

发酵液中伊枯草菌素A脱色及分离纯化工艺优化

张文静, 王学珍, 左守博, 张慧莉*
(石河子大学生命科学学院, 新疆 石河子 832003)

摘要: 为实现发酵液中伊枯草菌素A的高效分离纯化, 建立活性炭脱色联合多级层析梯度纯化工艺。以脱色率与产物回收率为评价指标优化活性炭脱色条件, 再依次采用正丁醇萃取、HZ816大孔树脂层析与硅胶柱层析进行逐级纯化, 同时采用熵权法对脱色率与回收率、纯度与回收率进行客观赋权并完成多工艺综合评价, 筛选最优纯化方案。结果表明, 优化后活性炭脱色工艺可实现发酵液脱色率65.37%、伊枯草菌素A回收率89.48%; 经正丁醇萃取后产物纯度由3.91%升至19.23%, 回收率83.19%; HZ816大孔树脂纯化后纯度升至35.36%, 回收率66.21%; 最终经硅胶柱纯化后产物纯度达84.66%, 总回收率46.91%, 整体纯度约为初始样品的21.4倍。本研究构建的脱色-萃取-树脂吸附-硅胶精制一体化纯化路线操作简便、纯化效果优异, 可为伊枯草菌素A工业化规模化制备提供技术支撑, 同时也为同类生物活性脂肽物质的分离制备提供参考依据。

关键词: 脱色; 伊枯草菌素A; 分离纯化; 活性炭; 大孔树脂; 硅胶

Optimization of Decolorization, Separation and Purification Process of Iturin A in Fermentation Broth

ZHANG Wenjing, WANG Xuezheng, ZUO Shoubo, ZHANG Huili*
(College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: To achieve efficient separation and purification of iturin A from fermentation broth, a combined process of activated carbon decolorization and multi-stage gradient chromatography purification was established. Decolorization conditions were optimized using decolorization rate and product recovery rate as evaluation indices. Stepwise purification was performed sequentially by *n*-butanol extraction, HZ816 macroporous resin chromatography, and silica gel column chromatography. The entropy weight method was employed to assign objective weights to relevant indicators for comprehensive process evaluation and selection of the optimal purification scheme. The results showed that the optimized activated carbon decolorization process achieved a decolorization rate of 65.37% and iturin A recovery rate of 89.48% from fermentation broth. The product purity increased from 3.91% to 19.23% with a recovery rate of 83.19% after *n*-butanol extraction. The purity increased to 35.36%, and the recovery rate was 66.21% after HZ816 macroporous resin purification. The final purity after silica gel column chromatography purification reached 84.66% with a total recovery rate of 46.91%, which was 21.4 times as high as the initial purity. The integrated purification route featuring decolorization, extraction, resin adsorption and silica gel refining is simple to operate and presents satisfactory purification performance. It can provide technical support for the industrial large-scale preparation of iturin A and a reference for the separation of similar bioactive lipopeptides.

Keywords: decolorization; iturin A; separation and purification; activated carbon; macroporous resin; silica gel

收稿日期: 2025-10-12

基金项目: 新疆建设生产兵团科技计划项目(2021CB001)

第一作者简介: 张文静(1999—)(ORCID: 0009-0007-5576-6782), 女, 硕士研究生, 研究方向为发酵产物伊枯草菌素A的分离纯化及抗菌应用。E-mail: 1413453306@qq.com

*通信作者简介: 张慧莉(1978—)(ORCID: 0000-0002-2772-3618), 女, 副教授, 博士, 研究方向为高附加值生物化学品及微生物药物生产菌的菌种选育、发酵工艺研究和代谢工程。E-mail: zhanghch02@126.com

DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.06.013

中图分类号: TS201.2; TQ920.6

文献标志码: A

文章编号: 0254-5071 (2026) 06-0098-08

引文格式:

张文静, 王学珍, 左守博, 等. 发酵液中伊枯草菌素A脱色及分离纯化工艺优化[J]. 中国酿造, 2026, 45(6): 98-105.

DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.06.013. <http://www.chinabrewing.net.cn>

ZHANG Wenjing, WANG Xuezheng, ZUO Shoubo, et al. Optimization of decolorization, separation and purification process of iturin A in fermentation broth[J]. China Brewing, 2026, 45(6): 98-105. (in Chinese with English abstract) DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.06.013. <http://www.chinabrewing.net.cn>

伊枯草菌素A (Iturin A) 属于环脂肽类抗生素, 其独特的两亲性结构赋予其优异的抗菌活性^[1-2]。Iturin A对黑曲霉^[3]、白色念珠菌^[4]、青霉^[5]、禾谷镰刀菌^[6]等多数真菌具有抑制作用, 常应用于植物病害防控领域, 用于防治各类植物病原真菌^[7-9]。

经有机试剂提取后得到的Iturin A粗提物含有植物蛋白、色素及多糖等杂质, 需进一步纯化才能得Iturin A。目前Iturin A分离纯化方法主要包括溶剂萃取法^[10]、大孔吸附树脂法^[11-12]、硅胶柱层析法等^[13-14]。如Zhang Dongliang等^[15]利用CaCl₂与Na₂HPO₄作为凝集剂, 结合乙醇凝集获得高纯度表面活性肽, 但所使用的发酵培养基营养单一、产量低, 该方法不适合从复杂发酵培养基中分离纯化Iturin A; Dhanarajan等^[12]研究表明, 通过大孔树脂纯化策略纯化后, Iturin A纯度仅为68.3%; 何强^[16]运用离子树脂和大孔树脂层析方法分离纯化天然脂肽, 但Iturin A、Surfactin等脂肽类物质难以被离子交换树脂吸附, 难以采用该方法实现有效分离; Yuan Yuan等^[17]利用大孔树脂纯化发酵产物, 经核磁共振鉴定为伊枯草菌素同系物。

本研究以乙醇浸提液为基础, 通过构建“活性炭脱色-正丁醇萃取-大孔树脂-硅胶柱精制”梯度纯化新工艺, 以期对Iturin A规模化制备提供解决方案, 为脂肽类化合物分离纯化提供实践指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) ND 中国典型培养物保藏中心 (CCTCCM 2020983)。

胰蛋白胨、酵母粉、活性炭、豆粕粉 (均为分析纯) 北京索莱宝科技有限公司; 氯化钠、L-谷氨酸钠、七水合硫酸镁、磷酸二氢钾、七水合硫酸亚铁、乙酸铵、一水合硫酸锰、五水合硫酸铜 (均为分析纯) 天津盛奥科技有限公司; Iturin A标准品 (色谱纯 ≥ 95%) 美国Sigma公司; HZ816型大孔树脂、HP-20型大孔树脂、X-5型大孔树脂 (均为分析纯) 郑州和成新材料科技有限公司; 甘油、二氯甲烷、乙酸乙酯、正

己烷、正丁醇、甲醇 (均为分析纯) 天津市富宇精细化工有限公司; 甲醇、乙腈 (均色谱纯) 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 硅胶 (生化试剂, 200~300目) 青岛海洋化工厂; 实验用水为蒸馏水。

LB液体培养基: 胰蛋白胨10 g、酵母粉5 g、NaCl 10 g (配制固体培养基时加琼脂18 g)、蒸馏水1 L, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

发酵培养基: 豆粕粉120 g、酵母浸粉16 g、L-谷氨酸钠1 g、甘油70 mL、七水合硫酸镁0.5 g、磷酸二氢钾1.0 g、七水合硫酸亚铁0.15 mg、一水合硫酸锰5 mg、五水合硫酸铜0.16 mg, pH 8, 蒸馏水1 L, 121 °C高压蒸汽灭菌20 min。

1.2 仪器与设备

PHS-25 pH计 上海仪电科学仪器股份有限公司; 1200高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 仪 (配备可变波长检测器) 美国安捷伦公司; UV-1000紫外-可见分光光度计 翱艺仪器 (上海) 有限公司; MULTIFUGE X3R高速冷冻离心机 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; EYEL4旋转蒸发仪 东京理化器械株式会社。

1.3 方法

1.3.1 Iturin A粗提物制备

将*B. velezensis* ND接种于LB固体培养基, 37 °C培养12 h后挑取单菌落转接至LB液体培养基, 37 °C、180 r/min培养19~20 h; 随后以10% (V/V) 接种量接入装有30 mL发酵培养基的250 mL锥形瓶中, 30 °C、180 r/min发酵5 d, 获得Iturin A发酵液, 将发酵液调至pH 3后, 4 °C静置1 h, 10 000 r/min离心15 min收集沉淀, 采用初始发酵液与无水乙醇 (1:7, V/V) 重悬, 76.5 °C浸提72 min, 再次经10 000 r/min离心15 min后收集上清液, 最后在50 °C、-0.1 MPa条件下旋蒸浓缩旋干, 制得Iturin A粗提物, 备用。

1.3.2 Iturin A含量测定

样品中Iturin A含量测定参照Tang Zhongmin^[18]、石举然^[19]等方法进行。采用HPLC法测定Iturin A含量。色谱条件: ZORBAX SB-C₁₈色谱柱 (150 mm ×

4.6 mm, 5 μ m)。流动相为10 mmol/L乙酸铵-乙腈(65:35, *V/V*)，流速1.0 mL/min，检测波长210 nm。样品用甲醇溶解，涡旋振荡10 min，经0.22 μ m微孔滤膜过滤后，按上述方法测样品峰面积。根据标准曲线方程计算样品中Iturin A含量。

1.3.3 脱色率、回收率、纯度、吸附率及解吸率测定

使用紫外-可见分光光度计测量Iturin A脱色前后297 nm波长处吸光度，根据式(1)计算脱色率，测定每次处理前后的Iturin A质量，按照式(2)计算回收率：

$$\text{脱色率}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{回收率}/\% = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad (2)$$

式中： A_0 为脱色前吸光度； A_1 为脱色后吸光度； m_0 为处理前Iturin A质量/g； m_1 为处理后Iturin A质量/g。

按式(3)计算纯度：

$$\text{纯度}/\% = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (3)$$

式中： m_2 为处理后样品质量/g。

分别按式(4) (5)计算吸附率与解吸率：

$$\text{吸附率}/\% = \frac{m_3 - m_4}{m_3} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{解吸率}/\% = \frac{m_5}{m_3 - m_4} \times 100 \quad (5)$$

式中： m_3 为原始样液中Iturin A质量/g； m_4 为吸附后溶液中的Iturin A质量/g； m_5 为解吸后溶液中的Iturin A质量/g。

1.3.4 熵权法计算加权综合评分

采用熵权法对脱色率与回收率、纯度与回收率进行客观赋权与综合评价。熵权法是一种基于信息熵理论的客观赋权方法，首先，对脱色率与回收率或纯度与回收率的原始数据进行标准化处理；其次，计算各指标的信息熵与差异系数；最后，根据差异系数确定各指标的客观权重，并据此计算各工艺的加权综合评分。该方法完全由数据驱动，可避免主观设定权重可能带来的偏差，从而保证评价结果的客观性与科学性^[20]。

1.3.5 活性炭脱色工艺优化

为系统优化活性炭对Iturin A粗提液的脱色工艺，本研究采用经典单因素试验法，取Iturin A粗提物，加适当蒸馏水充分溶解得到Iturin A提取液，分别考察活性炭用量、脱色温度、脱色时间、脱色pH值4个因素对Iturin A提取液脱色率、Iturin A回收率的影响，在确定某一因素的最优水平后，将其固定为后续因素考察的基准条件。固定脱色时间30 min、脱色温度50 $^{\circ}$ C、pH 8、考察活性炭用量(0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%，以提取液质量计)对Iturin A提

取液脱色率和Iturin A回收率的影响；固定活性炭用量1%、脱色温度50 $^{\circ}$ C、pH 8，考察脱色时间(10、20、30、40、50、60、70 min)对Iturin A提取液脱色率和Iturin A回收率的影响；固定活性炭用量1%、脱色时间40 min、pH 8，考察脱色温度(20、30、40、50、60、70、80 $^{\circ}$ C)对Iturin A提取液脱色率和Iturin A回收率的影响；固定活性炭用量1%、脱色时间40 min、脱色温度40 $^{\circ}$ C，考察脱色pH值(2、3、4、5、6、7、8)对Iturin A提取液脱色率和Iturin A回收率的影响^[21-22]。

1.3.6 溶剂萃取工艺优化

利用Iturin A在有机试剂和水中的分配特性不同，将脱色后提取液分别与有机试剂(二氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷、正丁醇)按4:1(*V/V*)混合，振荡萃取静置30 min，利用分液漏斗进行分离，计算样品的回收率、纯度，获得萃取效果最优的有机试剂。最终选择工艺为脱色后处理液:最优萃取剂=4:1(*V/V*)，连续萃取3次，合并有机相，计算总纯度、总回收率^[23]。

1.3.7 大孔树脂纯化工艺优化

将3种树脂(HZ816、HP-20、X-5)浸入95%乙醇中过夜，并用超纯水冲洗至不含乙醇，分别用100 mL 5%(*V/V*) HCl和5%(*V/V*) NaOH溶液冲洗，使用超纯水洗脱，使pH值中性。大孔吸附树脂物理性质见表1。

表1 大孔树脂型号及其参数
Table 1 Types and parameters of macroporous resins

型号	平均孔径/ $\text{\AA}$	粒径/mm	类别	比表面积/(m^2/g)
HZ816	100~120	0.315~1.25	非极性	≥ 680
HP20	75~80	0.315~1.25	非极性	≥ 500
X-5	290~300	0.315~1.25	非极性	500~600

称取2.0 g预处理后的HZ816、HP20和X-5大孔树脂于250 mL锥形瓶中，与在最佳脱色条件下获得的25 mL提取液混合，120 r/min、25 $^{\circ}$ C持续摇动锥形瓶24 h。达到平衡后，将提取物与树脂分离，然后在相同振荡条件下用25 mL 100%甲醇解吸树脂24 h。比较不同大孔树脂之间的吸附率、解吸率。基于此，考察萃取后提取液pH值(4、5、6、7、8、9)、解吸液甲醇体积分数(50%、60%、70%、80%、90%、100%)、解吸液pH值(4、5、6、7、8、9)对目标物解吸率的影响，实验中使用的树脂质量为2 g，吸附和解吸温度固定为25 $^{\circ}$ C，振荡速率120 r/min。

1.3.8 HZ816大孔树脂与硅胶柱层析分离Iturin A

采用HZ816大孔树脂(3 cm $\times$ 30 cm)，柱体积50 mL，上样前调节样液pH值至8，上样体积2 BV，流速1 mL/min，依次用2.4 BV水、2.4 BV 50%甲醇、2 BV 90%甲醇梯度洗脱，收集洗脱液20 mL/管，减压蒸馏浓缩

旋干,测每管中Iturin A含量,计算样品回收率和纯度,合并高纯度组分。

采用硅胶柱(200~300目、3 cm×30 cm),柱体积50 mL(乙酸乙酯平衡),上样后采用乙酸乙酯-甲醇(9:1、8:2、7:3、6:4、1:1, V/V)流动相分别进行洗脱,每个比例洗脱6 BV,并以每50 mL为一个馏分进行收集^[11,24]。所有馏分均经HPLC在210 nm波长下进行分析,确定可洗脱出Iturin A为洗脱目标成分的最佳比例为1:1。采用硅胶柱(200~300目、3 cm×30 cm),柱体积50 mL(乙酸乙酯平衡),上样后依次用2.8 BV乙酸乙酯:甲醇=3:2(V/V)、4.8 BV乙酸乙酯:甲醇=1:1(V/V)、2 BV乙酸乙酯:甲醇=2:3(V/V)、2 BV甲醇洗脱剂分段洗脱,收集洗脱液20 mL/管,减压浓缩以蒸干洗脱剂,然后用甲醇溶解,定容至合适的体积,测定每管中Iturin A含量,计算样品回收率和纯度,合并高纯度组分。

1.4 数据处理

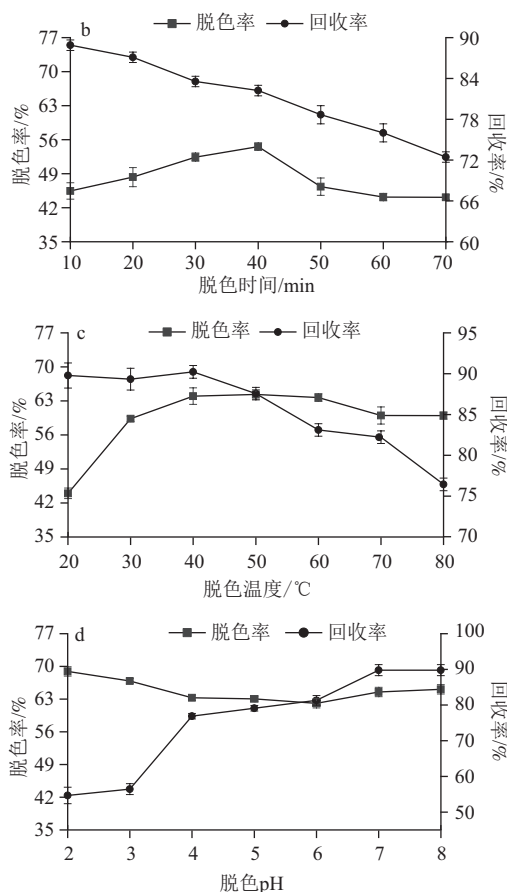
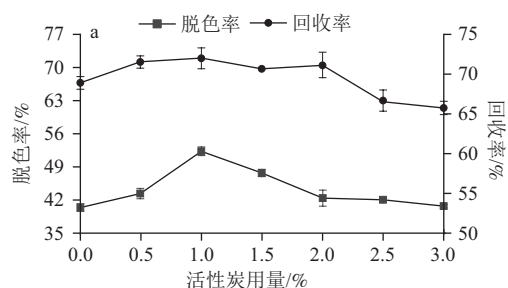
所有实验均重复进行3次操作,利用Origin 2025软件对各组数据进行描述性统计分析、绘图,利用Excel软件对分离纯化数据进行处理,计算综合评分。

2 结果与分析

2.1 活性炭脱色条件优化

2.1.1 活性炭脱色条件单因素试验结果

如图1a所示,活性炭用量对脱色率与Iturin A回收率呈现竞争性吸附效应。脱色率随用量增加呈先升后降趋势,在1.0%时达到峰值,超过该用量因吸附位点饱和导致吸附效率下降;而Iturin A回收率在活性炭用量大于1%时,由于其对目标产物的不可逆结合增强而显著降低。基于熵权法计算加权综合评分,脱色率与回收率的客观权重分别为50.21%和49.79%。基于此权重计算活性炭用量0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%的加权综合评分分别为0.231 5、0.244 2、0.269 6、0.254 7、0.240 9、0.232 2、0.226 9。活性炭用量为1.0%时,综合评分最高,可实现脱色率(52.37%)与回收率(72%)的协同优化。



a.活性炭用量; b.脱色时间; c.脱色温度; d.脱色pH值。

图1 Iturin A提取液脱色工艺条件单因素试验结果

Fig. 1 Single-factor test results of decolorization conditions for iturin A extract

如图1b所示,脱色过程呈现典型吸附-解吸动态平衡。脱色率在10~40 min缓慢上升,40 min达峰值后因色素解吸加速而下降;而Iturin A回收率由于活性炭对环脂肽的非特异性吸附增强及吸附稳定性提升,因此随脱色时间延长而持续降低(10~70 min下降16.44%)。基于熵权法计算加权综合评分,脱色率与回收率的客观权重分别为50.09%和49.91%。基于此权重计算脱色时间10、20、30、40、50、60、70 min的加权综合评分分别为0.243 2、0.247 7、0.252 8、0.256 2、0.230 5、0.221 3、0.216 0。脱色40 min时综合评分最高,此时脱色率为54.57%、回收率为82.22%。

如图1c所示,在20~40℃区间,由于热运动加速色素分子扩散与碰撞效率,脱色率随温度升高显著提升(增幅20%);40℃时脱色率(63.98%)与Iturin A回收率(90.22%)同时达到最高。温度高于60℃后,脱色率因活性炭孔隙坍塌而下降,同时Iturin A回收率降低,表明肽键发生热降解。基于熵权法计算加权综合评分,脱色率与回收率的客观权重分别为50.47%和49.53%。基于此权重计算脱色温度20、30、40、50、60、70、80℃的加权综合评分分别为0.220 4、0.253 2、0.264 6、

0.261 7、0.254 1、0.244 8、0.236 8。发现40 ℃时综合评分最高,此时脱色率为63.98%、回收率为90.22%。

如图1d所示,在pH<4时,活性炭表面高正电荷密度通过强静电作用实现高效色素脱除,但导致带正电的Iturin A回收率受限;随着pH值升至4~6,色素吸附机制转向疏水相互作用主导,使脱色率趋于稳定(63%左右),同时Iturin A电性转为弱负电,与带正电活性炭的静电排斥增强,推动回收率提升;在pH>7时,色素胶体稳定性破坏引发的疏水效应促使脱色率回升至64%以上,而Iturin A与活性炭表面强负电荷间的静电排斥作用使产物回收率突破89%。基于熵权法计算加权综合评分,脱色率与回收率的客观权重分别为49.40%和50.60%。基于此权重计算脱色pH 2、3、4、5、6、7、8的加权综合评分分别为0.233 5、0.233 0、0.264 9、0.268 7、0.271 1、0.291 7、0.292 7,脱色pH 8时综合评分最高,因此最终确定脱色pH 8为最优。

综上,以活性炭用量1%、脱色时间40 min、脱色温度40 ℃、脱色pH 8进行Iturin A提取液脱色处理,可得脱色率为65.37%,回收率为89.48%。

2.1.2 溶剂萃取工艺的优化

如表2所示,以正丁醇:水(4:1, V/V)为萃取体系可高效富集水相多肽。单次萃取纯度达24.50%、回收率59.27%,优于二氯甲烷、乙酸乙酯及正己烷(纯度<4%、回收率<1%)。经3次连续萃取^[25], Iturin A总收率达92.98%(与脱色工艺累计回收率为83.19%),合并纯度为19.23%(较初始提升约4.9倍)。尽管后续萃取纯度递减(2次16.8%、3次9.8%),但萃取3次后总回收率可达90%以上。综上,正丁醇体系在Iturin A分离中具有较高选择性与较高回收率优势。

表2 萃取试剂及萃取次数对Iturin A纯度与回收率的影响

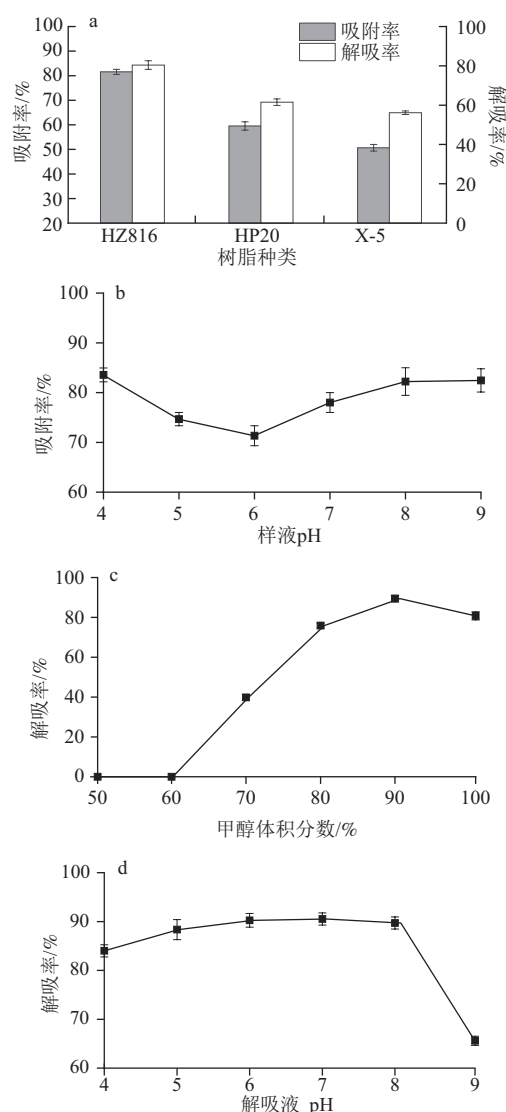
Table 2 Effects of extraction solvent and extraction times on purity and recovery rate of iturin A

萃取试剂	萃取次数	纯度/%	回收率/%
二氯甲烷	1	3.00	0.85
乙酸乙酯	1	0.80	0.96
正己烷	1	0.76	0.42
正丁醇	1	24.50	59.27
正丁醇	2	16.80	24.10
正丁醇	3	9.80	9.60

2.2 大孔树脂柱层析及硅胶柱层析纯化条件优化

2.2.1 大孔树脂筛选

如图2a所示, HZ816大孔树脂的静态吸附率(81.56%)与解吸率(80.40%)明显高于HP20、X-5,因此选择HZ816进行后续实验。



a.不同大孔树脂(HZ816、HP20、X-5)对Iturin A的吸附率与解吸率; b.不同样液pH值下Iturin A的吸附率; c.不同甲醇体积分数下Iturin A的解吸率; d.不同解吸液pH值下Iturin A的解吸率。

图2 大孔树脂纯化工艺优化结果

Fig. 2 Optimization results of the macroporous resin purification process

2.2.2 大孔树脂纯化工艺条件单因素试验结果

如图2b所示,当pH值从4升至6时,吸附率由83.56%降至71.33%,因Iturin A羧基解离增强导致负电荷密度上升,分子内极性作用促使疏水链折叠、疏水性降低,削弱了与树脂的疏水相互作用;当pH值从6升至9时,吸附率由71.33%回升至82.24%,由于负电荷密度进一步升高引发强烈电荷排斥,使分子构象伸展、疏水链暴露,显著增强疏水性并强化吸附作用。鉴于pH 4(83.56%)与pH 8(82.22%)吸附率接近且均处高位,考虑到大量处理液回调至中性会产生盐分,不利于后续纯化操作,且前期体系pH值接近8,故直接采用浓缩液进行上样处理,以此简化整体工艺。

如图2c所示, 甲醇体积分数通过双重作用调控解吸率: 甲醇体积分数由70%升至90%时, 解吸率从39.84%激增至89.43%, 源于洗脱液极性降低竞争性削弱疏水吸附作用, 同时Iturin A在甲醇中溶解度上升, 二者协同促进目标物质解吸; 甲醇体积分数升至100%时, 解吸率降至80.76%, 因纯甲醇环境导致亲水肽环溶解度下降, 且分子间作用增强阻碍有效扩散。因此, 确定90%甲醇为最优体积分数, 其峰值解吸率达89.43%。

如图2d所示, pH 4~6时解吸率持续上升, 因pH>pI时, Iturin A所带负电荷密度增加、分子极性增强, 不仅削弱疏水作用, 还可提升其在甲醇中的溶解度; pH 6~8时解吸率维持90%左右, 此时疏水作用持续减弱与溶解度饱和达成动力学平衡; pH>8后, 强碱性环境易形成氢键缔合结构, 降低物质溶解性与扩散效率, 最终导致解吸率回落。90%甲醇自身pH值(6.5~7.5)恰好处于高解吸率稳定区间(pH 6~8), 故无需调节pH值即可直接用作洗脱剂。

2.2.3 大孔树脂柱层析纯化及产物纯度

如图3所示, 大孔树脂柱层析洗脱液中Iturin A质量出现2个洗脱峰, 第1个峰(0.4~1.6 BV)是由于上样Iturin A总量略高于该特定条件下大孔树脂的动态吸附载量。因此, 一部分Iturin A未能被树脂有效吸附, 而是随着蒸馏水直接流出大孔树脂柱。这部分产物在洗脱曲线上形成了1个较早的峰。第2个主峰(6~7.6 BV), 当洗脱剂为90%甲醇时, 成功吸附在树脂上的Iturin A被解吸附, 形成1个洗脱峰, 在洗脱液6.4 BV时, Iturin A质量迅速下降。对6~7.6 BV洗脱液进行合并, 其纯度由19.23%提升至35.36%, 回收率为66.21%。

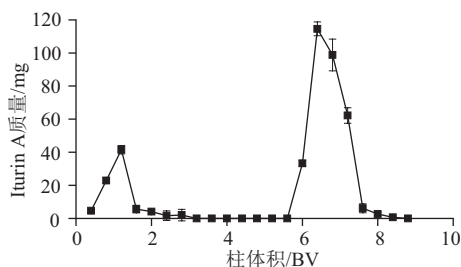
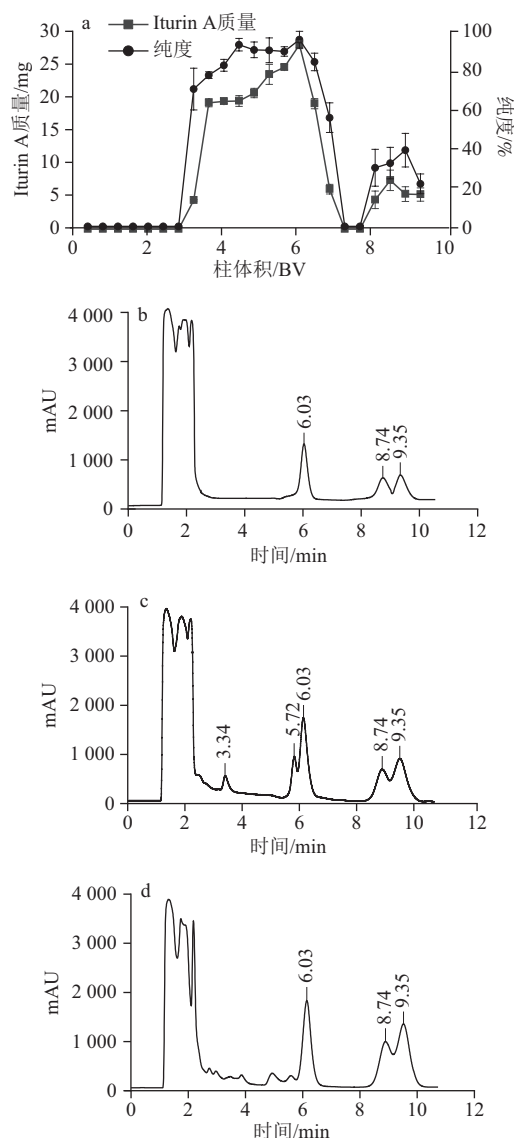


图3 大孔树脂柱层析动态洗脱曲线
Fig. 3 Dynamic elution curve of macroporous resin column chromatography

2.2.4 硅胶柱层析纯化及产物纯度

如图4所示, 硅胶柱层析纯化后的Iturin A周围杂质峰数目及高度明显减少, 硅胶柱层析洗脱液中Iturin A质量在2.8~3.6 BV时迅速上升, 在3.6~6.0 BV时较为平稳, 在6.0 BV后Iturin A质量迅速下降。合并3.2~6.8 BV高纯度组分, 得到纯度84.66%、回收率46.91%的Iturin A。



a. 硅胶柱层析动态洗脱曲线; b. Iturin A标准品HPLC谱图;
c. 硅胶柱层析纯化前HPLC谱图; d. 硅胶柱层析纯化后HPLC谱图。

图4 硅胶柱层析纯化工艺优化结果
Fig. 4 Optimization results of silica gel column chromatography purification process

2.2.5 基于熵权法的纯化工艺综合评价

为更客观地确定纯度与回收率在综合评分中的相对重要性, 进一步采用熵权法进行客观赋权并计算综合评分, 结果表明纯度与回收率的客观权重分别为89.49%和10.51%。依托该权重计算得出, 正丁醇1次萃取、正丁醇3次萃取和正丁醇3次萃取结合大孔树脂纯化及正丁醇3次萃取结合大孔树脂、硅胶纯化的综合评分分别为0.158 3、0.139 3、0.220 5及0.481 9。从综合得分来看, 正丁醇3次萃取结合大孔树脂、硅胶纯化工艺显著优于其他3种方案, 也进一步验证了正丁醇萃取-大孔树脂层析-硅胶柱精制3级纯化体系具备良好可行性与实际应用价值。

3 讨论

Iturin A因其独特的分子结构,在抑菌活性和分离难度上形成鲜明对比,其工业化生产长期面临回收率低和成本高的双重挑战。现阶段活性炭脱色已广泛应用于发酵液预处理领域,但针对伊枯草菌素A发酵液的脱色工艺研究仍较为匮乏,本研究首先通过调节活性炭脱色pH值至8,使Iturin A分子表面羧基充分电离而携带负电荷,与活性炭表面含氧基团产生同电荷排斥效应,成功将脱色率与产物回收率协同优化至65.37%与89.48%。在此基础上,建立正丁醇萃取-大孔树脂层析-硅胶柱精制三级纯化体系:首先采用正丁醇进行3次萃取,使产物纯度从3.91%提升至19.23%,回收率83.19%;利用HZ816大孔树脂的超高比表面积特性与优化孔径结构,通过90%甲醇洗脱,产物纯度增至35.36%,回收率达66.21%;最后通过硅胶柱多梯度洗脱获得纯度为84.66%的产物,回收率46.91%。产物纯度约为初始浸提液的21.4倍(表3)。与现有方法相比,本工艺可在营养成分复杂的培养基(豆粕质量较高)中获得较高纯度的Iturin A,并具有操作简便、设备要求低等优势,为Iturin A的工业化制备提供思路,可推动Iturin A在农业生物防治^[26]、医药开发^[27]和食品保鲜^[28]等领域的应用。

表3 Iturin A分离纯化工艺过程参数

Table 3 Process parameters of iturin A separation and purification

步骤	纯度/%	步骤回收率/%	累计回收率/%
初始提取液	3.96	100	100
活性炭脱色后	3.91	89.48	89.48
正丁醇萃取后	19.23	92.98	83.19
大孔树脂纯化后	35.36	79.58	66.21
硅胶柱纯化后	84.66	70.86	46.91

4 结论

本研究构建了以活性炭脱色、多级纯化联用的Iturin A高效制备工艺。以脱色率与回收率为双目标,通过正丁醇萃取及梯度纯化,实现纯度从3.91%升至84.66%(约为初始样品的21.4倍),突破现有Iturin A纯度为68.3%瓶颈。在活性炭脱色阶段脱色率65.37%、回收率89.48%;正丁醇萃取纯度升至19.23%、回收率83.19%;HZ816树脂提纯后纯度升至35.36%、回收率66.21%;硅胶柱精制终纯度达84.66%、回收率46.91%。该工艺在保证高纯度的同时兼顾了各阶段的回收率,所建立的工艺流程为Iturin A的规模化制备提供参考。

参考文献:

- [1] 出晓铭. 生防菌解淀粉芽孢杆菌LY-1抗菌脂肽Iturin A的纯化鉴定及抑菌机理研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2016. DOI:10.27018/d.cnki.gfjnu.2016.000313.
- [2] 蔡勋超. 生防贝莱斯芽孢杆菌CC09菌株的基因组学转录组学及其合成iturin A的调控机理[D]. 南京: 南京大学, 2017. DOI:10.27235/d.cnki.gnjju.2017.000664.
- [3] WANG S Y, XU M, HAN Y, et al. Exploring mechanisms of antifungal lipopeptide iturin a from *Bacillus* against *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Fungi*, 2024, 10(3): 172. DOI:10.3390/jof10030172.
- [4] LEI S Z, ZHAO H B, PANG B, et al. Capability of iturin from *Bacillus subtilis* to inhibit *Candida albicans* *in vitro* and *in vivo*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(11): 4377-4392. DOI:10.1007/s00253-019-09805-z.
- [5] AMBRICO A, TRUPO M. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 134: 5-10. DOI:10.1016/j.postharvbio.2017.08.001.
- [6] 栾鹏宇. *B. amyloliquefaciens* ZK-9防治禾谷镰刀菌的作用及其产物Iturin A的抑菌机制研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2024. DOI:10.27791/d.cnki.ghegy.2024.000441.
- [7] YARAGUPPI D A, BAGEWADI Z K, PATIL N R, et al. Iturin: a promising cyclic lipopeptide with diverse applications[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(10): 1515. DOI:10.3390/biom13101515.
- [8] ZENG P, WANG H L, ZHANG P F, et al. Unearthing naturally-occurring cyclic antibacterial peptides and their structural optimization strategies[J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 73: 108371. DOI:10.1016/j.biotechadv.2024.108371.
- [9] DENG L Z, XU R R, ZHANG S Q, et al. Calcium alginate-encapsulated *Propolis* microcapsules: optimization, characterization, and preservation effects on postharvest sweet cherry[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 282: 137473. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.137473.
- [10] YUAN J, RAZA W, HUANG Q W, et al. Quantification of the antifungal lipopeptide iturin A by high performance liquid chromatography coupled with aqueous two-phase extraction[J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(26): 2746-2750. DOI:10.1016/j.jchromb.2011.07.041.
- [11] 张婷, 杨杰, 周金燕, 等. 大孔吸附树脂分离提取发酵液中伊枯草菌素A的研究[J]. *广东农业科学*, 2012, 39(8): 94-96. DOI:10.3969/j.issn.1004-874X.2012.08.030.
- [12] DHANARAJAN G, RANGARAJAN V, SEN R. Dual gradient macroporous resin column chromatography for concurrent separation and purification of three families of marine bacterial lipopeptides from cell free broth[J]. *Separation and Purification Technology*, 2015, 143: 72-79. DOI:10.1016/j.seppur.2015.01.025.
- [13] 顾康博. 细菌源脂肽的规模化制备和BM脂肽毒理及其防治灰霉病药效的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2018.
- [14] FANG Y Y, LI L L, ZHENG Y L, et al. Extraction, isolation and identification of antimicrobial substances from *Bacillus amyloliquefaciens* CMN1308[J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2017, 45(1): 308-315. DOI:10.15835/nbha45110654.
- [15] ZHANG D L, WANG Y F, LU Y J, et al. An efficient method for separation of surfactin from *Bacillus amyloliquefaciens* fmb50 broth by flocculation[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(7): 1182-1188. DOI:10.1016/j.procbio.2014.03.021.
- [16] 何强. 达托霉素的分离纯化研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017.

- [17] YUAN Y, CHU D P, FAN J J, et al. Production of antifungal iturins from vegetable straw: a combined chemical-bacterial process[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 378: 129010. DOI:10.1016/j.biortech.2023.129010.
- [18] TANG Z M, ZHANG H L, XIONG J, et al. Enhanced iturin A production in a two-compartment biofilm reactor by *Bacillus velezensis* ND[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1102786. DOI:10.3389/fbioe.2023.1102786.
- [19] 石举然. 解淀粉芽孢杆菌iturinA的分离纯化及其对橙汁中酿酒酵母抑制作用的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017. DOI:10.7666/d.Y3539831.
- [20] 田彦芳, 万海同, 朱紫烨, 等. 基于熵权法的多目标筛选甘草黄酮类成分纯化工艺[J]. *中草药*, 2016, 47(7): 1118-1125. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.010.
- [21] KORKMAZ V, ONDER ERGUVEN G, TANYOL M, et al. Decolorization of Remazol Brilliant Violet 5R and Brilliant Green dyes by *Hypnum cupressiforme* using response surface methodology-central composite design methodology: toxicity assessment studies by *Daphnia magna*[J]. *Desalination and Water Treatment*, 2022, 278: 251-262. DOI:10.5004/dwt.2022.29082.
- [22] SI X S, LI J C, ZHAO T B, et al. Effective decolorization of poly- γ -glutamic acid fermentation broth by integrated activated carbon adsorption and isoelectric point precipitation of glutamic acid[J]. *Molecules*, 2024, 29(23): 5769. DOI:10.3390/molecules29235769.
- [23] HU M Z, YU J S, ZHANG H Q, et al. An efficient method for the recovery and separation of surfactin from fermentation broth by extraction-back extraction[J]. *Process Biochemistry*, 2022, 114: 59-65. DOI:10.1016/j.procbio.2022.01.014.
- [24] LE N T, HO H T T, DUONG T D, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and purification of flavonoids from *Sophora japonica* L. with macroporous resins[J]. *Separation Science and Technology*, 2024, 59(3): 419-435. DOI:10.1080/01496395.2024.2320714.
- [25] 顾康博, 管成, 许家慧, 等. 中试规模纯化海洋芽孢杆菌源脂肽类化合物[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(11): 1549-1563. DOI:10.13345/j.cjb.160126.
- [26] JIANG M X, PANG X Y, LIU H W, et al. Iturin A induces resistance and improves the quality and safety of harvested cherry tomato[J]. *Molecules*, 2021, 26(22): 6905. DOI:10.3390/molecules26226905.
- [27] JIANG J P, HAN M N, FU S Q, et al. Enhanced production of iturin A-2 generated from *Bacillus velezensis* T701 and the antitumor activity of iturin A-2 against human gastric carcinoma cells[J]. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2021, 28(1): 27. DOI:10.1007/s10989-021-10340-7.
- [28] LI Z M, BI X F, XIE X Y, et al. Preparation and characterization of iturin A/chitosan microcapsules and their application in post-harvest grape preservation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 275: 134086. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.134086.