

文章编号: 1000-5692(2007)02-0198-05

用大孔吸附树脂分离链格孢菌毒素

周兵, 安传福, 董云发, 强胜

(南京农业大学 杂草研究室, 江苏 南京 210095)

摘要: 研究了大孔吸附树脂 DA201, D101, HZ-803, 1300 及活性炭对链格孢菌 *Alternaria alternata* 毒素的吸附性能。结果表明, DA201 对链格孢菌毒素吸附解吸效果最佳, 吸附率最高, 为 72.88%, 吸附后滤出液毒性最弱, 解吸滤液毒性最强, 适合用于链格孢菌毒素的分离纯化富集。并以 DA201 为吸附材料, 对无菌滤液的上样量、pH 值和洗脱液乙醇的体积分数等条件进行了优化, 得到 DA201 对毒素吸附和解吸附的最优条件是: 无菌滤液的上样量体积为树脂体积的 60~70 倍, pH 4.12~4.62, 洗脱液为体积分数为 90% 的乙醇。图 1 表 3 参 12

关键词: 植物保护学; 链格孢菌毒素; 大孔吸附树脂; 活性炭; 吸附; 解吸

中图分类号: S451.1 **文献标志码:** A

链格孢菌 *Alternaria alternata* 是分布广泛的一种致病性真菌, 其代谢产生的毒素大多具有杀虫、杀菌和杀原生生物的生物活性, 其中一些菌株具有较强的开发潜力^[1]。强胜等^[2]研究发现, 链格孢菌培养液粗提物具有显著的致病性。进一步研究链格孢菌毒素的活性及作用机制发现, 可有效控制紫茎泽兰 *Eupatorium adenophorum* 及其生境主要杂草、农田禾草及许多阔叶杂草, 具有开发成为生物源除草剂的潜力^[3-5], 而有效分离和纯化链格孢菌毒素则成为产业化所必需的应用基础性研究。大孔吸附树脂是一类吸附性和筛选性相结合的分选材料, 具有机械强度高, 选择性好, 吸附量大, 吸附速度快, 易于解吸附和再生处理简单等优点^[6]。近年来, 在真菌毒素分离纯化富集中已得到了一些应用^[7-9]。但是, 不同的毒素由于化学结构不同, 需要的大孔吸附树脂类型和分离条件存在较大差异。安传福^[5]已将大孔吸附树脂用于紫茎泽兰致病型链格孢菌毒素的提取和分离, 并建立了链格孢菌毒素的提取分离工艺, 但未进行不同规格大孔吸附树脂吸附能力的比较研究, 因而不能肯定原选定规格的大孔吸附树脂吸附性是否最合适。作者进一步比较 DA201, D101, HZ-803 和 1300 等 4 种大孔吸附树脂以及活性炭对链格孢菌毒素的吸附效果, 以优化大孔吸附树脂的种类、吸附及解吸条件, 为建立链格孢菌毒素的提取纯化富集工艺流程提供有益参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

链格孢菌菌株 NEW 为南京农业大学杂草研究室实验室保存; 紫茎泽兰为温室培养苗; 大孔吸附

收稿日期: 2006-09-01; 修回日期: 2006-11-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2001AA246012); 江苏省科学技术攻关项目(BE2005349); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2005420), 教育部博士点研究基金资助项目(20050307002)

作者简介: 周兵, 博士研究生, 从事外来杂草生物防除技术等研究。E-mail: zhoubing113@tom.com. 通信作者: 强胜, 教授, 博士生导师, 从事杂草生物防治和植物分类学等研究。E-mail: wr1@njau.edu.cn

树脂 DA201, HZ-803 和 1300 购自上海亚东核级树脂有限公司; D101 购自南开大学; 颗粒状活性炭购自天津市科密欧化学试剂开发中心。

1.2 链格孢菌无菌滤液制备

将菌株 NEW 转接于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)固体培养基上培养 5 d (25 °C, 光照时数为 12 h·d⁻¹), 然后用直径为 6 mm 的打孔器打取菌丝块, 转接到 300 ml PSK 液体培养基中(500 mL 三角瓶), 每瓶接种 2 块, 振荡培养 5~7 d (25 °C, 光照时数为 12 h·d⁻¹, 110 r·min⁻¹)。培养液先用 4 层纱布过滤, 再经 2 层中速定性滤纸抽滤(双圈牌, 直径 9 cm, 型号为 102), 最后经孔径为 0.45 μm 的微孔薄膜过滤, 得到无菌滤液, 收集用于实验^[5]。

1.3 树脂和活性炭的活化

1.3.1 树脂预处理 大孔吸附树脂在实验前均须预处理。先将准备装柱使用的新树脂用 2 倍左右体积的丙酮浸泡 2 h, 并不断搅动使树脂充分溶胀, 装柱, 以 2~3 倍·h⁻¹床层体积的流速将丙酮通过树脂层, 至流出液加水稀释不浑浊, 然后以 2~3 倍·h⁻¹床层体积的流速使乙醇通过树脂层置换出丙酮, 最后以 6~8 倍每小时床层体积的流速使去离子水通过树脂置换出乙醇即可投入使用。

1.3.2 活性炭预处理 活性炭在 150 °C 下干燥 4 h, 再用蒸馏水浸泡 1 h, 除浮粉后备用。

1.4 大孔吸附树脂的筛选

准确量取活化树脂 DA201, D101, HZ-803 和 1300 及活性炭各 1 mL 置于 250 mL 锥形瓶中, 加入无菌滤液各 100 mL, 振荡培养(25 °C, 100 r·min⁻¹)24 h, 过滤。将滤液与树脂分离, 树脂置于 150 mL 锥形瓶中, 加 20 mL 乙醇振荡 24 h 解吸, 过滤得解吸滤液。以紫茎泽兰离体叶片针刺法检测吸附后滤出液及解吸滤液活性^[3], 同时检测滤出液密度, 结合原始无菌滤液密度, 计算无菌滤液在树脂上的吸附率, 并统计结果。每处理重复 4 次。

1.5 上样量优化

准确量取 15 份已活化的 DA201 树脂各 1 mL 置于 250 mL 锥形瓶中, 分别加入 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 和 150 mL 无菌滤液, 振荡吸附后, 将滤液与树脂分离, 滤出液活性及密度检测方法同 1.4, 并计算无菌滤液在 DA201 树脂上的吸附率, 统计结果。每处理重复 4 次。

1.6 无菌滤液 pH 值优化

准确量取 9 份已活化的 DA201 树脂各 1 mL 置于 250 mL 锥形瓶中, 再量取 9 份无菌滤液各 100 mL, 用 pH 计调节 pH 值, 使其 pH 值分别为 3.12, 3.62, 4.12, 4.62, 5.12, 5.62, 6.12, 6.62, 7.12, 再分别移入盛有树脂的锥形瓶中, 振荡吸附后, 分离滤液与树脂, 检测树脂解吸滤液、吸附后滤出液活性和密度, 计算吸附率, 结果统计及重复数同 1.4。

1.7 洗脱溶剂乙醇体积分数优化

准确量取 11 份已活化的 DA201 树脂各 1 mL 置于 250 mL 锥形瓶中, 分别加入无菌滤液 100 mL, 振荡器振荡(25 °C, 100 r·min⁻¹)24 h 过滤。分开滤液与树脂, 将树脂置于 150 mL 锥形瓶中, 分别加入 0, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 和 100% 不同体积分数的乙醇 20 mL, 振荡 24 h 解吸, 以离体叶片针刺法检测解吸滤液活性, 统计结果。每处理重复 4 次。

2 结果与分析

2.1 不同树脂和活性炭对毒素的吸附效果比较

不同树脂和活性炭对链格孢菌毒素的吸附效果见表 1。由表 1 可知, 在相同条件下, DA201 对链格孢菌毒素的吸附率最高, 达 72.88%, 与 HZ-803 相比, 差异不显著, 但显著高于其他吸附材料对毒素的吸附率; DA201 的解吸滤液毒性也最强, 导致的紫茎泽兰叶片病斑直径为 1.136 mm, 显著高于其他吸附材料解吸滤液毒性。活性炭对毒素的吸附效果最差, 其吸附率为 62.73%, 解吸滤液毒性也最弱, 导致的紫茎泽兰叶片病斑直径仅有 0.361 mm。另外, 各树脂及活性炭吸附后滤出液毒性不同, DA201 吸附后滤出液毒性最弱, D101, HZ-803, 1300 和活性炭吸附后滤出液毒性相对较强, 导致的紫

茎泽兰叶片病斑直径均超过 0.8 mm, 差异显著, 说明前者吸附能力强, 而其他的吸附能力相对较弱, 滤出液中残留更多的毒素。

表 1 不同吸附材料对链格孢菌毒素吸附效果的比较

Table 1 Various adsorbability for different adsorption materials to *Alternaria alternata* toxins

吸附材料	吸附率/%	解吸滤液导致的病斑直径/mm	吸附后滤出液导致的病斑直径/mm
DA201	72.88±0.63 a	1.136±0.081 a	0.242±0.006 c
D101	67.53±1.44 b	0.628±0.065 c	0.965±0.077 a
HZ-803	69.56±1.84 ab	0.875±0.084 b	0.956±0.048 a
1300	68.63±0.98 b	0.768±0.072 bc	0.804±0.043 b
活性炭	62.73±1.42 c	0.361±0.023 d	0.860±0.050 ab

说明: 表中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。表 2 表 3 同。

2.2 上样量对 DA201 吸附毒素效果的影响

由表 2 可知, 当上样量为树脂体积的 10~70 倍时, 随着上样量的增加, DA201 对毒素的吸附率逐渐升高, 70 倍体积时达到最高, 为 60.08%, 与 60 倍体积时相比, 差异不显著。但当上样量高于 70 倍体积时, 随着体积的增大, 对毒素的吸附率又逐渐降低, 表明 60~70 倍体积时已基本达到饱和吸附量。同时, 在吸附后滤出液毒性检测中发现, 10~70 倍体积的吸附后滤出液导致的紫茎泽兰叶片病斑直径基本一致, 70 倍体积后, 吸附后滤出液导致的紫茎泽兰叶片病斑直径不断增大,

表 2 上样量对 DA201 树脂吸附效果的影响

Table 2 Effects of loaded amount on the adsorbability of DA201

上样量/倍	吸附率/%	吸附后滤出液导致的病斑直径/mm
10	43.62±2.27 e	0.271±0.009 g
20	45.68±1.50 e	0.266±0.010 g
30	47.32±1.78 de	0.278±0.010 g
40	48.56±2.06 cde	0.280±0.006 g
50	49.79±2.56 bcde	0.276±0.008 g
60	53.50±3.32 abed	0.281±0.007 g
70	60.08±2.02 a	0.280±0.009 g
80	58.44±2.16 a	0.399±0.010 f
90	56.79±2.46 ab	0.436±0.011 f
100	56.38±1.06 ab	0.478±0.017 e
110	55.56±1.78 abc	0.568±0.016 d
120	55.14±2.27 abc	0.622±0.015 c
130	54.73±2.18 abc	0.645±0.028 c
140	53.91±2.60 abcd	0.734±0.019 b
150	53.50±1.40 abcd	0.920±0.015 a

与 70 倍体积时相比差异显著, 表明 70 倍体积后, 随着体积的增大, DA201 对毒素吸附能力下降。可见, 上样量为树脂体积的 60~70 倍时, DA201 对毒素的吸附效果最佳。

2.3 无菌滤液 pH 值对 DA201 吸附毒素效果的影响

无菌滤液 pH 值对 DA201 吸附毒素的影响见表 3。由表 3 可知, pH 3.12~4.62 时, 随着 pH 值的升高, DA201 对毒素的吸附率也增大, 解吸滤液导致的紫茎泽兰叶片病斑直径也随 pH 增大而增大, 均在 pH 4.62 时达到最大值, 但与 pH 4.12 时相比, 差异不显著; 当 pH > 4.62 时, 随着 pH 值的升高, DA201 树脂对毒素的吸附率逐渐降低, 与 pH 为 4.62 时相比差异显著, 解吸滤液导致的紫茎泽兰叶片病斑直径随 pH 增大而减小。pH 3.12~4.62 时, 吸附后滤出液导致的紫茎泽兰叶片病斑直径随 pH 增大而减小, 在 pH 4.62 时达到最小, 但 pH 3.6~4.62 时, 差异不显著, pH > 4.62 时, 则随 pH 增大而变大。可见 pH 4.12~4.62 时, DA201 树脂对毒素的吸附效果最佳。

2.4 乙醇体积分数对毒素解吸附效果的影响

不同乙醇体积分数对 DA201 所吸附毒素的解吸附效果的影响见图 1。乙醇体积分数为 0~40%, 解吸滤液导致的紫茎泽兰叶片病斑直径变化较小, 乙醇体积分数 > 40% 时, 随着体积分数的逐渐增

表 3 pH 值对 DA201 吸附链格孢菌毒素效果的影响

Table 3 Effects of pH on the adsorbability of DA201

pH	吸附率 /%	解吸滤液导致的病斑直径 /mm	吸附后滤出液导致的病斑直径 /mm
3.12	48.68±1.32 b	0.953±0.087 cd	0.487±0.039 b
3.62	49.47±1.87 b	0.992±0.052 bc	0.398±0.024 c
4.12	50.53±1.36 ab	1.172±0.062 ab	0.390±0.014 c
4.62	54.21±1.20 a	1.270±0.078 a	0.363±0.017 c
5.12	49.21±0.32 b	1.232±0.056 a	0.393±0.025 c
5.62	47.89±1.52 b	0.942±0.064 cd	0.477±0.022 b
6.12	46.84±1.39 b	0.932±0.056 cd	0.482±0.024 b
6.62	34.74±1.77 c	0.838±0.071 cd	0.497±0.023 b
7.12	23.68±1.39 d	0.770±0.057 e	0.568±0.023 a

大, 解吸滤液导致的紫茎泽兰叶片病斑直径也增大, 在 90% 时达到最大, 为 2.055 mm, 而在乙醇体积分数为 100% 时, 解吸滤液导致的紫茎泽兰叶片病斑直径又有所减小, 但仍显著高于乙醇体积分数为 0~40% 时的病斑直径。

3 结论

通过对 4 种大孔吸附树脂及活性炭的筛选发现, DA201 树脂对链格孢菌毒素的吸附率最高, 其解吸滤液的毒性最强, 吸附后滤出液的毒性最弱。因此, DA201 是对链格孢菌毒素吸附性能最佳的树脂, 可用于链格孢菌毒素的提取、纯化和富集等。DA201 对毒素吸附、解吸附的最优条件是: 无菌滤液上样量为树脂体积的 60~70 倍, pH 4.12~4.62, 洗脱液为体积分数 90% 的乙醇溶液。

4 讨论

吸附树脂对物质的吸附作用不仅同树脂的理化性质有关, 而且同被吸附物质的结构、性质、介质的性质及操作方法等因素都有关^[9]。非极性树脂适宜从极性溶液中吸附非极性物质, 极性树脂适宜从非极性溶剂中吸附极性物质^[11]。从以往实验可知^[3], 链格孢菌毒素主要存在于有机相, 即说毒素的极性不大, 所以选择非极性树脂有利于从培养液中吸附富集毒素, 所比较的 4 种树脂都是基于此而进行选择的。研究发现, 并不是吸附率高的吸附树脂, 对毒素的富集效果就好。如 HZ-803 比 D101 有着更高的吸附率, 但吸附后滤出液的毒性却是后者比前者低, 可见, 除大孔吸附树脂吸附能力外, 富集效果还取决于物质的结构以及物质与大孔吸附树脂的相容性。因此, 确定某一树脂的吸附性能, 其吸附率及吸附后滤出液的毒性均应予考虑。

DA201 对链格孢菌毒素的吸附率在低上样量时, 随上样量升高而增大, 但当超过 70 倍上样量时, 吸附效果有所下降。可能的原因是, 一方面, 固定体积的树脂都有一定的毒素吸附容量, 当超过这个阈值时, 部分毒素无法被吸附; 另一方面, 毒素与无菌滤液中其他被吸附物质因极性不同, 树脂对它们的吸附力存在差异, 超过一定体积上样量时, 与树脂吸附力大的物质, 将把部分被树脂吸附的毒素替换下来, 从而表现出树脂对毒素的吸附率降低。

进样液 pH 值是影响树脂吸附性能的重要因素之一, 溶液 pH 值变化可以改变有效成分在溶液中存在的形式、溶解度和溶液的极性, 从而影响树脂对有效成分的吸附效果^[12]。该研究中, DA201 在无菌滤液 pH 值不同时, 对链格孢菌毒素表现不同吸附效果, 其原因就在于此。

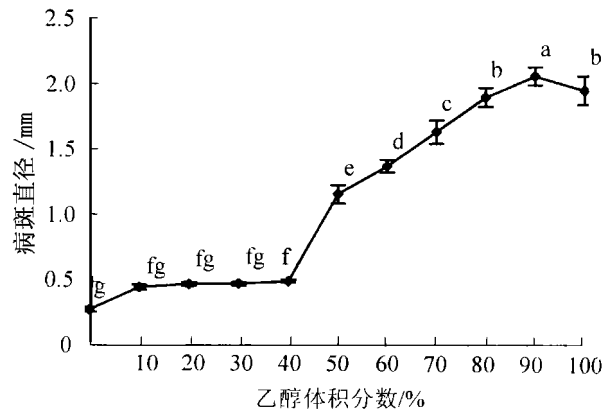


图 1 乙醇体积分数对毒素解吸效果的影响

Figure 1 Effects of ethanol concentration on the desorption of *Alternaria alternata* toxin

解吸附也是分离过程中关键的一步,乙醇是常用的洗脱溶剂之一。不同体积分数的乙醇溶液对吸附在 DA201 上的链格孢菌毒素的解吸效果不同,这可能是由于不同体积分数的乙醇溶液极性不同,影响毒素和树脂间的分子间作用力以及毒素在乙醇溶液中的溶解度。

参考文献:

- [1] 王洪凯, 张天宇, 张猛. 链格孢属真菌分类研究进展[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2001, 32(3): 406—410.
- [2] 强胜, 万佐玺, 董云发, 等. 链格孢菌毒素对紫茎泽兰致病性的初步研究[C] //孙霖昌. 面向 21 世纪中国杂草可持续治理: 第 6 次全国杂草科学学术研讨论文集. 南宁: 广西民族出版社, 1999: 158—165.
- [3] 万佐玺. 链格孢菌毒素对紫茎泽兰致病性及生物测定方法的研究[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2001, 19(1): 20—23.
- [4] 万佐玺, 强胜, 徐尚成, 等. 链格孢菌的产毒培养条件及其毒素的致病范围[J]. 中国生物防治, 2001, 17(1): 10—15.
- [5] 安传福. 链格孢菌毒素的大批量生产、分离、纯化和化学结构初步鉴定及其作为微生物源除草剂应用的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2003.
- [6] 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.
- [7] 阎国华, 甘立军, 周燮. 用 H103 大孔吸附树脂提取赤霉素 A3 的初步研究[J]. 南京农业大学学报, 1998, 22(1): 22—25.
- [8] 汤志刚, 周荣琪, 丁立, 等. 国产大孔吸附树脂浓集分离赤霉素[J]. 离子交换与吸附, 1999, 15(5): 440—446.
- [9] 范晋勇, 王志平, 吴金川, 等. 大孔吸附树脂提取麦拓莱霉素的工艺研究[J]. 离子交换与吸附, 2003, 19(6): 495—503.
- [10] 陈勇, 张晴. AB-8 大孔吸附树脂吸附和分离紫甘薯色素的研究[J]. 中国食品添加剂, 2001(1): 6—9.
- [11] 王继峰, 薛冬, 藏晶. 大孔吸附树脂在分离提纯中药有效成分中的应用[J]. 湖南中医药导报, 2001(2): 125—126.
- [12] 刘瑞源, 钟平, 戴开金. 大孔吸附树脂提取中草药有效成分的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004, 17(6): 385—386.

Isolation of *Alternaria alternata* toxin using macroporous resins

ZHOU Bing, AN Chuan-fu, DONG Yun-fa, QIANG Sheng

(Weed Research Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: To obtain right separation methods of *Alternaria alternata* toxin, absorptibility of macroporous resins, DA201, D101, HZ-803, 1300 and activated carbon were compared, and the filtrate load, pH, and concentration of ethanol that influenced adsorption and desorption were designed. Results showed that DA201 had the greatest absorptibility with best absorption and desorption in culture condition, a filtrate volume load of 60 to 70 times than resin volume, a pH of 4.12—4.62, and a 90% ethanol eluting solvent. Thus, DA201 was suitable for purification and enrichment of the *Alternaria alternata* toxin. [Ch, 1 fig. 3 tab. 12 ref.]

Key words: plant protection; *Alternaria alternata* toxin; macroporous resin; activated carbon; absorption; desorption