文章编号: 1673-1689(2011)04-0627-05

大孔树脂分离纯化发酵液中虫草素的研究

刘艳芳[1,2], 唐庆九*[1,2], 杨 焱[1,2], 张劲松[1,2], 冯 娜[1,2], 周 帅[1,2]
(1. 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201106; 2. 国家食用菌工程技术研究中心, 上海 201106)

摘 要: 采用大孔树脂富集纯化北冬虫夏草发酵液中的虫草素, 通过比较发现 6 种大孔树脂中 NKA-Ⅱ型大孔树脂对虫草素的吸附与解吸效果最好。静态和动态参数优化结果表明, NKA-Ⅱ型树脂纯化虫草素的最佳吸附平衡时间为 6 h, 解吸平衡时间为 3 h。优化后的动态参数为: 以 1 BV/h 流速上样吸附, 体积分数 10% 乙醇除杂, 70% 乙醇以 4 BV/h 的流量洗脱。该工艺所得样品虫草素质量分数达 35%, 纯度提高了 10 倍, 虫草素回收率达 90% 以上, 经反复结晶后得到纯度大于 98% 的虫草素。

关键词: 虫草素; 大孔树脂; 纯化
中图分类号: TQ 92 文献标识码: A

Studies on Purification of Cordycepin from Fermented Broth by Macroporous Resin

LIU Yan-fang[1,2], TANG Qing-jiu*[1,2], YANG Yan[1,2], ZHANG Jing-song[1,2], FENG Na[1,2], ZHOU Shuai[1,2]
(1. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; 2. National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201106, China)

Abstract: In this study, macroporous resin was used to extract cordycepin from fermentation broth of Cordyceps militaris. By compared with the adsorption and desorption effects of six kinds of macroporous resins to cordycepin, NKA-Ⅱ macroporous resin exhibited the excellent characteristics for cordycepin purification. Through optimization of static and dynamic parameters, the time of adsorption and desorption equilibrium of cordcepin by the NKA-II resin was 6h and 3h, respectively. The current velocity of adsorption on the column was 1 BV/h, and the eluting reagent was 70% ethanol with 4BV/h eluting rate after eliminating the impurity by 10% ethanol. By combination of those optimum conditions, the content of cordycepin, and the recovery rate achieved at 35% and 90%, respectively. Furthermore, the purity of Cordycepin was 98% through recrystallization for several times.

Key words: cordycepin, macro resins, purification

收稿日期: 2010-08-11
基金项目: 上海市农委重点攻关项目(沪农科攻字(2009)第 2-2 号)。
作者简介: 刘艳芳(1980-), 女, 山东曲阜人, 理学硕士, 助理研究员, 主要从事生物化学与天然产物研究。Email: aliu-1980@163.com
* 通信作者: 唐庆九(1969-), 女, 江苏盐城人, 理学博士, 副研究员, 主要从事天然产物化学和药理学研究。Email: tangqingjiu@saas.sh.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

虫草素是一种核苷类抗菌素,具有抗菌、消炎、抗肿瘤、调节人体免疫功能等显著作用[1],现在美国将虫草素作为治疗白血病药物的研究已经进入Ⅱ期临床。北冬虫夏草是主要产虫草素的菌株,据研究表明[2-3],其深层发酵液中含有大量虫草素。作者通过优化发酵条件获得了虫草素质量浓度大于2 g/L的发酵液,为了更好地对其进行利用,需要对发酵液中虫草素的分离纯化工艺进行研究。

目前常用的虫草素分离纯化方法主要有离子交换树脂吸附法[4-5]、硅胶柱层析[6]以及反相高效液相色谱法[7]等。其中离子交换树脂吸附法需要用酸碱处理,后处理比较复杂,其他几种方法提取得率低,难以进行工业化生产。因此需要寻找更好的虫草素纯化工艺。大孔吸附树脂是一种有机高分子聚合物,具有吸附容量大、选择性好、吸附速度快、解吸条件温和等优点,因此被广泛应用于天然产物的分离纯化[8-9]。但是应用大孔吸附树脂分离纯化虫草素却鲜有报道。因此,作者选用不同型号的大孔吸附树脂对北冬虫夏草发酵液进行吸附解吸,从中筛选出适合虫草素分离纯化的树脂类型,并对其吸附解吸性能进行研究,为从发酵液中规模化制备虫草素提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

北冬虫夏草发酵液:深层发酵液过滤除去菌丝体后即得,由作者所在实验室制备。

1.2 试剂

HPD450和HPD400型大孔吸附树脂:沧州宝恩化工有限公司产品;DA-201、NKA-9、S-8和NKA-Ⅱ型大孔吸附树脂:天津海光化工有限公司产品;Polyprep 60-10 C18柱填料:Macherey-Nagel公司产品;标准物质虫草素(纯度≥95%):Sigma公司产品;高效液相用甲醇为色谱级,其他所用试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

Ultrospec2100紫外分光光度计:Amersham Biosciences公司产品;高效液相色谱仪,Waters公司产品;DKY-Ⅱ恒温调速回转式摇床,上海杜科自动化设备有限公司产品;FA2004N分析天平,上海宏衡实业有限公司产品。

1.4 试验方法

1.4.1 虫草素含量测定 备测样品液经≤0.45 μm水相滤膜过滤后,高效液相法测定虫草素含量。色谱条件:色谱柱为C18柱(YMC-Pack ODS AQ,46 mm×300 mm,5 μm),流动相为0~30 min内,以体积分数5%~60%甲醇梯度洗脱,流量1 mL/min,柱温30 ℃。

1.4.2 树脂的预处理 将各树脂用体积分数95%乙醇浸泡24 h,充分溶胀后,除去上浮的树脂碎片。用体积分数95%乙醇浸泡洗涤多次,至洗涤液加3倍体积水无白色浑浊出现为止,再用蒸馏水淋洗至无醇味,备用。

1.4.3 不同类型的树脂对虫草素吸附和解吸性能的比较 称取已处理好的HPD450、HPD400、DA-201、NKA-9、S-8和NKA-Ⅱ大孔树脂各2 g,加入10 mL发酵液充分混匀,置于摇床110 r/min振荡24 h,取上清测定虫草素含量,计算各树脂对虫草素的吸附率;吸附后的树脂用水洗涤3次后,分别用20 mL体积分数70%乙醇洗脱,洗脱液经高效液相测定虫草素含量,并计算解吸率。

1.4.4 发酵液体积对NKA-Ⅱ树脂吸附虫草素性能的影响 称取2 g NKA-Ⅱ树脂共6份,分别加入5、10、20、30、40、50 mL发酵液,充分混匀,置于摇床110 r/min振荡24 h,取上清液分别测定虫草素含量,并与发酵液中虫草素含量相比,得树脂对虫草素的吸附率。

1.4.5 树脂静态吸附动力学特性测定 称取2 g NKA-Ⅱ树脂,加入10 mL发酵液,充分混匀,置于摇床110 r/min振荡,分别在1、2、3、6、9 h时取样测定虫草素含量,与发酵液中虫草素含量相比,得不同时间点树脂对虫草素的吸附率,对时间作图,绘制静态吸附动力学曲线。

1.4.6 乙醇体积份数对NKA-Ⅱ树脂解吸性能的影响 称取2 g吸附虫草素后的NKA-Ⅱ大孔树脂共5份,分别在其中加入20 mL的体积分数10%、30%、50%、70%和95%的乙醇进行解吸,取解吸液测定虫草素含量,与吸附量相比得不同乙醇浓度对虫草素的解吸率。

1.4.7 解吸液体积对树脂解吸性能的影响 称取2 g吸附虫草素后的NKA-Ⅱ大孔树脂共7份,分别加入1、2、3、4、5、6、8倍树脂体积的体积分数50%乙醇,充分解吸后,测定解吸液中虫草素含量,与吸附量相比得各解吸液体积所对应的解吸率。

1.4.8 树脂静态解吸动力学特性测定 称取5 g吸附虫草素后的NKA-Ⅱ大孔树脂,加入50 mL体积分数50%乙醇,置于摇床110 r/min振荡解析,分别于10、20、30、40、60、90、120、150、180 min取样测定其在259 nm处的吸光度值,对时间作图,绘制静态解吸动力学曲线。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.4.9 树脂动态吸附过程中上样流速对吸附率的影响　分别取处理好的 NKA-Ⅱ大孔树脂各 10mL 装柱, 将发酵液分别以 1、2、3 BV/h 的流速过柱, 达到平衡后, 收集流出液, 分别测定过柱前后样品液中虫草素的含量, 计算树脂吸附率, 比较流速对树脂吸附性能的影响。

1.4.10 动态解吸过程中洗脱剂流速对解吸率的影响　分别取吸附后的 NKA-Ⅱ大孔树脂各 10 mL 装柱, 将体积分数 50% 乙醇分别以 1、2、4、6、10 BV/h 的流速进行解吸, 分段收集流出液, 测定其在 259 nm 处的吸光度值, 绘制动态洗脱曲线。

1.4.11 洗脱所得各部分虫草素纯度比较　在 120 g 湿树脂中加入 600 mL 发酵液摇床振荡吸附过夜, 清水洗涤树脂 3~ 4 次后装柱, 分别用 4 倍柱体积的 10%、50%、95% 乙醇依次洗脱, 收集洗脱液浓缩、干燥后称重, 测定其虫草素含量。

2　结　果

2.1　大孔树脂静态吸附与解吸试验结果

2.1.1 不同型号的大孔树脂对虫草素吸附和解吸性能的比较　由表 1 可知, 不同型号的大孔树脂对虫草素的吸附能力差异明显, 其中 NKA-Ⅱ型树脂对虫草素吸附率最高, 达 91.33%, 而其他几种树脂对虫草素的吸附较弱, 吸附率均在 50% 以下。比较各大孔树脂吸附情况, 发现经 S-8 和 DA-201 树脂吸附后的流出液颜色明显变淡, 说明两种树脂对色素类杂质吸附能力较强。从各树脂解吸率的结果可知, 乙醇对不同树脂的解吸性能差异明显, 其中对 DA-201 树脂的解吸效果最好, 达 97.16%, 对 NKA-Ⅱ树脂的解吸率也达到 90%以上, 对 NKA-9 树脂的解吸性能最差, 只有 24.85%。综合考虑树脂的吸附和解吸性能, 选择 NKA-Ⅱ型大孔树脂来进行后续的条件优化。

表 1　不同型号的大孔吸附树脂吸附和解吸能力测定结果

Tab.1　Adsorption and desorption abilities of macroporous resins

树脂型号	吸附率/%	解吸率/%
HPD-400	30.83	80.43
HPD-450	32.48	85.42
DA-201	35.43	97.16
S-8	28.22	68.71
NKA-9	24.85	27.12
NKA-Ⅱ	91.33	91.26

2.1.2 发酵液体积对 NKA-Ⅱ树脂吸附虫草素性能的影响　由图 1 结果可知, 随着树脂中样品液加入体积的增加, 树脂对虫草素的吸附率逐渐下降。在发酵液体积为 5 mL 时, 树脂对虫草素的吸附率达 99.3%, 10 mL 时树脂吸附率为 97.46%, 当发酵液体积达到 20 mL 时, 树脂吸附率下降到 90% 以下。考虑树脂吸附率及生产效率, 选用 2 g 树脂加入 10 mL 发酵液进行吸附。

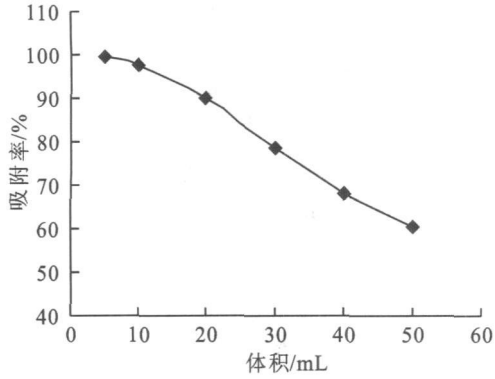


图 1　样品液体积对树脂吸附率的影响

Fig.1　Effects of volume on the adsorption rate of macroporous resin

2.1.3 虫草素在 NKA-Ⅱ树脂上静态吸附解吸条件的优化　静态吸附时间的比较试验发现, NKA-Ⅱ树脂吸附时间达到 3 h 后, 虫草素吸附率接近 90%, 6 h 的吸附率超过 95%, 因此, 吸附时间选用 6 h 可达到充分吸附的效果。

对解吸附的乙醇体积分数比较发现, 乙醇为体积分数 50% 及以上时, 虫草素从 NKA-Ⅱ树脂上解吸率达到 90% 以上, 且体积分数 50% 与 70% 和 95% 乙醇解吸率基本接近, 高体积分数乙醇易挥发, 为节省成本, 选用体积分数 50% 乙醇做为洗脱剂进行解吸。

当解吸液(体积分数 50% 乙醇) 体积达到树脂体积的 4 倍时, 虫草素解吸率达到 90%, 而后随解吸液体积增加无明显上升趋势, 因此选择加入 4 倍树脂体积的 50% 乙醇进行解吸。

2.1.4 树脂静态解吸动力学特性　由图 2 结果可知, 体积分数 50% 乙醇加入树脂中后, 40 min 内解吸效率较高, 后期随着洗脱液中虫草素含量的增加, 溶液中虫草素浓度达到相对平衡, 解吸速度放缓, 到 180 min 时解吸液吸光度值基本稳定, 因此, 静态解吸过程中选择解吸时间为 3 h。

2.2　大孔树脂动态吸附与解吸试验结果

2.2.1 上样流速对树脂吸附的影响　由图 3 结果可知, 随着上样流量的增加, 树脂对虫草素的吸附率逐渐下降。以 1 BV/h 的流量上样, 树脂吸附率

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

可达 76%, 上样流量超过 2 BV/h 后, 树脂吸附率降低到 50%以下, 因此, 选用 1 BV/h 的流量上样。

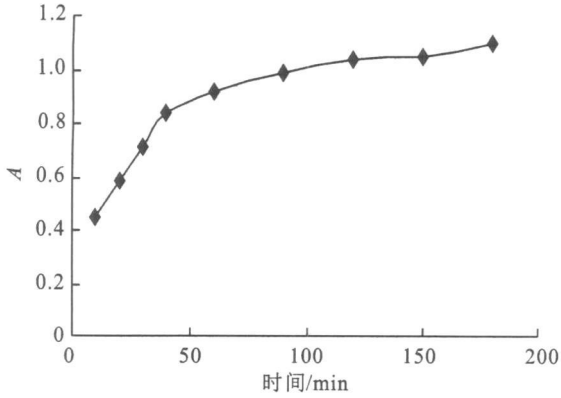


图 2 解吸时间对解吸率的影响

Fig. 2 Effects of elution time on the desorption rate of macroporous resin

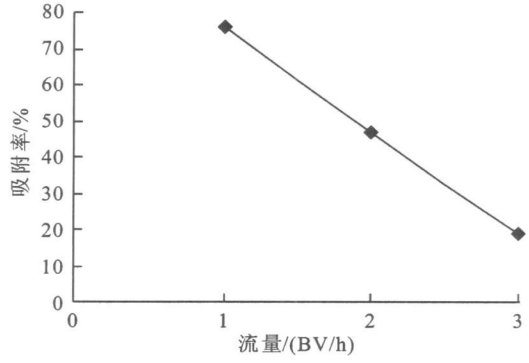


图 3 上样流量对吸附率的影响

Fig. 3 Effects of flow rate on the adsorption rate of macroporous resin

2.2.2 *洗脱流量对解吸的影响* 以体积分数 50% 乙醇为洗脱剂, 分别以不同的流量进行洗脱, 其动态洗脱曲线如图 4 所示。由图中结果可知, 洗脱流量为 1~ 4 BV/h 时, 洗脱曲线近似, 洗脱峰也相对集中, 且峰面积差异不大。但洗脱流量达到 6 BV/h 以上时, 洗脱峰明显变宽, 且拖尾明显, 说明流速过快, 不利于对虫草素的解吸, 但流量太低会延长循环周期, 效率降低, 因此选择以 4 BV/h 的流量进行洗脱。

2.3 洗脱所得各部分虫草素纯度测定结果

从表 2 结果可知, 体积分数 10% 乙醇洗脱下来的组分占总量的 23.28%, 且该组分中虫草素的质量分数仅为 8.43%, 因此认为体积分数 10% 乙醇洗脱下来的大部分为杂质, 而体积分数 50% 和 95% 乙醇洗脱所得的组分中虫草素质量分数接近, 均为 30% 以上。因此, 可选择先以体积分数 10% 乙醇洗脱除去部分杂质, 再以体积分数 70% 乙醇洗脱, 所得样品虫草素纯度比分离前提高 10 倍, 约为 35%, 且虫草素回收率达 90%以上。

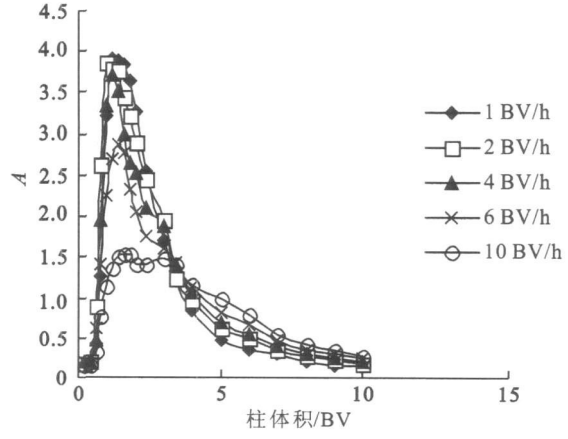


图 4 不同流量的动态洗脱曲线

Fig. 4 Dynamic desorption curve of different flow rate

表 2 不同体积分数乙醇洗脱所得组分中虫草素质量分数的比较

Tab. 2 Comparison on cordycepin content in fractions eluted by different ethanol percent

乙醇体积分数/%	样品质量/g	各组分质量分数/%	虫草素质量分数/%
10	0.4363	23.28	8.43
50	1.2114	64.63	32.71
95	0.2267	12.09	37.83

经大孔树脂纯化后的样品, 按照参考文献[10]的方法进行结晶, 得到粗晶体后, 以水反复重结晶 2~3 次得到针状固体, 干燥后得固体粉末, 经鉴定纯度达 98%。

3 结 语

通过对 6 种大孔树脂的静态吸附和解吸性能的研究, 发现 NKA-Ⅱ型大孔树脂是一种分离虫草素的理想树脂, 吸附率大且易解吸, 较适合北冬虫夏草发酵液中虫草素的纯化。NKA-Ⅱ型大孔树脂是极性树脂, 对极性较强的虫草素吸附效果较好, 这与大孔树脂的吸附原理是一致的。比表面积对大孔树脂吸附虫草素的影响不大, 同为极性但比表面积较大的 NKA-9 树脂对虫草素吸附效果不好, 这可能与吸附杂质较多有关。

大孔吸附树脂的吸附动力学研究对于目标产物的纯化工艺具有十分重要的意义, 在实验室小试水平考查了静态和动态吸附工艺, 发现树脂对虫草素的吸附是一种动态的缓慢的过程, 这与树脂和样品液之间的接触有关, 在静态吸附过程中对树脂进行搅拌, 使树脂与目标化合物充分接触, 并给与充

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分的吸附时间, 提高吸附效率。且动态吸附的试验结果表明, 上样流量与树脂吸附率成反比, 但上样流量太慢会延长循环周期, 不利于生产, 因此在实际操作中可选用循环上样, 以减少目标物的损失。另外, 大孔吸附树脂的吸附作用主要是通过表面吸附、表面电性或形成氧键等, 吸附达到饱和时, 对化学成分的吸附作用减弱直至消失, 此时化学成分即泄露流出。因此, 考查树脂的吸附容量是十分必要。

在天然产物的分离纯化中, 成本、安全性和环保问题也是需要重点考虑的, 用大孔树脂来分离虫草素, 由于树脂可以反复使用, 成本低, 同时使用的溶剂是水和乙醇, 因此该工艺比较安全和环保。

参考文献(References) :

[1] 王雅玲, 王亮, 金黎明. 虫草素药理学研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2667- 2668.
WANG Ya-ling, WANG Ling, JIN Li-ming. Review on pharmacology of cordycepin[J]. **Lishizheng Medicine and Materia Medica Research,** 2008, 19(11): 2667- 2668. (in Chinese)

[2] Ing-Lung Shih, Kun-Lin Tsai, Chienyan Hsieh. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*[J]. **Biochemical Engineering Journal,** 2007, 33: 193- 201.

[3] Mina Masuda, Eriko Urabe, Hiromitsu Honda, Akihiko Sakurai, Mikio Sakakibara. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom Cordyceps militaris[J]. **Enzyme and Microbial Technology,** 2007, 40: 1199- 1205.

[4] 钟艳梅, 黄志全, 温凯. 人工蛹虫草固体培养残基中虫草素的提取分离研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(2): 40- 42.
ZHANG Yan-mei, HUANG Zhi-quan, WEN Kai. Extraction and isolation of cordycepin from the deserted solid medium of Cordyceps militaris[J]. **Modern Food Science and Technology,** 2007, 23(2): 40- 42. (in Chinese)

[5] 潘中华, 贡成良, 范雪峰. 蚕蛹虫草中虫草素的提取及纯化工艺研究[J]. 江苏蚕业, 2003, 25(2): 13- 15.
PAN Zhong-hua, GONG Cheng-liang, FAN Xue-feng. Study on the extraction and purification of cordycepin from Silkworm pupa Cordyceps militaris[J]. **Jiangsu Sericulture,** 2003, 25(2): 13- 15. (in Chinese)

[6] 吕子明, 姜永涛, 吴立军, 等. 人工蛹虫草子实体化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(24): 2914- 2917.
LV Zi-ming, JIANG Yong-tao, WU Li-jun, et al. Chemical constituents from dried sorophore of cultured Cordyceps militaris[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica,** 2008, 33(24): 2914- 2917. (in Chinese)

[7] 陈伟, 吴畏, 高新华, 等. 反相高效液相色谱法分离和制备虫草素的方法研究[J]. 上海农业学报, 2007, 23(1): 59- 61.
CHEN Wei, WU Wei, Gao Xin-hua, et al. Isolation and preparation of cordycepin by reverse-phase HPLC[J]. **Acta Agriculturae Shanghai,** 2007, 23(1): 59- 61. (in Chinese)

[8] 李颖畅, 郑凤娥, 孟宪军. 大孔树脂纯化蓝莓果中花色苷的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 496- 500.
LI Ying-chang, ZHENG Feng-e, MENG Xian-jun. Studies on purification of anthocuanins from blueberry fruits by macroporous resins[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2009, 28(4): 496- 500. (in Chinese)

[9] 钱竹, 徐鹏, 章克昌, 等. 大孔树脂分离提取发酵液中灵三萜类物质[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(6): 111- 114.
QIAN Zhu, XU Peng, ZHANG Ke-chang, et al. Extraction of ganoderic triterpenes from fermented broth by macroporous resin[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2006, 25(6): 111- 114. (in Chinese)

[10] 韦会平, 叶小利, 张华英, 等. 从废弃蛹虫草大米培养基中高效提取纯化虫草素工艺条件研究[J]. 菌物学报, 2009, 28(2): 220- 225.
WEI Hui-ping, YE Xiao-li, ZHANG Hua-ying, et al. An efficient method of extracting and purifying cordycepin from waste rice medium of Cordyceps milltaris[J]. **Mycosystema,** 2009, 28(2): 220- 225. (in Chinese)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net