

生物聚合物聚-3-羟基丁酸酯的 酶法提取纯化研究

薛英茹¹, 周浩², 周卫强², 刘海军³, 李义^{4*}, 李非^{1*}

(1. 河北工业大学化工学院, 天津 300401; 2. 中粮营养健康研究院有限公司, 北京 102209;
3. 吉林中粮生化有限公司, 玉米深加工国家工程研究中心, 吉林 长春 130033;
4. 中粮生物材料(榆树)有限公司, 吉林 长春 130401)

摘要:通过酶解法从嗜盐菌发酵液中获得高纯度、高分子质量的聚-3-羟基丁酸酯(PHB),分别采用高温处理与胞壁酸酶酶解2种方法对嗜盐菌细胞进行破壁,再通过中碱性蛋白酶进一步酶解纯化。结果表明,121℃下高温处理可有效实现嗜盐菌细胞破壁,但高温环境使PHB分子质量降低了30%~40%;在50℃、pH 6条件下添加0.3%胞壁酸酶酶解60 min破壁效果最好,且分子质量可维持在10%以内;在70℃、pH 10条件下添加0.045%中碱性蛋白酶酶解60 min纯化效果最好,所得PHB纯度可达97%以上。最后与市售PHB进行对比,确认了所得PHB的化学结构及热性能。酶的特异性水解保证了PHB结构不受破坏,胞壁酸酶-中碱性蛋白酶结合酶解法可以得到高纯度、高分子质量的PHB,无需其他化学试剂辅助。

关键词:聚-3-羟基丁酸酯;高温处理;酶解;提取;纯化

中图分类号:TH3

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2025)01-0137-06

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2025.01.025

Study on enzymatic extraction and purification of bio-based poly-3-hydroxybutyrate

XUE Ying-ru¹, ZHOU Hao², ZHOU Wei-qiang², LIU Hai-jun³, LI Yi^{4*}, LI Fei^{1*}

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China;
2. Nutrition and Health Research Institute, COFCO, Beijing 102209, China; 3. National Engineering
Research Center of Corn Deep Processing, Jilin COFCO Biochemistry Co., Ltd., Changchun 130033, China;
4. COFCO Biomaterial (Yushu) Co., Ltd., Changchun 130401, China)

Abstract: Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) with high purity and high molecular weight is obtained from halophiles fermentation broth by enzymatic digestion method. Cell walls of halophiles are separately broken by heat treatment and muramidase hydrolysis, and then further purified by neutral alkaline protease. Results show that high temperature treatment at 121°C can effectively break the walls of halophile cells, but it also makes the molecular weight of PHB decline by 30%~40%. Under the conditions of 50°C and a pH of 6, the addition of 0.3 wt% muramidase for 60 min of enzymatic hydrolysis can receive the best wall-breaking effect, and the decline of PHB molecular weight can be maintained within 10%. Under the conditions of 70°C and a pH of 10, adding 0.045 wt% neutral alkaline protease for 60 min of enzymatic hydrolysis can achieve the best purification effect, the resulted PHB has a purity of higher than 97%. Through comparing with commercially available PHBs, the chemical structure and thermal properties of the resulted PHB are confirmed. Specific enzymatic hydrolysis ensures that PHB structure is not destroyed. Therefore, PHB with high purity and high molecular weight can be obtained by muramidase-neutral alkaline protease enzymatic digestion, which is an efficient and environmentally friendly method without the aid of other chemical reagents.

Key words: poly-3-hydroxybutyrate; heat treatment; enzymatic hydrolysis; extraction; purification

化学合成塑料的不可降解性使得其大量堆积, 焚烧或掩埋产生的大量二氧化碳及其他氮、磷、硫化物对空气和土壤结构造成极大危害^[1-2], 开发新型可降解塑料是未来塑料工业发展的主流方向。聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHA)是一类由3-羟基酸单体组成的生物聚酯, 具有与化学合成塑

料相类似的热塑性^[3-4], 可以在自然环境中被微生物完全降解, 是当前可降解塑料研究的热点之一。聚-3-羟基丁酸酯(Poly-3-hydroxybutyrate, PHB)就是PHA的典型代表。

PHA是通过微生物发酵产生并作为细胞内积累的碳和能量贮存物质, 依照提取原理的不同, 其提

收稿日期:2024-03-19, 修回日期:2024-11-13

基金项目:科技部重点研发计划项目(2021YFC2101702);吉林省科技发展计划项目(212551GX010489094)

作者简介:薛英茹(2000-),女,硕士生,研究方向为化工分离,33059722144@qq.com;李义(1964-),男,硕士,正高级工程师,主要研究方向为玉米深加工,通讯联系人,li-yi1@cofco.com;李非(1986-),女,博士,讲师,主要研究方向为化工分离、溶液化学,通讯联系人,lifei2008_ok@126.com。

取工艺目前主要分为有机萃取法与物化裂解法两大类^[5-6]。有机萃取法(尤其是氯仿萃取)是目前实验研究中最常用的方法之一^[7-9],通过向细菌中加入 PHA 亲和试剂,改变细胞膜通透性,选择性溶解 PHA,从而达到 PHA 与细菌菌体分离的目的,所得 PHA 纯度高、分子链结构保持完好。但在实际生产中,大量有机试剂的使用无疑会对环境和操作人员的健康产生危害,有机溶剂的回收也消耗大量能量。机械破碎法^[10]和化学消解法^[11-13]虽然会减少有机溶剂的使用,但往往也会因为不能特异性去除杂质导致 PHA 纯度低和高剂量添加剂的使用导致 PHA 降解。相比之下,酶解法会特异性降解细胞杂质获得高纯度 PHA,同时,相对温和的提取条件不会破坏 PHA 结构导致降解,是一种无需使用有机溶剂的绿色提取方法。

酶解法是通过投加可溶解细胞壁及细胞膜的生物酶,如蛋白酶、胞壁酸酶、核酸酶等,利用酶的靶向特异性消解及水解催化作用,破坏菌体的细胞壁和细胞膜结构以达到酶解破壁的目的^[14]。酶解法最早是由 Zeneca 公司开发作为溶剂萃取的替代方法^[15]。当前大部分酶解提取 PHA 的方法都较为复杂,需要机械破碎或化学消解进行辅助,最典型的工艺是先进行热处理,然后进行酶解、表面活性剂处理,最后 H₂O₂ 脱色^[15-17]。Yasotha Kathiraser 等^[18]对菌体进行 121℃ 高温预处理后,先后采用蛋白酶酶解与十二烷基硫酸钠、乙二胺四乙酸消解,所得 PHA 纯度达 92.6%。陈国强等^[19]通过对细菌发酵液进行 100℃ 以上的过热处理后,结合表面活性剂、蛋白酶或漂白剂等联合处理,得到纯度在 90% 以上的 PHA。Andreia Neves 等^[20]通过对热处理后的细菌酶解,使细菌膜裂解得到纯度为 94% 的 PHA,且不需要使用表面活性剂、洗涤剂或次氯酸钠等化学物质来辅助细胞破坏。

因此,笔者对高温破壁与胞壁酸酶酶解破壁进行对比,并通过胞壁酸酶与中碱性蛋白酶相结合的酶解方式从嗜盐菌发酵液中提取高纯度、高分子质量的 PHB。

1 材料与试剂

1.1 材料

嗜盐菌发酵液,PHB 质量分数为 60%~70%,中粮营养健康研究院有限公司生产。

1.2 仪器与试剂

FE38-Standard 电导率仪,梅特勒托利多科技有

限公司生产;SX-700 多功能高压蒸汽灭菌锅,日本 Tomy Digital Biology 公司生产;FD8-6 立式冷冻干燥机,金西盟仪器有限公司生产;6B-56 智能消解仪,江苏盛奥华环保科技有限公司生产;7890B 气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司生产;1260 渗透凝胶色谱仪,美国安捷伦科技有限公司生产。

无水甲醇,色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司生产;三氯甲烷,色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司生产;胞壁酸酶,诺维信生物技术有限公司生产;中碱性蛋白酶,诺维信生物技术有限公司生产;标准 PHB,珠海麦得发生物科技股份有限公司生产。

2 实验方法

2.1 高温破壁实验

将发酵液多次离心水洗直至上清液电导率小于 10 mS/cm,得到洗净的湿菌体,并重悬为 30% 的悬浮液,进行高温破壁实验。分别在 90、105、121℃ 下对悬浮液高温处理 15 min。其中 105℃ 和 121℃ 的高温处理在高温灭菌锅中进行,90℃ 的实验在水浴中进行。通过检测所得 PHB 纯度与分子质量,分析不同热处理温度对 PHB 的影响,得到最佳破壁温度。

2.2 胞壁酸酶破壁实验

采用同样的方法洗净菌体进行胞壁酸酶酶解破壁实验。在胞壁酸酶酶解实验中,酶解温度、时间及酶添加质量分数分别设定为 60℃、60 min 和 0.4%,分析 pH 在 3~7 范围之间对酶解产物 PHB 纯度及分子质量的影响;酶解 pH、时间及酶添加质量分数分别设定为 6、60 min 和 0.4%,探究 30~70℃ 内不同温度对产物纯度及分子质量的影响;酶解温度、pH 及酶添加质量分数分别设定为 60℃、6 和 0.4%,分析了 15~120 min 不同时间下 PHB 纯度及分子质量的变化规律;酶解温度、pH 及时间分别设定为 50℃、6 和 60 min,分析 0.1%~0.4% 不同酶添加质量分数对提取产物纯度及分子质量的影响。酶解完成后迅速降温,水洗离心后冷冻干燥 48 h,得到 PHB 粗品。通过检测纯度与分子质量,确定最佳胞壁酸酶酶解条件。

2.3 酶解纯化实验

将胞壁酸酶酶解后得到的 PHB 粗品进行中碱性蛋白酶酶解,酶解温度、时间及酶添加质量分数分别设定为 60℃、60 min 和 0.015%,分析了 pH 在 7~11 范围之间对酶解产物 PHB 纯度及分子质量的影

响;酶解 pH、时间及酶添加质量分数设定为 9、60 min 和 0.015%,探究 40~80℃ 内不同温度对产物中纯度及分子质量的影响;酶解温度、pH 及酶添加质量分数分别设定为 60℃、9 和 0.015%,分析了 10~120 min 不同时间下对酶解产物纯度及分子质量的影响;酶解温度、pH 及时间分别设定为 60℃、6 和 60 min,分析 0.004 5%~0.075% 不同酶添加质量分数对提取产物纯度及分子质量的影响。酶解完成后迅速降温,水洗离心,冷冻干燥 48 h,得到 PHB 粉末。通过检测纯化后 PHB 的纯度与分子质量,确定中碱性蛋白酶的最佳酶解条件。

此外,取同批次发酵菌液在 121℃ 下进行高温破壁处理后,在中碱性蛋白酶最佳酶解条件下纯化,所得 PHB 粉末与胞壁酸酶-中碱性蛋白酶酶解法所得的纯度及分子质量进行对比。

2.4 聚 3-羟基丁酸酯的纯度测定

参考文献[21]中关于酯化液的配置方法,将 35 mg 待测样溶于三氯甲烷和酯化液的混合溶液中高温消解 4 h,冷却至室温后加入 1 mL 超纯水,震荡 15 min,静置 1 h,取有机相过滤待测。利用气相色谱内标法定量,得到样品 PHB 的质量分数(即纯度)。气相色谱工作条件:色谱柱采用 Agilent HP-5 柱(30 m×0.32 mm,0.25 mm),流动相流量为 2 mL/min,压力为 69.22 kPa,载气为高纯氮气。

2.5 聚 3-羟基丁酸酯的分子质量测定

以三氯甲烷为溶剂配制 10 mg/mL 的 PHB 溶液,高温消解 120 min,过滤待测。

凝胶渗透色谱工作条件:waters 2414 示差检测器;Agilent PLgel 5 μm MIXED-C (made in GB) 色谱柱,流动相为氯仿,流速为 1 mL/min,柱温为 35℃。

2.6 聚 3-羟基丁酸酯表征与性能测试

利用核磁共振氢谱(¹H NMR)分析 PHB 化学结构;利用热失重仪(TGA)分析 PHB 热降解温度;利用差示扫描量热仪(DSC)分析 PHB 热性能。

3 结果与分析

3.1 高温破壁实验结果分析

高温破壁不同温度下所得 PHB 粗品的纯度及分子质量如表 1 所示。从表 1 中可以看出,在 90℃ 与 105℃ 下所得 PHB 纯度相近,分子质量随温度的升高而降低;在 121℃ 条件下,PHB 纯度最高,为 87.59%,但同时其分子质量下降也最为明显,降解了近 41%。可见温度越高越有助于细胞破壁,所得 PHB 纯度越高,但分子链断裂也越严重。

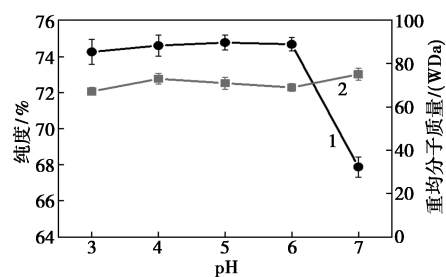
表 1 高温破壁实验结果

温度/℃	PHB 纯度/%	重均分子质量/(WDa)
90	76.07	82.23
105	77.43	72.41
121	87.59	54.10

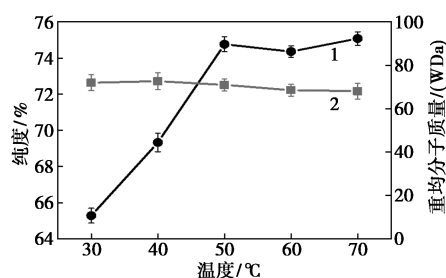
注:此批原始菌体 PHB 质量分数为 71%,重均分子质量为 91.41 WDa。

3.2 胞壁酸酶酶解破壁实验结果分析

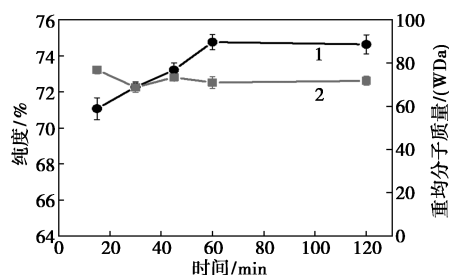
胞壁酸酶不同酶解条件下 PHB 的纯度与分子质量如图 1 所示。从图 1(a)中可以看出,在 pH 为 3~6 范围内,随着 pH 的升高产物中 PHB 纯度呈缓慢增长,整体变化不大,当 pH=7 时纯度陡然降低,说明胞壁酸酶在中性环境中活性受到抑制,在弱酸性环境中能更好地发挥酶解作用,考虑到酸性环境对反应容器的影响,选 pH=5~6 为最佳。从图 1(b)中可以看出,在 30~50℃ 范围内,产品中 PHB 纯度随温度的升高而升高,在 50℃ 后,PHB 纯度略有波动,但整体变化不大,考虑能耗成本及后续还会进一步纯化,选择 50℃ 为最佳反应温度。从图 1(c)中可以看出,PHB 纯度随着酶解时间的延长而增长,60 min 后趋于平衡,嗜盐菌菌体已破壁完全,所以选取 60 min 为最佳酶解时间。从图 1(d)中可以看出,PHB 纯度随着胞壁酸酶添加量的增加而升高,在胞壁酸酶添加质量分数达到 0.3% 后趋于平衡,所以以 0.3% 为最佳酶添加量。因此,最佳反应条件为酶添加质量分数为 0.3%、pH=6、反应温度为 50℃、反应时间为 60 min,在该条件下 PHB 纯度可达到 75.0%。



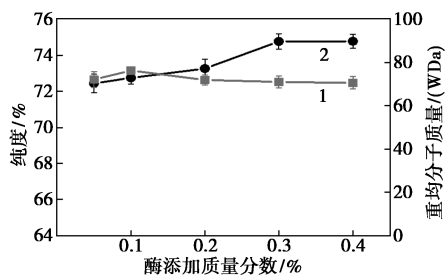
(a) 不同 pH 下 PHB 的纯度与分子质量



(b) 不同温度下 PHB 的纯度与分子质量



(c) 不同时间下 PHB 的纯度与分子质量



(d) 不同酶添加质量分数下 PHB 的纯度与分子质量

1—纯度;2—重均分子质量

图 1 胞壁酸酶不同酶解条件下 PHB 的纯度与分子质量

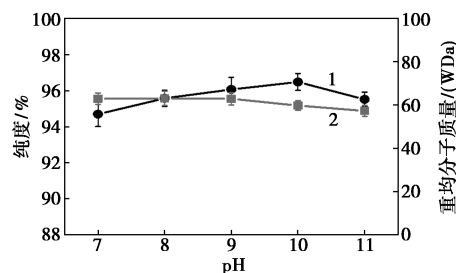
注:此批原始菌体 PHB 的质量分数为 60.94%,重均分子质量为 76.88 WDa。

经凝胶渗透色谱检测,分子质量整体变化不大,受酶解条件影响较小,且与此批初始菌体中 PHB 分子质量 76.88 WDa 相比,分子质量下降维持在 10% 以内,说明胞壁酸酶只特异性针对细胞壁酶解破壁,温和的酶解环境对 PHB 分子结构影响较小,能很好地保留其聚合度。

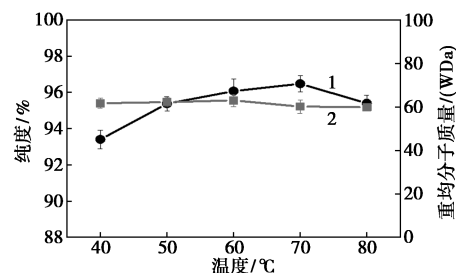
3.3 中碱性蛋白酶酶解纯化实验结果分析

采用中碱性蛋白酶对胞壁酸酶破壁后的 PHB 粗品进一步纯化。中碱性蛋白酶不同酶解条件下 PHB 的纯度与分子质量如图 2 所示,由于发酵后的菌体中除 PHB 外含量最多的物质为蛋白质,采用蛋白酶酶解可以有效降解杂质,提高 PHB 纯度。从图 2(a)中可以看出,随着 pH 的升高,PHB 纯度呈增长趋势,当 pH=10 时达到最高值;继续增大 pH,PHB 纯度明显下降,由此可知,中碱性蛋白酶在 pH=10 时活性最强,继续增大 pH 不利于发挥酶解活性,酶解效果差导致所得 PHB 纯度降低,所以取 pH=10 为最佳。从图 2(b)中可以看出,在 40~70℃ 范围内,PHB 纯度随温度升高而升高,70℃ 时达到最高值;继续升高温度,PHB 纯度开始下降,蛋白酶在 70℃ 时酶解活性最好,继续升高温度会导致蛋白酶受损,活性降低,导致 PHB 纯度降低,所以温度选定 70℃;从图 2(c)中可以看出,PHB 纯度在酶解

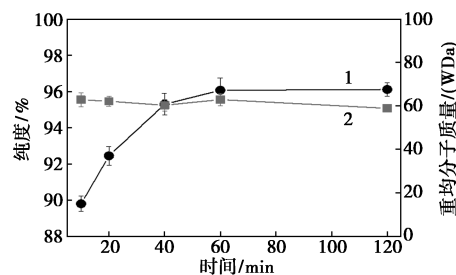
60 min 后趋于平衡,PHB 粗品中的主要杂质蛋白质已被降解完全,PHB 纯度已达到最高,所以最佳酶解时间为 60 min。从图 2(d)中可以看出,随着蛋白酶添加质量分数的增加 PHB 纯度升高,在蛋白酶添加质量分数达到 0.045% 后趋于平衡,所以酶添加质量分数为 0.045%。基于上述研究结果,最佳酶解纯化条件为酶添加质量分数为 0.045%、pH=10、反应温度为 70℃、反应时间为 60 min,在该工艺条件下,所得 PHB 的纯度可达 97.5%。



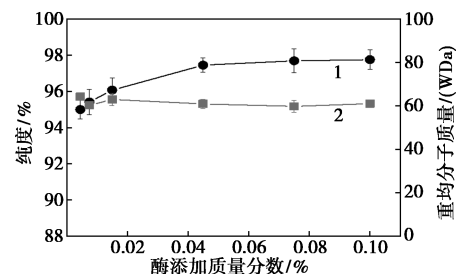
(a) 不同 pH 下 PHB 的纯度与分子质量



(b) 不同温度下 PHB 的纯度与分子质量



(c) 不同时间下 PHB 的纯度与分子质量



(d) 不同酶添加质量分数下 PHB 的纯度与分子质量

1—纯度;2—重均分子质量

图 2 中碱性蛋白酶不同酶解条件下 PHB 的纯度与分子质量

注:此批原始菌体 PHB 含量为 74.58%,经胞壁酸酶酶解后 PHB 粗品纯度为 83.47%,原始重均分子质量为 69.24 WDa。

经凝胶渗透色谱检测,此批初始菌体中 PHB 分子质量为 69.24 WDa,经胞壁酸酶、中碱性蛋白酶一系列酶解后,PHB 分子质量下降程度维持在 15%左右,受酶解环境条件影响较小,说明中碱性蛋白酶纯化能够最大程度地保留聚合度,保证 PHB 的品质。

3.4 提取方法比较

为了更好地比较高温破壁-蛋白酶纯化与胞壁酸酶破壁-蛋白酶纯化 2 种方法,采用同一批菌液,在 121℃ 与最佳酶解条件下进行试验。经过对比不同破壁方式可以发现(如表 2 所示),高温破壁所得 PHB 纯度高于胞壁酸酶破壁,说明 121℃ 高温环境更有利于细菌中核酸、蛋白质变性,协助细胞裂解,使更多的 PHB 流出。但通过对比分子质量变化情况可以发现,121℃ 处理后的 PHB 分子质量下降更为严重。推测高温、高压的极端环境在使细胞涨破的同时也破坏了 PHB 的结构,使其大幅降解。而胞壁酸酶可以特异性破坏细菌细胞壁中主要成分糖蛋白中的糖苷键,进而导致细胞壁破损,细胞内容物流出,酶解过程不破坏 PHB。虽然胞壁酸酶破壁-蛋白酶纯化法在破壁阶段的纯度略低,但经过中碱性蛋白酶纯化后纯度也能达到 97%以上,且 PHB 分子质量下降可维持在 15%以内,酶的特异性决定了其只会对细胞壁及蛋白质进行降解,可以最大程度地保护 PHB 的结构和性能。PHB 分子质量会直接影响其抗拉强度等力学性能,因此在提取高纯度 PHB 同时要尽可能地避免其在此过程中发生降解,对破壁和纯化 2 个步骤全部采取酶解的方法不仅可以得到高纯度的 PHB,酶的特异性也很好保证了 PHB 结构不受破坏。

表 2 不同破壁处理条件下中碱性蛋白酶纯化结果

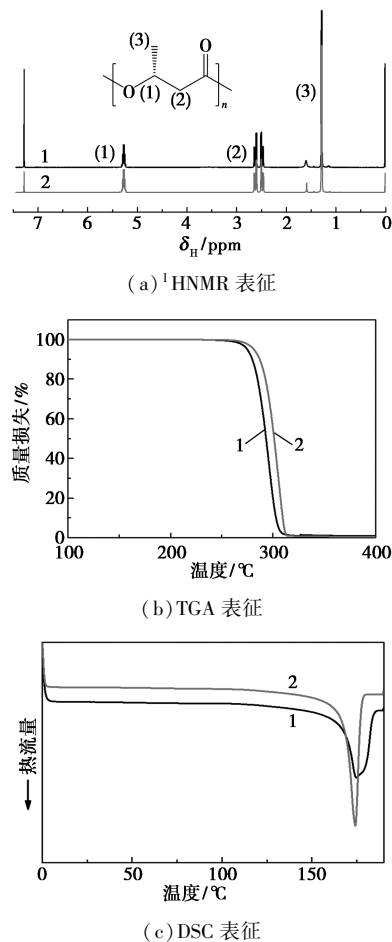
处理方式	破壁后 PHB 纯度/%	纯化后 PHB 纯度/%	重均分子质量/(WDa)
高温破壁-中碱性蛋白酶纯化	88.42	97.79	46.23
胞壁酸酶破壁-中碱性蛋白酶纯化	83.47	97.50	60.60

注:该批原始菌体 PHB 质量分数为 74.58%,重均分子质量为 69.24 WDa。

3.5 性能表征

为了更全面地分析酶解法所提取的 PHB 的物理化学性质,将胞壁酸酶-中碱性蛋白酶法提取的 PHB 与市售标准 PHB 进行了比较。酶法提取的 PHB 与市售 PHB 的 ^1H NMR、TGA、DSC 表征结果如

图 3 所示。



1—市售 PHB;2—酶法提取的 PHB

图 3 酶法提取的 PHB 与市售 PHB 的 ^1H NMR、TGA、DSC 表征

从图 3(a)中可以看出,通过 ^1H NMR 化学结构分析可以观察到在 δ 为 1.25、2.50 ppm 和 5.28 ppm 附近有明显的峰出现,分别对应 PHB 的甲基($-\text{CH}_3$)、亚甲基($-\text{CH}_2$)和次甲基($-\text{CH}$)的氢原子。本实验中酶法提取的 PHB 与市售 PHB 的核磁共振氢谱完全一致,且没有出现其他杂峰(δ 为 7.28、1.60 ppm 附近的峰分别来自溶剂氘代氯仿和 PHB 中残留的水),表明酶法提纯过程有效地去除了其中的杂质,得到了高纯度的 PHB。

从图 3(b)中可以看出,样品在氮气气氛下以 10℃/min 的速率从室温升温至 500℃。提取的 PHB 与市售 PHB 的热失重温度(失重率 5%)分别为 281.1℃ 和 274.7℃。两者都经历了一次分解过程,失重的原因完全来自于 PHB 的 β 顺势消除降解,不存在蛋白质等杂质的多步分解热失重。此外,从热失重温度来看,提取 PHB 略高于市售 PHB,可归因于酶法提取更好地保留了 PHB 分子质量,使其

具有更优越的热稳定性。

从图 3(c) 中可以看出, 消除热历史后的二次升温试验结果显示, 提取 PHB 和市售 PHB 具有类似的趋势, 在玻璃化转变温度 (T_g) 和熔融温度 (T_m) 表现出相似性。其中, 提取 PHB 与市售 PHB 的 T_g 分别为 1.16、0.66℃, 这是由聚合物链在较低的温度下运动造成的。熔融温度 T_m 分别为 174.17、174.83℃, 也极为相近, 表明酶法提取的 PHB 样品具有类似于市售 PHB 的热性能和熔融特性。

4 结论

传统酶解法忽略了热处理步骤对 PHB 的影响, 虽然会使核酸失活并破坏细胞壁的稳定, 提高 PHB 的纯度, 但同时高温高压的环境也会导致 PHB 分子链断裂, 分子质量下降。相较之下胞壁酸酶酶解的操作条件更加温和, 胞壁酸酶针对糖苷键的特异性水解不会对 PHB 结构造成破坏, 在提取 PHB 的同时, 能够最小程度地避免其降解, 保持较高的聚合度, 后续经蛋白酶进一步纯化也可以达到 97% 以上, 蛋白酶对蛋白质的杂质的特异性水解也不会破坏 PHB 结构。酶解条件优化结果表明, 使用 0.3% 的胞壁酸酶在 pH = 6、50℃ 环境下酶解 60 min 破除细胞壁可以得到最高纯度的 PHB, 并很好地保留其结构, 后续通过添加 0.045% 的中碱性蛋白酶在 pH = 10、70℃ 进一步纯化 60 min, 所得 PHB 纯度可达 97.5%。最终通过与市售 PHB 对比也发现, 酶法提取的 PHB 具有与之相同的化学结构和相似的热性能。胞壁酸酶-中碱性蛋白酶酶解法提取得到的 PHB 具有纯度高、分子质量高的优越品质, 且全程不使用有机试剂, 后期也无需再使用表面活性剂或其他化学试剂进一步纯化, 达到了绿色节能的要求。

参考文献

- [1] 袁大辉, 孙玲. 可降解塑料现状及前景展望[J]. 橡塑技术与装备, 2022, 48(10): 1-5.
- [2] 董夏梦. 产聚-β-羟基丁酸菌株筛选及发酵和提取工艺研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2012.
- [3] Taguchi S, Matsumoto K. Evolution of polyhydroxyalkanoate synthesizing systems toward a sustainable plastic industry[J]. Polymer Journal, 2021, 53(1): 67-79.
- [4] Samori C, Abbondanzi F, Galletti P, et al. Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: Impact on polymer quality and recovery[J]. Bioresource Technology, 2015, 189: 195-202.
- [5] Koller M. Established and advanced approaches for recovery of microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters from surrounding microbial biomass[J]. The EuroBiotech Journal, 2020, 4: 113-126.
- [6] 韦童. 提取方法对活性污泥中聚羟基烷酸酯(PHA)回收效果的影响研究[D]. 广州: 广州大学, 2022.
- [7] Venkateswar R M, Mawatari Y, Yajima Y, et al. Production of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) from synthetic wastewater using *Hydrogenophaga palleronii*[J]. Bioresource Technology, 2016, 215: 155-162.
- [8] Fiorese M, Freitas F, Pais J, et al. Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate[J]. Engineering in Life Sciences, 2009, 9: 454-461.
- [9] Riedel S L, Brigham C J, Budde C F, et al. Recovery of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from *Ralstonia eutropha* cultures with non-halogenated solvents[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(2): 461-470.
- [10] 王贺飞, 李贵霞, 钟为章, 等. 基于厌氧消化的剩余污泥细胞破壁预处理技术研究进展[J]. 煤炭与化工, 2017, 40, 253(5): 17-21, 26.
- [11] Lopez G D, Alvarez-Rivera G, Carazzone C, et al. Bacterial carotenoids: Extraction, characterization and applications[J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2023, 53(6): 1239-1262.
- [12] Sol L P, Jang Y C, Tae-Rim C, et al. Improvement of polyhydroxybutyrate (PHB) plate-based screening method for PHB degrading bacteria using cell-grown amorphous PHB and recovered by sodium dodecyl sulfate (SDS)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 177: 413-421.
- [13] Colombo B, Pereira J, Martins M, et al. Recovering PHA from mixed microbial biomass: Using non-ionic surfactants as a pretreatment step[J]. Sep Purif Technol, 2020, 253: 117521.
- [14] Israni N, Thapa S, Shivakumar S. Bolytic extraction of poly (3-hydroxybutyrate) from *Bacillus megaterium* Ti3 using the lytic enzyme of *Streptomyces albus* Tia1[J]. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 2018, 16(2): 265-271.
- [15] Kurian N S, Das B. Comparative analysis of various extraction processes based on economy, eco-friendly, purity and recovery of polyhydroxyalkanoate: A review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 183: 1881-1890.
- [16] Suzuki D V, Carter J M, Rodrigues M F A, et al. Purification of polyhydroxybutyrate produced by *Burkholderia cepacia* IPT64 through a chemical and enzymatic route[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2008, 24(6): 771-775.
- [17] Kathiraser Y, Aroua M K, Ramachandran K B, et al. Chemical characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) recovered by enzymatic treatment and ultrafiltration[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2007, 82(9): 847-855.
- [18] Yasotha K, Aroua M K, Ramachandran K B, et al. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration[J]. Biochemical Engineering Journal, 2006, 30(3): 260-268.
- [19] 陈国强, 张李湛, 叶健文, 等. 一种提取并纯化聚羟基脂肪酸酯的方法: CN111019108A[P]. 2020-04-17.
- [20] Neves A, Muller J. Use of enzymes in extraction of polyhydroxyalkanoates produced by *Cupriavidus necator*[J]. Biotechnology Progress, 2012, 28(6): 1575-1580.
- [21] 陈月, 薛英茹, 刘海军等. 气相色谱法测定发酵液菌体中聚羟基脂肪酸酯的样品处理[J]. 化学分析计量, 2022, 31(12): 6-10. ■