

文章编号:1673-1689(2006)06-0111-04

大孔树脂分离提取发酵液中灵芝三萜类物质

钱竹, 徐鹏, 章克昌*, 丁重阳

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 利用大孔树脂富集提取发酵液中灵芝三萜。通过比较 4 种大孔树脂对灵芝三萜的吸附和解吸性能, 发现 AB-8 树脂最适合灵芝三萜的提取。结果表明: 控制体积流量为 2 mL/min、pH 值 2, AB-8 树脂的饱和吸附量达到最大, 为 8.837 mg/g(以干树脂质量计)。确立了最佳洗脱方案, 依次用水、体积分数 20%、40%、95% 乙醇溶液分段洗脱。

关键词: 灵芝三萜; 大孔树脂; 提取

中图分类号: S 646

文献标识码: A

Extraction of Ganoderic Triterpenes from Fermented Broth by Macroporous Resin

QIAN Zhu, XU Peng, ZHANG Ke-chang*, DING Zhong-yang

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In order to extract Ganoderic triterpenes from fermentation broth by means of macroporous resin, macroporous resin AB-8 was selected by comparing the properties of absorption and desorption of 4 candidated macroporous resins for Ganoderic triterpenes extraction. The results show that the maximum adsorption amount was 8.837 mg Ganoderic triterpenes per gram dry resin at the velocity of flow 2 mL/min and pH 2. And the optimum elution condition was determined as follows: water, 20% ethanol(v/v), 40% ethanol(v/v), 95% ethanol(v/v) in sequence.

Key words: Ganoderic triterpenes; macroporous resin; extraction

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是一种药用价值很高的名贵真菌,其有效成分在食品、药品、保健品中有着广泛的应用。灵芝三萜类化合物是灵芝的主要活性成分之一,到目前为止已从赤芝子实体中分离得到 112 种新的三萜类化合物^[1]。近年来,从灵芝的子实体、孢子粉和菌丝体所提取的三萜类化合物已被证明具有保肝、抗肿瘤、镇痛、调节免疫力、抗艾滋病病毒等作用^[2-3]。灵芝三萜的分离纯化及生物活性研究是目前灵芝研究的热点。灵芝三萜

的提取分离一般都使用有机溶剂^[4-7],但该方法存在溶剂残留和生产成本高的缺点,而大孔树脂具有物理化学稳定性高,吸附选择性强,富集效果好,解吸条件温和,再生简便,使用周期长等优点。作者以灵芝发酵液为原料,采用大孔树脂富集提取灵芝三萜,此法国内外尚未见诸报道。采用乙醇溶液梯度洗脱,所得产品安全性高,适合于添加到口服液、片剂、针剂及食品中制成保健品或药品。

收稿日期:2005-12-17; 修回日期:2006-03-15.

作者简介:钱竹(1980-),女(满族),辽宁海城人,工学硕士;*为通讯作者。

1 仪器、材料和试剂

灵芝菌:作者所在研究室筛选保藏;灵芝发酵液:按文献[8]制备;薄层层析硅胶 GF-254;青岛海洋化工有限公司产品;树脂:S-8, AB-8, NKA-9 南开大学化工厂产品;HP-20;北京慧德易科技有限公司产品;试剂:甲醇为色谱纯,其它均为分析纯;薄层层析对照品制备方法^[9]。

紫外-可见分光光度计:UNICO2100,上海仪器有限公司产品;BT₁-100 恒流泵:上海琦特分析仪器有限公司产品;玻璃层析柱:D 2 cm×15 cm,上海锦华层析设备厂产品;BUCHI 型旋转蒸发仪:瑞士制造。

2 实验方法

2.1 树脂的选择

树脂的预处理按说明书进行。选择典型的非极性、弱极性和极性的4种树脂作为初筛对象。各吸附树脂的物理性能见表1。

表1 4种吸附树脂的物理性能

Tab.1 The physical characters of four macroporous adsorption resins

树脂类型	极性	外观	比表面积/(m ² /g)	平均孔径/μm
AB-8	弱极性	乳白色不透明球状颗粒	480~520	1.30~1.40
S-8	极性	浅黄色不透明球状颗粒	100~120	2.80~3.00
NKA-9	极性	微黄色不透明球状颗粒	250~290	1.55~1.65
HP-20	非极性	乳白色不透明球状颗粒	600	2.00

2.2 定性分析

2.2.1 灵芝三萜的显色反应 参考文献[10]进行。

2.2.2 灵芝三萜的薄层色谱鉴定 硅胶 GF254-CMC-Na 板;展开剂:V(甲苯):V(乙酸乙酯):V(乙酸)=13:4:0.4;展开方式:上行展开;显色:V(喷浓硫酸):V(乙醇)=1:9,105℃ 10 min 显色,在日光及紫外灯(365 nm)下检视,记录图谱并计算R_f值。

2.2.3 多糖定性检测 苯酚-硫酸法^[11]。

2.2.4 蛋白质定性检测 茚三酮显色法^[12]。

2.3 灵芝三萜定量方法

参考文献[13]进行。

万方数据

2.4 大孔吸附树脂吸附量的计算方法

$$\text{静态吸附量}(\text{mg/g}) = \frac{(C_0 - C) \times V}{m}$$

式中:C₀为吸附前料液中灵芝三萜的质量浓度,C为吸附后溶液中灵芝三萜的质量浓度,V为料液的体积,m为树脂的质量。

$$\text{动态吸附量}(\text{mg/g}) = \frac{(C_0 \times V_0 - C \times V)}{m}$$

式中:C₀为上柱前料液中灵芝三萜的质量浓度,V₀为料液体积,C为流出液中灵芝三萜的质量浓度,V为流出液的体积,m为树脂的质量。

2.5 大孔吸附树脂解吸率的计算方法

$$\text{静态解吸率}(\%) = \frac{V \times C}{m} \times 100$$

式中:V为洗脱剂总体积,C为洗脱液中灵芝三萜的质量浓度,m为静态吸附总质量。

2.6 大孔吸附树脂的静态吸附动力学特性测定

取5份处理好的AB-8树脂各2.0 g(预处理后抽滤)装入具塞磨口三角瓶中,精密加入灵芝发酵液40 mL,置恒温25℃摇床上,在6 h内,定时取样,测其灵芝三萜含量,绘制静态吸附动力学曲线。

2.7 大孔吸附树脂的静态解吸动力学特性测定

将具有较大吸附量的树脂,按上述操作充分吸附后抽滤去除水溶液,再将其装入具塞磨口三角瓶中,加入体积分数95%的乙醇溶液20 mL,置于恒温25℃摇床上,在6 h内,定时取样,测其灵芝三萜含量,计算解吸率,绘制静态解吸动力学曲线。

2.8 大孔吸附树脂对灵芝三萜的动态吸附试验

通过大孔吸附树脂对灵芝三萜的静态吸附试验,对筛选出的一种理想树脂,进行动态吸附实验。分别测定了上样流速及上样液pH值对吸附量影响。

2.9 乙醇体积分数对树脂洗脱性能的影响

选择乙醇为洗脱溶剂。发酵液抽滤后上柱,控制体积流量为2 mL/min,pH值2,分部收集(5 mL/管),当流出液吸光度达到上样液的1/10时,认为已达饱和吸附量。先用水洗脱,除去糖和蛋白质(至苯酚硫酸,茚三酮显色反应呈阴性),再依次用20%,40%,60%,80%,95%不同体积分数的乙醇洗脱,测定5个流分的灵芝三萜浓度,从而确定最佳乙醇洗脱体积分数。

3 结果与分析

3.1 大孔树脂对灵芝三萜的静态吸附试验

4种树脂的静态吸附曲线见图1,由图可知树脂的吸附速率随时间的增加而降低,HP-20,AB-8 3 h达到吸附平衡。各树脂的静态吸附量相差较大,

其中AB-8的静态吸附量最大,达到8.742 mg/mL, HP-20次之,为5.667 mg/mL。对照表1可知,大孔树脂的极性决定其对灵芝三萜吸附能力的大小。弱极性AB-8对弱极性的灵芝三萜的吸附能力强,这与大孔树脂的吸附原理^[14]是一致的。比表面积对大孔树脂吸附灵芝三萜的影响不大,可能是因为比表面积大的树脂对杂质的吸附能力强,从而使得杂质抢占更多的吸附位点,使对有效成分的吸附位点相对减少,因此同样为弱极性但比表面积大的HP-20反而对灵芝三萜的吸附不利。

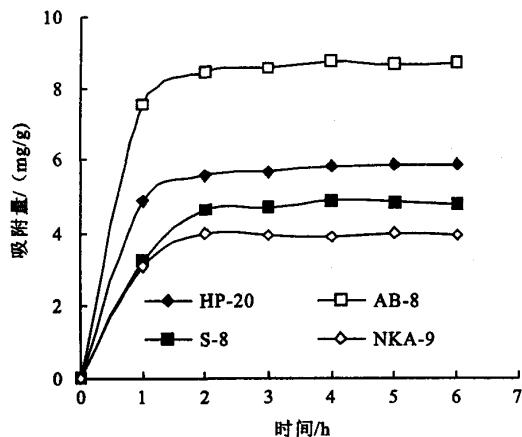


图1 静态吸附曲线

Fig. 1 The static adsorption curve

3.2 大孔树脂对灵芝三萜的静态解吸试验

树脂AB-8和HP-20的吸附量大,但吸附量大并不一定是富集灵芝三萜的最佳树脂。吸附能力过强,可能会形成不可逆吸附,灵芝三萜很难从树脂上洗脱下来,从而使产品的损失过大。因此,又进行了AB-8,HP-20静态解吸实验,结果见图2。

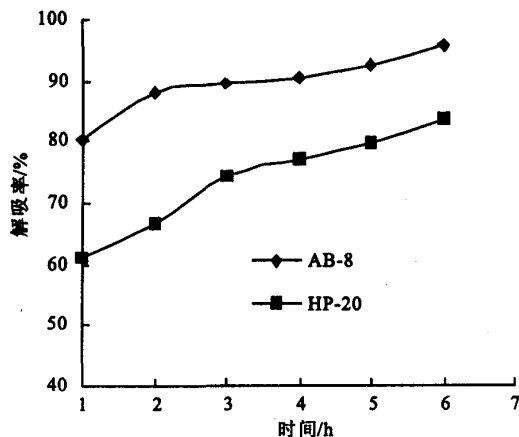


图2 静态解吸曲线

Fig. 2 The static de-adsorption curve

由解析曲线可见,AB-8解吸能力比HP-20要强,解吸速度快,2 h后其解吸率就达88.0%,6 h达

95.9%。原因可能是:(1)比表面积小的树脂与灵芝三萜的作用力小,因而易被解吸;比表面积大的树脂与灵芝三萜的作用力大,解吸效果差。(2)比表面积大的HP-20吸附了较多的杂质,影响了灵芝三萜的解吸速度。

3.3 大孔吸附树脂对灵芝三萜的动态吸附试验

综合静态吸附和解吸曲线,树脂AB-8更适合从发酵液中富集提取灵芝三萜。为了进一步了解AB-8对灵芝三萜的吸附特性,进行AB-8树脂的动态吸附实验。

3.3.1 上样速率对吸附量的影响 取4份处理好的AB-8树脂,每份6 g装柱,以同一批发酵液,控制体积流量分别为1、2、3、4 mL/min进行动态吸附,结果显示,流量为1 mL/min时吸附量最大,达8.493 mg/g,2 mL/min次之,当流量增加到3 mL/min时,树脂的吸附量明显下降,仅为6.545 mg/g,过早泄漏。流量过小时,虽然吸附量增加,但吸附时间延长,生产效率低,同时使树脂的再生困难,使用寿命缩短。因此,控制2 mL/min的流量较为理想。

3.3.2 上样pH对吸附的影响 取6份处理好的AB-8树脂,每份6 g,装柱,以同一批发酵液,固定体积流量2 mL/min,考察pH值对AB-8树脂吸附灵芝三萜的影响,结果见图3。由图3可知,pH值为2时吸附量达到最大8.525 mg/g。随着pH值上升,吸附量逐渐降低。灵芝三萜中有一些带有羧基的三萜酸,呈弱酸性,在酸性溶液中以分子形式存在,与树脂的结合能力强,这与大孔树脂的吸附原理一致。

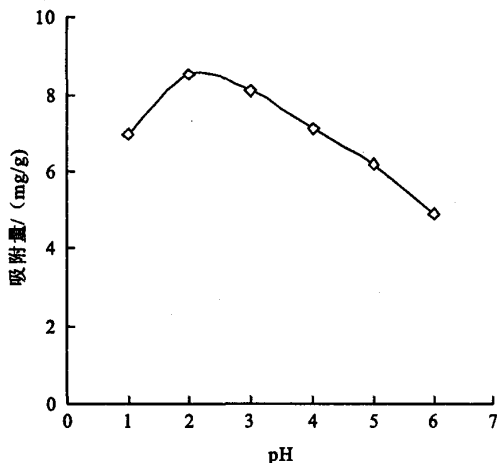


图3 pH值对吸附量的影响

Fig. 3 The effect of pH value on adsorption amount

3.3.3 饱和动态吸附量 取12 g AB-8树脂,装柱(柱体积为20 mL),上样pH值为2,控制流速2

mL/min,当流出液吸光度达上样液的 1/ 10 时,认为已达吸附平衡,此时的饱和动态吸附量为 8.837 mg/g,与静态饱和吸附量基本一致。

3.4 乙醇体积分数对树脂洗脱性能的影响及灵芝三萜定性反应

作者试验选择了不同体积分数的乙醇溶液作为洗脱剂,每个体积为 100 mL(5 BV)。洗脱曲线见图 4。分别将各体积分数的乙醇溶液洗脱组分浓缩、冻干,作定性反应,结果见表 2。

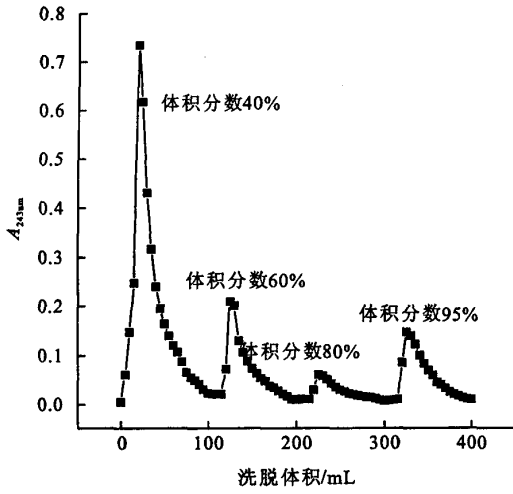


图 4 灵芝三萜的洗脱曲线

Fig.4 Elution curve of Ganoderic triterpene

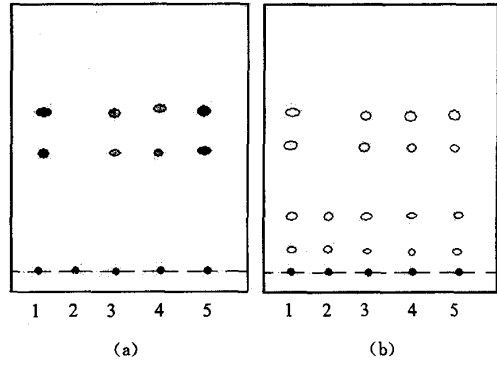
表 2 不同体积分数乙醇洗脱组分的定性反应结果

Tab.3 The identification reaction of EtOH eluting fraction

乙醇 体积分数/%	醋酐-浓硫酸 反应	三氯甲烷-浓硫酸 反应
20	-	-
40	红色	红色
60	红色并逐渐变成绿色	深红色
80	红色并逐渐变成绿色	深红色
95	红色并逐渐变成绿色	深红色

由表 3 可知,体积分数 40%、60%、80%和 95% 流分可能含三萜类化合物。为了进一步鉴定是否为三萜类物质,对上述流分进行薄板鉴定。结果如图 5(a)、b)。图 5(a)中, R_f 0.56 和 R_f 0.70 两个斑点随着显色时间的增加,颜色由黄→红→紫→红褐色,表明这两种灵芝酸具有不饱和性^[14-15]。图 5(b)

中, R_f 0.17 和 R_f 0.37 斑点发微弱的绿色荧光; R_f 0.56 和 R_f 0.70 两个斑点发较强的绿色荧光,且组分 5 中 R_f 0.56、 R_f 0.70 两个斑点荧光最强。



(a) 日光下检视; (b) 紫外 365 nm 下检视

1. 对照品; 2. 体积分数 40%乙醇洗脱液; 3. 体积分数 60%乙醇洗脱液; 4. 体积分数 80%乙醇洗脱液; 5. 体积分数 95%乙醇洗脱液

图 5 灵芝三萜的 TLC 图谱

Fig.5 TLC spectrum of Ganoderic triterpenes

综合表 2 和图 5 可以推断体积分数 20%、40% 的乙醇洗脱液中不含三萜类物质,体积分数 60%、80%、95%洗脱液所含灵芝三萜组分相同,95%的乙醇可将灵芝三萜类化合物全部解吸下来,实际操作中可采用梯度洗脱(水→体积分数 20%乙醇→体积分数 40%乙醇→体积分数 95%),先将部分杂质去除,再将灵芝三萜洗脱下来,提高洗脱液中灵芝三萜的纯度。

4 结 论

1) AB-8 大孔树脂对灵芝三萜吸附速度快,吸附容量大,易解吸,适宜从发酵液中富集提取灵芝三萜。

2) 上样的最佳条件为 pH 2,体积流量为 2 mL/min,此时 AB-8 树脂对灵芝三萜的吸附量达 8.837 mg/g。并确定最佳洗脱方案:采用梯度洗脱,水→体积分数 20%乙醇→体积分数 40%乙醇→体积分数 95%乙醇。

3) 建立了灵芝三萜薄层层析的定性检测方法,初步确定发酵液中含有的灵芝三萜的种类。

参考文献:

[1] 林志彬. 灵芝的现代研究[M]. 北京:北京医科大学出版社,2001.
[2] 王明宇,刘强,车庆明. 灵芝三萜类化合物对 3 种小鼠肝损伤模型的影响[J]. 药学学报,2000,35(5):326-329.
[3] 罗俊,林志彬. 灵芝三萜类化合物药理作用研究进展[J]. 药学学报,2002,37(7):574-578.

(下转第 126 页)

黑木耳多糖的提取及降血糖作用	韩春然, 马永强, 唐娟 (111)
特约综述	
国内外低值淡水鱼加工与下脚料利用的研究进展	张彪, 张骏 (115)
植物乳杆菌菌素研究进展	沈莲清, 苏光耀, 王向阳 (121)

第6期

专题研究

聚降解细菌的分离及其降解和转座基因的分子检测	蔡宝立, 丁蕊, 任河山, 等 (1)
茶渣中蛋白质酶法提取工艺	沈莲清, 黄光荣, 王向阳, 等 (7)
展青霉素人工抗原及多克隆抗体的研制	邓舜洲, 许杨 (13)
利用 his-tag 纯化和复性基因工程产物肠激酶	顾玮彦, 黄磊, 徐志南, 等 (18)
EGSB 反应器处理高浓硫酸盐废水	王伟, 阮文权, 邹华, 等 (23)
模糊数学在维生素 A 微胶囊工艺参数优化中的应用研究	谢岩蓉, 周惠明, 钱海峰 (29)
一株产海藻糖合成酶嗜中温芽孢杆菌的鉴定及其酶学性质	尚爱丽, 陈红漫 (34)
黄曲霉毒素 B ₁ 金标检测体系建立过程中的影响因素	孙秀兰, 张银志, 汤坚, 等 (37)
益生菌 <i>Lactobacillus salivarius</i> 的培养条件	王森, 张瑞裕, 陈晓峰 (42)
蜂毒肽与死亡素杂合肽(MT)在大肠杆菌中融合表达的研究	文良柱, 张家驷, 钱坤, 等 (45)
美味牛肝菌胞外多糖高产菌株的诱变选育	邓百万, 陈文强 (49)
巴西蘑菇发酵菌丝体醇提物的抑瘤活性	高虹, 谷文英, 丁霄霖 (54)
大豆 11S 球蛋白在空气-水界面上的吸附动力学	周春霞, 杨晓康, 温其标 (58)
戊糖的立体异构差异对风味物质形成的影响	侯亚龙, 陈正行, 罗昌荣, 等 (63)
以几种药食植物为基质的灵芝发酵和体外清除自由基活性的研究	崔月花, 章克昌 (70)
碳、氮源对 PVA 降解混合体系降解能力的影响及 PVA 降解机理初探	胡志毅, 褚国成, 华兆哲, 等 (73)
杆菌肽发酵的培养基优化及影响其检测的因素	雷波 (79)
海参多肽、多糖综合提取工艺条件的优化	王洪涛, 付学军, 申京宇, 等 (83)
中药栀子超临界萃取物的挥发性成分研究	张家驷, 钱华丽, 王利平, 等 (87)
凉粉草胶稀溶液的性质	冯涛, 顾正彪, 金征宇 (93)
富锌酵母的选育及其培养工艺	孔林, 郝勃, 喻子牛 (97)
植物乳杆菌 HO-69 产抗菌肽的培养条件	杨颖, Dinesh THAPA, 陈卫, 等 (102)
高产纤维素酶菌株的诱变选育和筛选	李西波, 刘胜利, 王耀民, 等 (107)
大孔树脂分离提取发酵液中灵芝三萜类物质	钱竹, 徐鹏, 章克昌, 等 (111)
美味猕猴桃根正丁醇提取物对小鼠急性肝损伤的保护作用	白新鹏, 裴爱泳 (115)
在大肠杆菌中融合表达重组羧肽酶抑制剂	许大洲, 王树英, 金坚, 等 (119)
2006 年总目录	(124)

(上接第 114 页)

- [4] 王帮武, 杨新林, 张利刚. 灵芝酸性组分的提取分离及抑菌活性研究[J]. 北京理工大学学报, 2002, 22(1): 125—128.
- [5] 黄书铭, 杨新林, 王帮武. 灵芝醇溶性组分的制备工艺与检测方法研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(4): 332—334.
- [6] Jiyan Ma, Qing Ye, Yanjun Hua, et al. New Lanostanoids from the mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. J Nat Prod, 2003, 66(12): 1582—1585.
- [7] Jiang-Jing Gao, Byung-Sun Min, Eun-Mi Ahn. New triterpene from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against Murine and Human Tumor cells[J]. Chem Pharm Bull, 2002, 50(6): 837—840.
- [8] 王林. 灵芝酸发酵及抗慢性支气管炎活性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [9] 李平作, 徐梁, 夏结红, 等. 灵芝深层发酵生产四环三萜酸的研究[J]. 工业微生物, 2000, 30(1): 15—17.
- [10] 中国医学科学院研究所. 薄层层析及其在中草药分析中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [11] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999.
- [12] 郭勇. 现代生化技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2001.
- [13] 白芳静. 灵芝深层发酵生产活性物质灵芝酸的研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1999.
- [14] 王冬梅, 尉芹, 马希汉. 大孔吸附树脂在药用植物有效成分分离中的应用[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(1): 60—63.
- [15] 李平作, 夏结红, 章克昌. 灵芝深层发酵产物中四环三萜酸的定性分析[J]. 中草药, 1999, 30(8): 584—586.

(责任编辑: 朱明)