种螺旋藻抽查结果显示，主要质量问题是对食用者的健康和安全构成损害和危害的重金属类的铅和镉超标问题。藻粉成品在培养加工过程中确实存在着重金属污染的可能，其中尤以铅、砷、镉等重金属污染危害最为严重。在如下的标准工艺流程中，重金属污染的渠道有这么几种可能：1) 配制培养基的水源被重金属污染，用工厂废水养殖螺旋藻，废气搅拌培养池，废水废气本身就是重金属污染，或者水源本身重金属检测未超标，但是由于培养液的反复更换，重金属累积后培养液污染；2) 培养基配制的营养盐纯度不高，重金属含量超标；3) 室外跑道式培养池的开放培养，大气干湿沉降中所含的重金属进入池内污染培养液；4) 采收过程中，聚氯乙烯塑料板材被广泛应用，这种材质需要用铅做稳定剂，铅可以逐渐迁移于藻泥中。质量是任何食品，以及动物饲料的生命线，螺旋藻作为一种被广泛接受的保健品，更需强调其严格的质量控制标准。如上分析，重金属在几个重要环节都可以造成污染，加之螺旋藻本身极易富集重金属，螺旋藻粗加工产品，即藻粉、胶囊、片剂等，以及高蛋白开口饵料，其铅、镉、砷重金属污染问题都是在不同程度上存在的，当然，就文献报道，以及发明人的试验结果分析，重金属污染程度还是比较轻的，也就是超出规定标准不是很多。铅、镉、砷这三种重金属污染也是目前我国食品安全研究中亟待关注的热点。目前大部分中

小螺旋藻生产企业是很难达到严格的螺旋藻生产质量标准的，商家在物质利益的巨大驱动力下，要使这种被重金属污染的螺旋藻不进入市场的难度是很大的，纵使不生产成保健品，肯定也将通过各种渠道流入市场，变相成为动物饲料，在下一级生物链上间接危害人体健康。那么如何更理性地、从根本上来解决这个问题呢？

目前研究表明，螺旋藻主要是细胞壁在吸收重金属，生物吸附在重金属累积中占了绝对优势，约为 90%；通过生物累积即进入细胞内的重金属是很少量的。在我们的试验研究中，得到提纯的藻蓝蛋白的重金属检测都未检出，或者在标准范围内，也就是符合安全要求和市场准入标准的。因此，得到藻细胞内未受重金属污染的经济价值远高于藻粉的藻蓝蛋白，就是很好的处理重金属污染螺旋藻的办法。退一步说，由于藻蓝蛋白价格数百倍地高于螺旋藻粉，如果在提纯之后尚存重金属污染，商家也愿意投资去除污染，还有利润空间。藻蓝蛋白在食品业可以用来做很有市场吸引力的蓝色口香糖，冰激凌，饮料、饼干等等；化妆品业则用来做高级眼影和唇膏等；尤其值得一提的是，藻蓝蛋白已经被广泛接受的具有增强免疫机能和抗癌的药用功效这一点对商家和消费者而言都很有号召力；高纯度的藻蓝蛋白可以作为细胞以及生物大分子的荧光标记，广泛运用于生物医学和高灵敏度荧光技术的研究。

螺旋藻具备很强的重金属富集能力，发明人的实验研究表明受重金属轻度污染螺旋藻依旧具备很强的富集重金属能力，破碎细胞壁提取藻蓝蛋白藻渣具备同样好的富集能力。在发明人的实验中，受重金属轻度污染螺旋藻渣的铅、镉、砷的富集效率、清除容量都和未受污染完整螺旋藻、未受污染螺旋藻渣在统计分析上无显著差异。藻类对金属离子的吸附主要是与藻细胞壁提供的功能基团有关。羧基多糖在藻类细胞壁中的含量相对较高，在螺旋藻中，多糖是除蛋白质外的第二类主要组分，在盐泽螺旋藻中含量达 18%~23%，在钝顶螺旋藻和极大螺旋藻等藻株中含量占 6%~9%。在所有官能团中，多糖提供的羧基最为丰富，也最为重要，占藻细胞表面将近 70%的可滴定位点。包括羧基在内，这些基团有些可以失去质子而带负电荷，靠静电引力吸附金属离子；有的带孤对电子，可与金属离子形成配位键而络合吸附金属离子，用傅立叶转换红外光谱分析表明，镉与藻细胞表面的羧基基团形成了桥连或二齿状结构。破碎螺旋藻渣细胞壁基团充分暴露在外，更快、更多地与重金属离子结合。这是本专利的理论和实践基础。

本发明旨在利用微藻生物技术，转换被重金属污染螺旋藻的加工方向，提取藻蓝蛋白赋予商家可观利润，同时利用已被重金属污染的，不适宜用于人类保健品，也不应当用于动物饲料的螺旋藻渣用于吸附清除重金属。

## 发明内容

针对目前有相当数量被重金属污染螺旋藻的市场生产状况，以及鲜螺旋藻和螺旋藻干粉在市场上已经呈现出供大于求的局面，但是极具商业开发价值的藻蓝蛋白是深加工螺旋藻的很好出路，以及重金属污染水体治理困难、成本高昂的现状，我们在此提供一种先破被重金属污染螺旋藻壁提取藻蓝蛋白，再利用其剩余螺旋藻渣强大的重金属富集能力，将被重金属污染的螺旋藻渣固定化制作成重金属吸附柱用以修复被重金属污染水体的方法，涉及重金属污染螺旋藻的高效利用以及重金属污染水体修复技术，能广泛应用于不能通过市场准入的重金属污染螺旋藻的无害化、高附加值处理。

技术方案如下：

- 1) 将被重金属污染螺旋藻鲜藻或藻粉利用反复冻融方法获得藻蓝蛋白粗提液，离心获得藻蓝蛋白上清液，上清液经硫酸铵分级沉淀，离子交换树脂纯化后，依照不同纯度等级供不同目的的商业利用，剩余螺旋藻渣干燥备用；
- 2) 将螺旋藻渣和粉碎花生壳以 100:1 比例混合，然后用海藻酸钠固定化螺旋藻渣，制成螺旋藻重金属吸附剂，处理重金属污染废水，此技术改变了藻体的存在形式以便其像离子交换树脂或是活性炭一样能被方便使用，并使得改善后的藻渣具有一定的颗粒尺寸，足够的粒子强度、多孔性、亲水性和化学惰性，提高了重金属污染废水处理效率，提高了处理负荷，固液分离效果好，且可用 1M NaCl 溶液洗脱方式很方便地将重金属回收，重新利用，有效防止了二次污染。

技术方案之 1) 中利用螺旋藻鲜藻泥较之螺旋藻粉能获得纯度更高的藻蓝蛋白粗提液，如附图 1 重金属污染螺旋藻粉和鲜藻藻蓝蛋白粗提液吸收光谱，藻蓝蛋白粗提物的吸收光谱的主峰在 618 nm，和藻蓝蛋白的特征光谱相符，但是最通常的情况获得的大量原材料是藻粉，发明人的实验表明，二者均可以用于提取藻蓝蛋白，如附图 2 重金属污染螺旋藻粉纯化过程吸收光谱，附图 3

重金属污染螺旋藻鲜藻藻蓝蛋白纯化过程吸收光谱;最终鲜藻泥和藻粉都可以获得试剂纯的藻蓝蛋白,如附图4藻蓝蛋白质谱所示,质谱是纯物质鉴定的最强有力的工具。质谱分析藻蓝蛋白的 $\alpha$ 和 $\beta$ 亚基,分子量分别是18,122和19,202kDa;技术方案之1)中利用反复冻融法只是获得藻蓝蛋白粗提物的一种方法。藻蓝蛋白的粗提物的获得还可以利用以下传统方法:溶菌酶破碎法,超声波破碎法,玻璃珠搅拌研磨破碎法,硅盐破碎,高压匀浆器机械破碎等每种方法都有其优点,也有其不足,可以因地制宜采取合适方法,或者联合应用,比如反复冻融配合微波破碎等;

技术方案之1)中剩余螺旋藻渣干燥备用之干燥方法,在不造成二次污染的前提下,可以采取最经济简便的干燥方法,晾干、风干都可以,该发明技术方案对干燥程度要求不严格;技术方案之2)中花生壳就是普通食用花生壳,可以从食品加工企业获得,将花生壳用粉碎机粉碎到40目的粒度后即可作为藻渣重金属吸附柱的辅料。

本专利的特色和创新之处主要在于另辟蹊径,换一个思路处理重金属污染螺旋藻,变废为宝,最大化其经济效益,从根本上提供了一种杜绝受污染螺旋藻进入食品和饲料市场的可能方案。巧妙利用轻度重金属污染仅只停留在细胞壁上的特点从而获得符合安全标准的,同时有更高经济价值的螺旋藻深加工产品。巧妙变害为宝,将原本可能危害人类健康的受到重金属污染的螺旋藻回收利用,而且是高值利用,每克藻粉可以提取藻蓝蛋白50毫克,高度提纯的藻蓝蛋白价格十分昂贵,1996年价格为110美元/毫克,1998年价格上涨到147.2美元/毫克,近年价格波动在150美元/毫克到180美元/毫克区间,这给商家很大的利润空间;

本专利的创新点之二就是利用低成本每克藻粉可以吸附100-120毫克重金属,吸附的重金属解吸后,重金属可以回收利用,不会产生二次污染,具有良好的经济效益和社会效益;本专利制作的螺旋藻重金属吸附剂在低浓度的重金属污染水体中依旧可以选择性去除重金属离子;本专利处理效率高,pH值和温度条件范围宽,反应迅速,可以处理大容量废水,吸附容量大,去除率高,吸附容量:铅>160 mg/g,镉>180 mg/g,砷>100mg/g,而且整个吸附过程可以在很宽的物理化学条件(如温度、pH值)下操作,吸附的金属易于洗脱,利于吸附材料的重复利用和金属的回收。

## 具体实施方式

实施例:

样品来源：市售螺旋藻，随机取样；

检测方法：原子吸收和原子荧光光谱测定，标准按照《食品卫生检验方法-理化部分》，《实用螺旋藻粉国家标准》(GB/T16919-1997)

### 20 份市售不同品牌螺旋藻的检验结果

项目	检出范围 (mg/kg)	均 数 (mg/kg)	重金属限量≤ mg/kg	
			美国	中国
铅	0.12- 6.5	3.31	1	2
砷	0.1-0.4	0.25	1	0.5
镉	0.12-0.90	0.51	0.05	0.5

- 1) 将检测到的重金属超标的螺旋藻粉，一般均为钝顶螺旋藻，加入适量去离子水，用反复冻融方法破壁，破壁后离心，取上清继续藻蓝蛋白纯化，沉淀则干燥待用；
- 2) 上清液 10,000g 离心，30min。离心后上清用 20% 固体硫酸铵盐析沉淀，细心充分搅拌 30min，然后 10,000×g 离心 10 min，倾倒掉黄绿色的沉淀，亮蓝的上清再放入固体硫酸铵，达到 50% 的饱和度，加入时动作要轻，要缓慢，然后轻柔搅拌 10min 后，静置 2 小时，10,000×g 离心 10min，弃去黄绿色上清，蓝色沉淀用 0.1M 冰醋酸溶液溶解(pH 4.8)，控制整个体积不要超过 200ml，然后再离心 10,000×g 10min，弃去沉淀，上清快速通过 Sephadex G-25 的柱子脱盐，脱盐后的藻蓝蛋白溶液用 0.001M 的磷酸缓冲液稀释到 100ml，加入固体硫酸铵到 25% 饱和度，缓慢搅拌 30 min，然后 10,000×g 离心 10min，弃去沉淀，上清继续加硫酸铵到 40% 的饱和度，静置两小时之后，最后一次 10,000×g 离心 10 min，沉淀就是中纯度的藻蓝蛋白，用不超过 20 ml 的磷酸缓冲液 (0.001M, pH7.0) 溶解后，用 Sephadex G-25 柱子快速脱盐；
- 3) 柱长(1.6×10cm)的 DEAE-Sephadex Fast Flow，用 0.001M K-phosphate 磷酸

缓冲液 (pH7.0)预平衡,脱盐后的藻蓝蛋白上样。在用 40ml 同样的缓冲液冲洗柱子之后,用梯度混合的方式线性增加洗脱液浓度,从 0 到 0.25 M 的 NaCl 洗脱藻蓝蛋白,与此同时,洗脱液的 pH 值从 7.0 降低到 5.3, pH 的变化用 pH 211(Hana, America)严格监测,洗脱速度是 2ml/min,整个洗脱过程通过 Pharmacia protein fast purification system (a, Sweden)控制,藻蓝蛋白组分在 NaCl 浓度 0.10 到 0.20M 之间时洗脱出来,蛋白质快速纯化系统统步扫描记录各洗脱组分的吸收光谱,扫描范围从 200nm to 800nm,通过这个数据监测,可以监测洗脱组分的纯度。收集  $A_{615/280} > 4.0$  的组分,用 Sephadex G-25 柱子再次脱盐,然后用聚乙二醇浓缩,冻干保存。

- 4) 3%藻酸钠和藻渣、40 目粒度花生壳以 200: 100: 1 的体积比混合均匀,用硅胶管和蠕动泵相接,匀速滴入 0.05mol/l  $\text{CaCl}_2$  溶液中,  $\text{CaCl}_2$  溶液中放一个大转子,用磁力搅拌器匀速搅拌,倾去溶液,用去离子水冲洗 1 次,重新加入 0.05mol/l  $\text{CaCl}_2$  溶液,于室温平衡 6 小时,倾去  $\text{CaCl}_2$  溶液,用去离子水清洗 2 次后待用;
- 5) 将制备待用的藻渣颗粒填充入玻璃过滤柱体内 ( $5 \times 45\text{cm}$ ),将不同重金属镉、铅、砷污染度的水经蠕动泵匀速通过柱体,在柱体下端出口处收集清洁水体,利用原子荧光光谱法测定水体中重金属含量,实验结果表明,此重金属柱的重金属吸附率高效快捷,吸附容量铅  $> 160 \text{ mg/g}$ , 镉  $> 180 \text{ mg/g}$ , 砷  $> 100 \text{ mg/g}$ , 多数状态下 10mg/L 镉能降低到 0.01mg/L, 达到国家污水排放标准,试验中平均指标如下表

	镉	铅	砷
清除率%	95	92	78
最佳起始清除浓度 mg/g	10	12	6
吸附容量 mg/g	180	160	100

- 6) 柱子在连续使用 10 小时左右可进行清洗再生,用 2M NaCl 溶液匀速洗脱,洗脱液统一回收处理;
- 7) 也可以将制备好的藻渣颗粒用大网袋装上,投入污染水体中,30min 后捞起网袋,反复多次,也可以达到清洁效果。



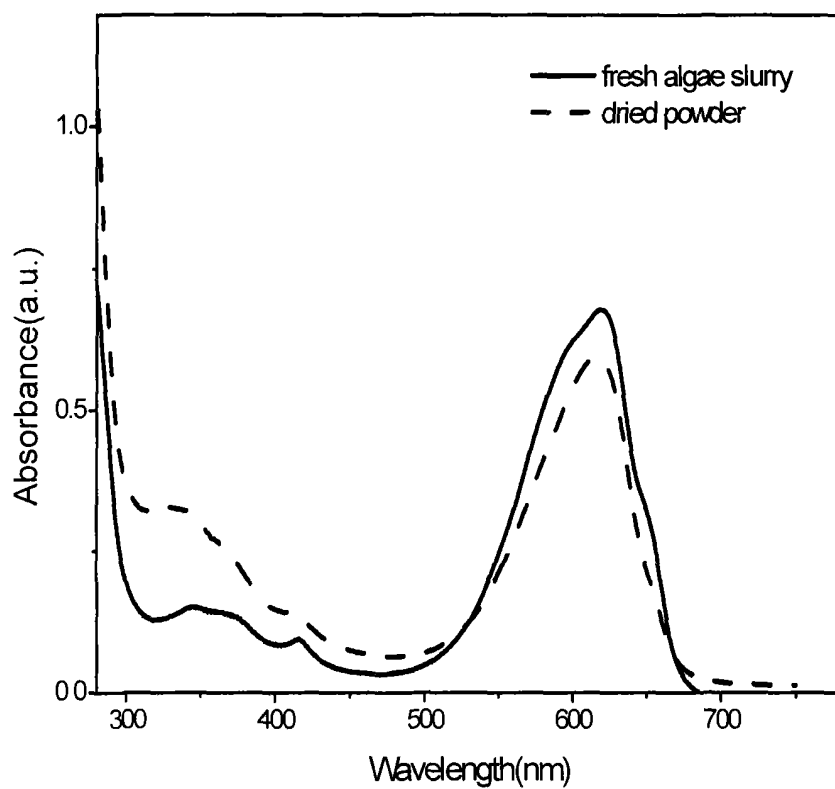


图 1

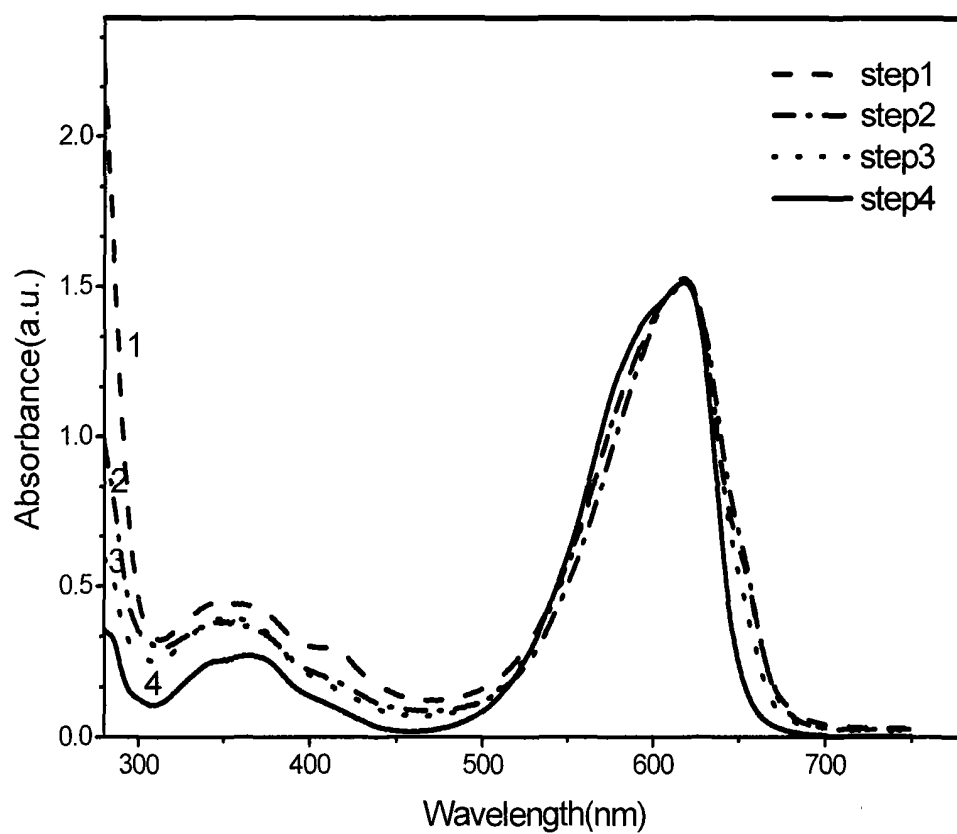


图 2

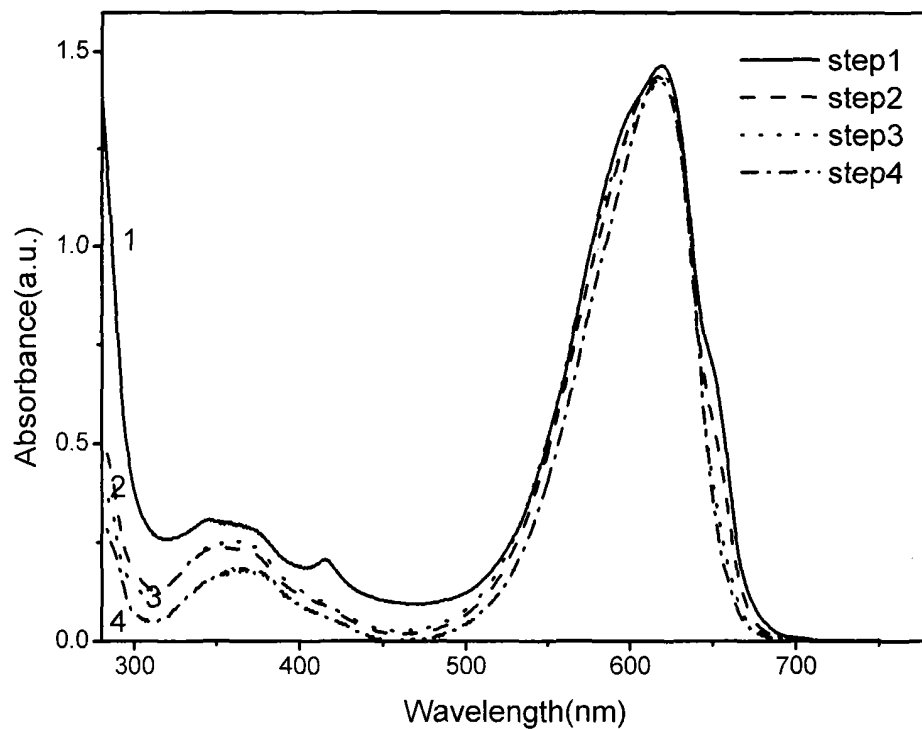


图 3

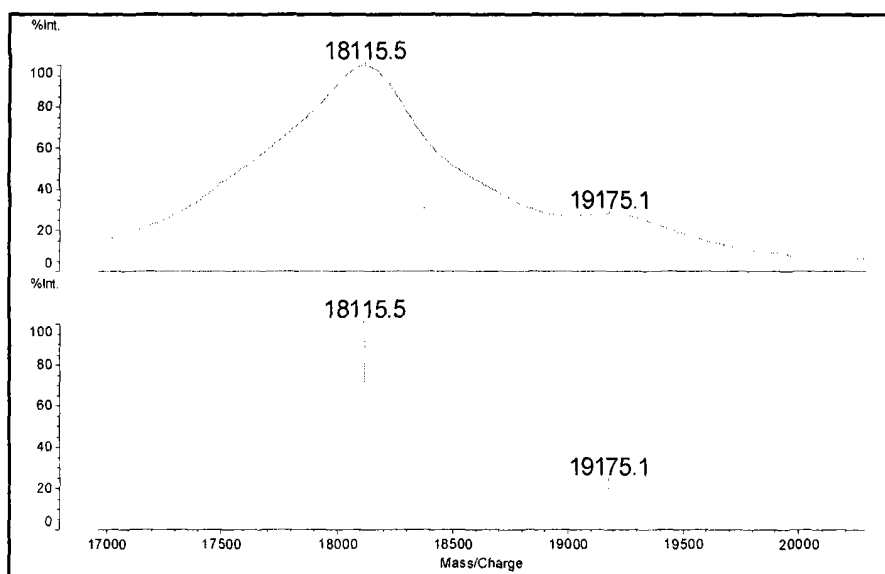


图 4