

紫菜中类菌孢素氨基酸纯化工艺的优化及其抗紫外辐射作用研究

应 锐, 张朝辉, 段筱杉, 赵 雪, 侯 虎, 李八方

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266023)

摘要: 为了筛选纯化紫菜类菌孢素氨基酸(mycosporine-like amino acid, MAAs)的离子交换树脂, 优化纯化工艺, 并研究纯化后 MAAs 体外抗紫外辐射活性, 本研究通过静态动力学吸附及解析实验, 筛选纯化树脂; 结合动态动力学吸附及解析单因素实验建立响应面法对 SA-2 型阳离子树脂纯化 MAAs 的二次多项式模型, 对 MAAs 的纯化工艺进行优化; 通过建立大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的复合紫外线(UVA+UVB)损伤模型, 分析纯化后 MAAs 样品的体外抗辐射活性。结果表明: 静态动力学吸附及解析实验筛选出 SA-2 型阳离子树脂为纯化 MAAs 的最佳树脂, 吸附率和解析率分别为 86.01%和 56.63%; 吸附的最佳工艺条件为: 上样液质量浓度 3 g/L、上样流速 1 mL/min、上样液 pH 为 6、洗脱液体积分数为 3%、洗脱流速为 1.5 mL/min、洗脱液 pH 为 6; 在此条件下吸附率为 79.21%, 洗脱率为 64.02%; 纯化后的 MAAs 样品能有效抑制紫外辐射而造成的损伤, 将菌种失活速度分别降低了 39.10%和 40.58%, 表现出显著的抗紫外辐射活性。

关键词: 坛紫菜; 类菌孢素氨基酸; SA-2 树脂; 纯化; 响应面; 抗紫外辐射

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2017)02-0071-10

DOI: 10.11759/hyxx20160811002

类菌孢素氨基酸(Mycosporine-like amino acids, MAAs)是一类广泛存在于藻类、浮游植物及微生物中的多羟基酮类化合物, 这类物质以环己烯酮为基本骨架, 通过连接不同种类的氨基酸缩合而成。由于侧链上所连接的活性基团与共轭双键的作用, 使得类菌孢素氨基酸存在多种功能活性, 在 320~360 nm 波长处具有较强的紫外线吸收作用, 基于这类物质对保护生命材料具有潜在的应用价值, 近年来已引起人们的广泛关注^[1-4]。目前, 针对于这类物质的研究重点多聚焦于环境条件如温度、光照、盐度对藻类诱导产生并积累 MAAs 化合物的影响^[4]。许志恒等也先后就从紫菜、江蓠等天然海藻中提取的类菌孢素氨基酸化合物其结构组成及抗氧化活性进行研究^[5-8]。

但是, 针对于海藻中提取的 MAAs 生物活性的研究大多存在样品纯化工艺复杂、纯度较低等一系列问题。为进一步探究 MAAs 这类天然活性物质的药效成分、作用机理并实现将其应用于制药及化妆品工业中, 类菌孢素氨基酸纯化技术的改进与优化已成为需解决的首要问题^[8-9]。目前, 针对这类物质多采用层析(硅胶柱层析、凝胶柱层析、大孔树脂、离子

交换树脂层析等)等方法对其进行纯化分离^[10-11]。而大孔树脂、离子交换树脂由于具有吸附量大、吸附率强、解析率高、可重复利用等优点成为纯化使用的首选^[11]。

本文在此基础上, 选取类菌孢素氨基酸含量较高的经济型海藻坛紫菜为原料, 提取其中的 MAAs, 参考牛美英等提出的用阳离子交换树脂纯化类菌孢素氨基酸的方法^[7, 9], 选取 5 种纯化效果较好的离子交换树脂, 通过对比其吸附率及解析率, 选择最佳纯化树脂, 并结合单因素实验结果分别对其吸附率、解析率建立 Box-Behnken 响应面模型, 通过对比模型中各因素间交互关系, 优化纯化工艺^[12-13]。并探究纯化后的紫菜类菌孢素氨基酸抗紫外辐射活性。

收稿日期: 2016-08-11; 修回日期: 2016-11-26

基金项目: 国家自然科学基金(31272705); 海洋公益性行业科研专项(201505022-5)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.31272705; Public Science and Technology Research Funds projects of ocean, No.201505022-5]

作者简介: 应锐(1989-), 女, 研究生, 研究方向: 海洋活性物质, 电话: 18765998051, Email: yingruiouc@163.com; 张朝辉(1968-), 通信作者, 男, 副教授, 研究方向: 水产化学、海洋生物活性成分及水产品加工, Email: zhangzh@ouc.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)海南地区生产(购于青岛利群商厦); SA-2、001*7、201*7、D61、D152 型离子交换树脂(上海江莱生物科技有限公司); 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌(取自中国海洋大学微生物实验室); 无水乙醇、盐酸、氢氧化钠、氨水、Tris-HCl、氯化钠均为分析纯; 水为双蒸水。

1.2 仪器与设备

粉碎机(天津泰斯特有限公司); HH-S4 型恒温水浴锅(欧莱博科技有限公司); 搅拌器; 2-16 型低温高速离心机(Sigma); R1001 型旋转蒸发器(郑州长城仪器有限公司); PHS-3S 型 pH 计(雷磁-上海仪电科学仪器股份有限公司); UV-2802 型紫外可见分光光度计(Unico); BT100-2J 蠕动泵; $\Phi 10\text{ mm} \times 20\text{ cm}$ 玻璃层析柱(北京瑞达恒辉科技发展有限公司); SW-CJ-1FD 型超净工作台(南京贝登生物有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 MAAs 粗提液的制备

参考金宁宁等^[6]的提取方法, 对紫菜中类菌孢素氨基酸(MAAs)进行提取, 操作流程如下: 烘干紫菜→粉碎研磨过筛→40℃乙醇提取 2 h→超声波辅助提取 20 min→离心→减压蒸馏→醇沉→冷冻稳定→冷冻离心→减压蒸馏→真空冷冻干燥→冻干粗品→样品复溶→MAAs 粗提液。

1.3.2 标准曲线的绘制及粗提液质量浓度的选择

选取紫菜类菌孢素氨基酸主要组分 Porphyra-334 作为标准品。Porphyra-334 的摩尔吸光系数 $\epsilon_{334}=4.23 \times 10^4\text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{cm})$, 依据朗伯比尔定律^[14], 可计算得出标准溶液的浓度。应用 HPLC 法测定该组分在紫菜类菌孢素氨基酸中所占比例, 可计算求得类菌孢素氨基酸的浓度^[5], 采用 UV-HPLC 拟合法, 绘制标准曲线^[6-7]。得到曲线方程为: $Y = 20.889X + 0.00847$ ($R^2 = 0.99798$)。根据方程, 分别计算并配制不同质量浓度梯度的样品粗提液。

1.3.3 MAAs 纯化树脂的筛选

参考牛美英等^[9]对多酚类物质的纯化方法, 以静态动力学吸附实验为依据, 绘制动力学吸附及解析图, 并分别以不同型号的阳离子交换树脂对样品的吸附量、吸附率、解析量、解析率为指标, 筛选出效果最佳的树脂作为进一步纯化所使用的树脂。

1.3.4 纯化树脂的预处理

将筛选出的阳离子交换树脂加入约 4 倍体积的双蒸水浸泡 24 h 后, 洗涤处理。分别用 1 mol/L 的 HCl 动态洗涤 2 h, 用双蒸水冲洗至中性; 再用 1 mol/L 的 NaOH 动态洗涤 2 h, 用双蒸水冲洗至中性; 最后在使用树脂前用 1 mol/L 的 HCl 将阳离子交换树脂浸泡、动态洗涤 2 h, 使树脂转为酸性。

1.3.5 阳离子交换树脂纯化 MAAs 样品的单因素实验

1.3.5.1 动态动力学吸附条件优化

1) 样品质量浓度对吸附效果的影响

分别配制 0.5~5 g/L 的 MAAs 样品粗提液, 保持上样液 pH 为 6, 上样流速为 1 mL/min。计算不同质量浓度下样品的吸附率。

2) 上样液流速的吸附效果影响

配制 3 g/L 的 MAAs 样品粗提液, 调节 pH 为 6。分别以 0.5~3 mL/min 的上样流速上柱样品。实验过程中上样液每经过 0.5 倍树脂柱内装载体积(Bed Volume, BV)收集一次样品, 定量检测 MAAs 化合物含量, 从而计算吸附率。

3) 上样液 pH 对吸附率的影响

选取质量浓度为 3 g/L MAAs 粗提液, 分别调节上样液的 pH 值从 3 到 8, 以流速为 1 mL/min 的流速上柱, 通过计算流出液的浓度和体积, 计算吸附率。

1.3.5.2 动态动力学解析条件优化

1) 洗脱液的质量浓度对洗脱效果的影响

参考金宁宁等的纯化方法^[7], 选取 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 水溶液作为洗脱液, 分别配制体积分数为 1%~5% 的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 水溶液, 在固定洗脱液 pH 为 6, 洗脱流速为 1 mL/min, 洗脱体积为 6 BV 的条件下解析 MAAs 样品, 计算不同体积分数下洗脱液对洗脱率的影响。

2) 洗脱流速对洗脱效果的影响

在固定洗脱液体积分数为 3%、洗脱液 pH 为 6、洗脱体积为 6 BV 的情况下, 分别将洗脱液以洗脱流速为 0.5~3 mL/min 上柱洗脱, 通过计算洗脱液的浓度, 计算洗脱率。

3) 洗脱液 pH 对洗脱效果的影响

固定洗脱液体积分数为 3% 的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 水溶液作为洗脱液, 洗脱流速为 1.5 mL/min, 洗脱体积为 6 BV 的情况下, 调节洗脱液 pH 为 2~8 上柱洗脱, 通过计算洗脱液的浓度和体积, 计算洗脱率。

1.3.5.3 响应面实验优化 MAAs 样品纯化工艺

采用 Design-Expert8.0 软件设计 MAAs 样品纯化

的响应面实验,应用 Box-Behnken 分别建立 SA-2 型树脂在不同条件下对吸附率和解析率影响的实验模型^[15-16]。分别以样品的质量浓度、上样液流速、上样液 pH 值这三个因素为自变量,以上柱吸附率响应值的高低为因变量,分析各因素间的交互影响,优化吸附实验工艺。实验设计因素水平见表 1。再分别以洗脱液质量浓度、洗脱流速、洗脱液 pH 值这 3 个因素水平为自变量,以解析率响应值的高低为因变量,分析各因素间的交互作用,优化解析实验工艺。实验设计因素水平见表 2。分别根据吸附及解析实验响应面给出的最优工艺组合进行验证性实验,每组实验平行进行 3 次,取平均值进行比较。

表 1 吸附实验自变量因素编码及水平

Tab. 1 Codes and levels of the factors chosen for the adsorption experiments

因素	水平		
	-1	0	1
A 上样液质量浓度(g/L)	2	3	4
B 上样流速(mL/min)	0.5	1	1.5
C 上样液 pH	5	6	7

表 2 解析实验自变量因素编码及水平

Tab. 2 Codes and levels of the factors chosen for the desorption experiments

因素	水平		
	-1	0	1
A 洗脱液体积分数(%)	2	3	4
B 洗脱流速(mL/min)	0.5	1	1.5
C 洗脱液 pH	5	6	7

1.4 数据处理

实验采用 Design-Expert 8.0 设计实验模型,结合 SPSS17.0 软件对其数据进行统计学分析。

1.5 MAAs 抗紫外辐射实验

选取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌两种常用菌种,将菌种进行活化培养处理。实验前先进行预实验验证样品本身是否对其两种菌种正常生长有抑制作用,再测定样品体外抗辐射活性^[17-18]。将一定浓度的 MAAs 样品加入到已灭菌的生理盐水中,使用该生理盐水作为稀释液,稀释菌体浓度至 10^6 cfu/mL,空白对照组使用不加样品的生理盐水稀释菌体至相同浓度。吸取 10 mL 菌悬液在复合辐照光源下(UVA+UVB, 离光源 30 cm)分别照射 0 s、30 s、1 min、2 min、

5 min、10 min、20 min,完成菌悬液的紫外损伤造模。随后吸取菌悬液 20 μ L 涂布平板,经 37℃ 恒温培养 3 d 后,平板计数测定活菌数,以辐照时间为横坐标,活菌个数的对数值为纵坐标绘制菌种存活曲线图,从而比较 MAAs 样品体外抗紫外辐射效果。

2 结果与分析

2.1 静态动力学实验筛选离子树脂

图 1 为不同型号树脂静态吸附及解析效果图。由图可知,通过选取的 SA-2、001*7、201*7、D61、D152 5 种树脂的静态吸附及解析实验,综合比较吸附及解析效果,得到 SA-2 型阳离子树脂为样品 MAAs 纯化选用树脂。静态吸附量为 16.43 mg/g $\pm$ 0.32 mg/g、吸附率达 86.01% $\pm$ 3.04%;静态解析量为 9.06 mg/g $\pm$ 0.92mg/g、解析率为 56.63% $\pm$ 1.02%。吸附及解析作用较其他类型树脂效果更佳。

2.2 SA-2 型阳离子树脂动态动力学条件优化

2.2.1 动态吸附单因素优化实验

对 SA-2 型阳离子交换树脂层析纯化紫菜类菌孢素氨基酸进行动态单因素优化实验。在保持样品上样液体积为 3BV,上柱固定吸附时间为 4 h 的条件下,研究上样液质量浓度、上样流速、上样液 pH 各因素对吸附率的影响。

当样品上样液浓度达到 3 g/L 时,树脂达到最大吸附率,此后增大上样液浓度,吸附率不再增大并呈缓慢降低趋势(图 2)。在选择上样液流速在 0.5~3 mL/min 范围内,随上样液流速的增大,样品的吸附率呈明显的下降趋势(图 3)。调节上样液 pH 在 3~8 的范围内,随上样液 pH 的升高,吸附率呈先增加后降低趋势(图 4)。其中,上样液 pH 为 6 时,样品吸附率最高。这可能是因为 MAAs 样品本身是一种偏弱酸性的酚类,在弱酸性环境下易被吸附。

综合考虑,选择上样样品浓度为 3 g/L 的粗提液为响应面优化实验中心点,分别调节上样流速为 0.5、1、1.5 mL/min,调节上样液 pH 为 5、6、7 作为中心组合,进行响应面优化实验。

2.2.2 动态解析实验优化

选择 $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 溶液作为洗脱液,在保持洗脱液积为 6BV 的条件下,研究洗脱液质量浓度、洗脱流速、洗脱液 pH 各因素对洗脱率的影响。

在控制洗脱液质量浓度为 2%~4% 的浓度范围内,随洗脱液体积分数的增加,洗脱效果呈先增加后降

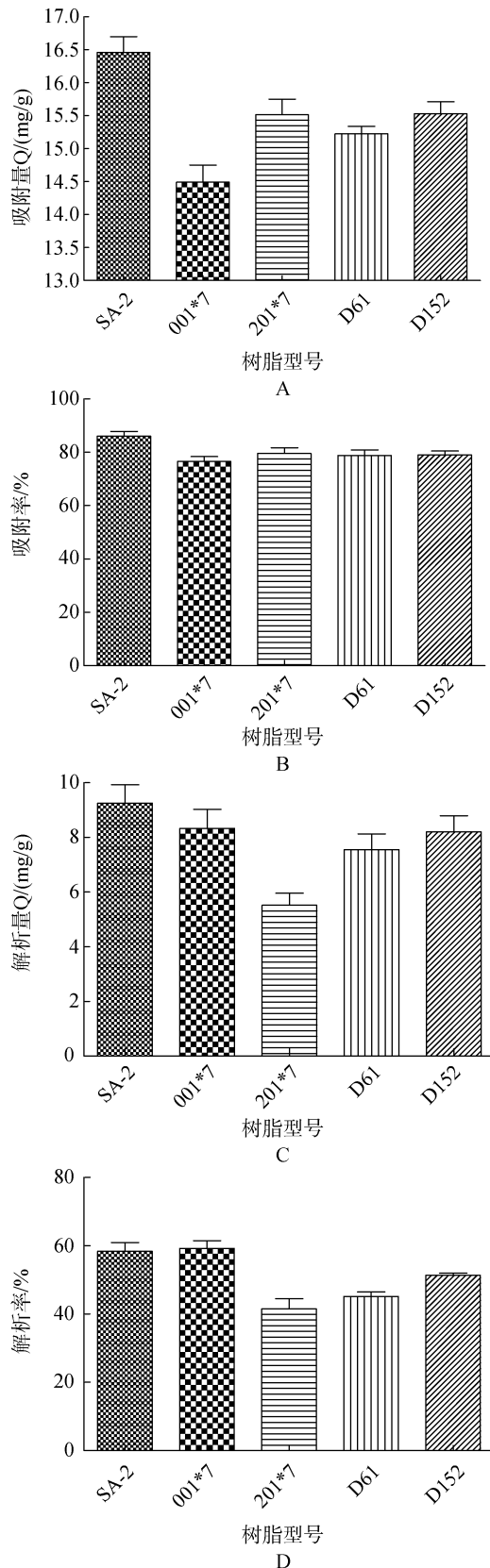


图 1 不同型号树脂静态吸附及解析

Fig. 1 Static adsorption and desorption kinetics curves for different resins

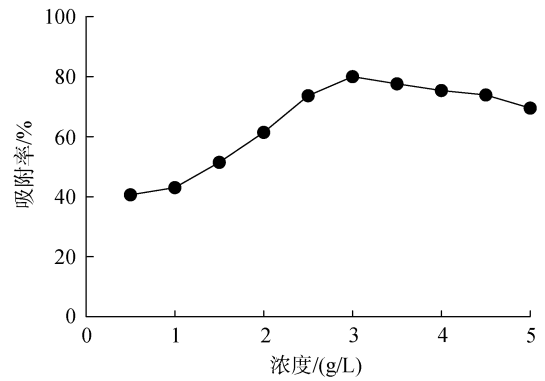


图 2 上样液质量浓度对吸附效果的影响

Fig. 2 Influence of the sample solution concentration on the absorption efficiency

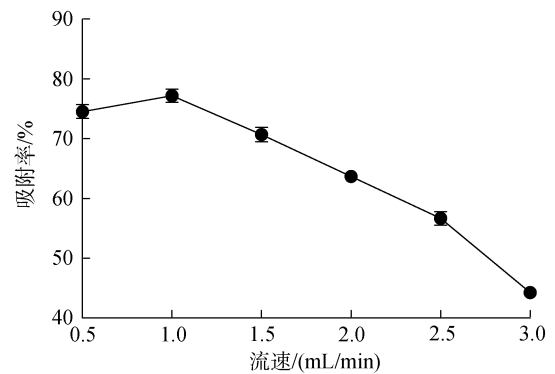


图 3 上样流速对吸附效果的影响

Fig. 3 Influence of the sample loading flow rate on the absorption efficiency

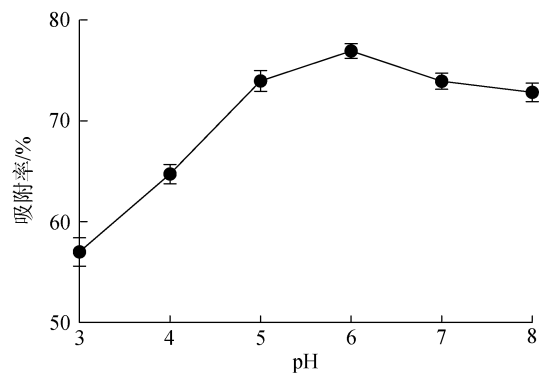


图 4 上样液 pH 值对吸附效果的影响

Fig. 4 Influence of the sample pH on the absorption efficiency

低趋势(图 5)。这可能是因为 MAAs 样品本身呈弱酸性, 易在弱酸性环境中与树脂结合吸附, 使用弱碱性的洗脱液易将其解析, 而随碱性增强, 解析下的 MAAs 样品在碱性环境中可发生部分降解^[7], 所以出现解析率下降的情况。在控制洗脱流速为 0.5~3 mL/min 的范围内, 随洗脱流速的增加, 样品的解析率呈明显的下降趋势(图 6)。调节洗脱液 pH 在 2~8 的范围

内,当洗脱液的 pH 增大时,洗脱率呈先增加后降低趋势(图 7)。

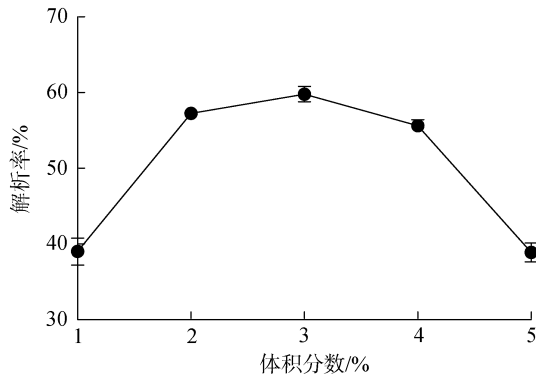


图 5 洗脱液体积分数对洗脱效果的影响

Fig. 5 Influence of the desorption concentration on the desorption efficiency

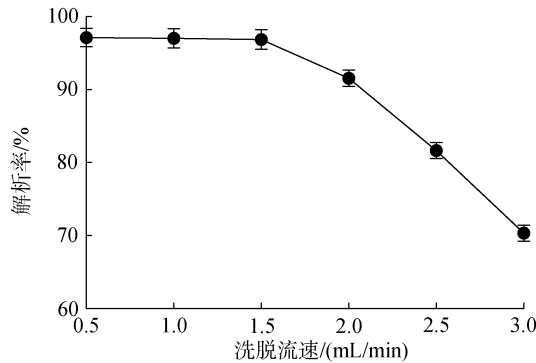


图 6 洗脱流速对洗脱效果的影响

Fig. 6 Influence of the desorption flow rate on the desorption efficiency

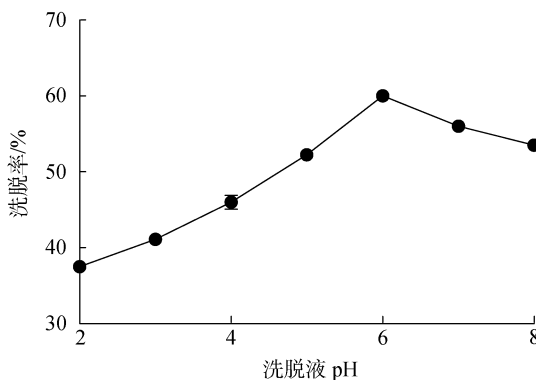


图 7 洗脱液 pH 对洗脱率的影响

Fig. 7 Influence of the sample pH on the desorption efficiency

综合考虑,选择洗脱液质量分数为 3%的洗脱液作为响应面实验中心点。保持洗脱液 pH 为 5、6、7,选择洗脱流速范围为 0.5~1.5 mL/min 作为中心组合,进行响应面实验优化实验。

2.2.3 动态吸附实验响应面模型的分析

在对 SA-2 型阳离子树脂纯化 MAAs 样品的单因素实验基础上,采用 Design-Expert 8.0 软件设计动态吸附优化实验,实验设计与结果见表 3。

表 3 SA-2 型阳离子树脂动态吸附优化实验设计与结果
Tab. 3 Experimental design and results for the dynamic absorption process of SA-2

实验号	A 上样液 质量浓度	B 上样 流速	C 上样 pH	吸附率 (%)
1	-1	-1	0	76.01
2	1	-1	0	76.20
3	-1	1	0	75.51
4	1	1	0	75.18
5	-1	0	-1	75.80
6	1	0	-1	74.59
7	0	0	1	70.56
8	0	0	1	71.15
9	0	-1	-1	76.80
10	0	1	-1	75.29
11	0	-1	1	70.10
12	0	1	1	71.38
13	0	0	0	78.78
14	0	0	0	78.44
15	0	0	0	78.51
16	0	0	0	78.85
17	0	0	0	79.21

对表 3 中 SA-2 树脂动态吸附响应面优化数据进行多元回归分析:得到关于 SA-2 型阳离子树脂对 MAAs 样品吸附率的二次多项式回归模型方程为:

$$Y(\%)=78.76-0.095A-0.22B-2.41C-0.13AB+0.45AC+0.70BC-1.70A^2-1.33B^2-4.03C^2$$

对动态吸附实验模型进行方差分析:分析结果见表 4,由表可知,模型 $F=104.78>F_{0.01}$,模型 $P<0.0001$,表明实验回归模型极显著; $F_{失拟}=2.49<F_{0.05}(9.3)$,失拟项 $P=0.1993>0.05$,表示模型的失拟度不显著,模型修正系数 $R^2_{Adj}=0.9832$,这说明有 98.32%的响应值能用该模型来解释,仅有 1.68%的变异无法解释此模型。模型的复相关数 $R^2=0.9926$ 这进一步说明模型拟合优度好。

对动态吸附实验建立回归模型并对其各因素的显著性进行检验,检验结果见表 5。由表可知,模型中一次项 BC ,二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 以及交互项 BC 对吸附率有极显著影响,其余各因素影响不显著

表 4 吸附实验回归模型方差分析

Tab. 4 Analyses of the variance of regression equation for the adsorption experiment

方差来源	自由度 <i>df</i>	平方和	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
模型	9	145.26	16.14	104.78	<0.0001	**
残差	7	1.08	0.15			
失拟	3	0.7	0.23	2.49	0.1993	
总和	16	146.34				

注: *差异显著, $P<0.05$; **差异极显著, $P<0.01$ 。下同

表 5 吸附试验回归模型各因素显著性检验

Tab. 5 Significance test of the regression coefficient for the adsorption experiment

因素	自由度 <i>df</i>	因素预测值	标准误差	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
截距	1	78.76	0.18			
<i>A</i> -上样质量浓度	1	-0.095	0.14	0.47	0.5156	
<i>B</i> -上样流速	1	-0.22	0.14	2.49	0.1589	
<i>C</i> -上样 pH	1	-2.41	0.14	301.95	<0.0001	**
<i>AB</i>	1	-0.13	0.2	0.44	0.5289	
<i>AC</i>	1	0.45	0.2	5.26	0.0556	
<i>BC</i>	1	0.7	0.2	12.63	0.0093	**
A^2	1	-1.7	0.19	79.02	<0.0001	**
B^2	1	-1.33	0.19	48.55	0.0002	**
C^2	1	-4.03	0.19	444.52	<0.0001	**

($P>0.05$)。根据模型数据分析可知,三因素对吸附率的影响因素顺序依次为: $C>B>A$, 吸附优化工艺为: 上样液质量浓度 3 g/L、上样流速为 1.5 mL/min、上样液 pH 为 6。此时, 吸附效率最佳, 吸附率达 79.21%。模型优化后回归方程为:

$$Y(\%) = -50.20800 + 4.26600A + 2.37450B + 43.68675C - 0.26000AB + 0.45000AC + 1.39500BC - 1.70025A^2 - 5.33100B^2 - 4.03275C^2$$

图 8 为上样流速与上样液 pH 两因素交互作用对吸附率影响的响应面及等高线图。由图可知, 曲面上上样液质量浓度一定的情况下, 对上样流速与上样液 pH 两因素对吸附率的影响, 两因素的作用因素极显著($P<0.01$)。在上样液 pH 一定的前提下, 上样流速在 0.5~1.5 mL/min 范围内变化时样品吸附率 Y 值随上样流速的增大呈增大趋势, 上样流速为 1.5 mL/min 时, 样品吸附率达到最大值; 当上样流速控制一定时, 随着上样液 pH 的增大, 样品吸附率响应值 Y 呈先增大后减小的趋势, 在 pH 为 5~7 范围内, 取得最大值。通过吸附模型方程的逆矩阵得到吸附率最大预测值为 78.76%, 在此条件下的最佳优化工艺为: 上样液质量为 3 g/L、上样流速为 1.5 mL/min、上样液 pH 为 6。使用该优化条件下做验证性实验, 得到

吸附率 79.21%±1.02%。而这与预测值仅相差了 0.45%, 据此说明该模型可信度高。

2.2.4 动态解析实验响应面模型的分析

在对 SA-2 型阳离子树脂纯化 MAAs 样品的单因素实验基础上, 采用 Design-Expert 8.0 软件设计解析响应面实验模型^[15]。综合考察各因素间的相互影响并优化纯化解析工艺。响应面实验设计与结果见表 6。

对表 6 中 SA-2 树脂动态解析响应面优化数据进行多元回归分析: 得到关于 SA-2 型阳离子树脂对 MAAs 样品吸附率的二次多项式回归模型方程为:

$$Y(\%) = 62.76 - 4.88A - 2.56B + 2.85C - 2.82AB + 0.32AC + 2.48BC - 12.21A^2 - 2.50B^2 - 5.87C^2$$

对动态解析实验模型进行方差分析: 分析结果见表 7, 由表可知, 模型 $F=25.12>F_{0.01}$, 模型 $P<0.0002$, 表明实验回归模型极显著; $F_{\text{失拟}}=2.69<F_{0.05}(9.3)$, 失拟项 $P=0.1818>0.05$, 表示模型的失拟度不显著。模型修正系数 $R^2_{\text{Adj}}=0.9322$, 这说明有 93.22% 的响应值能用该模型来解释, 仅有 6.78% 的变异无法解释此模型。模型的复相关数 $R^2=0.9703$, 这进一步说明模型拟合优度好。

表 8 为对解析模型进行的显著性检验, 实验结

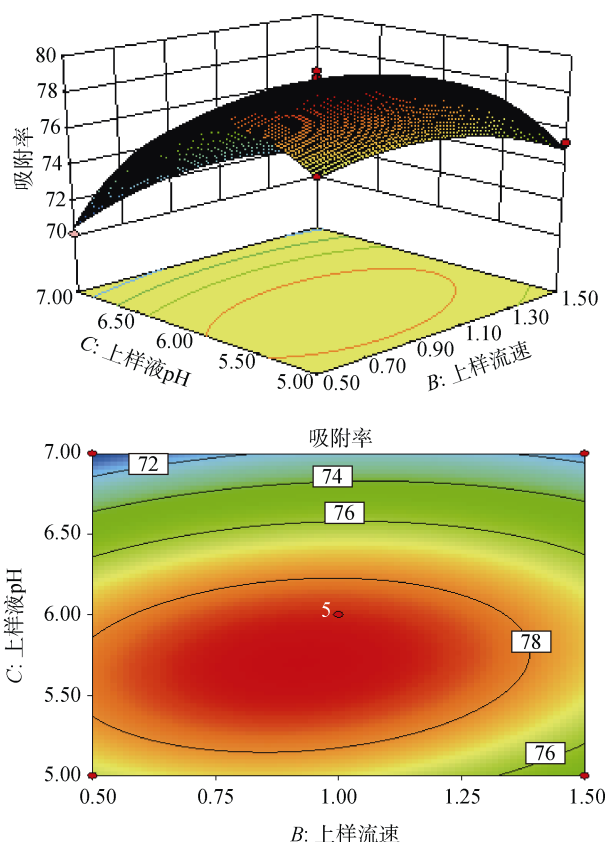


图 8 因素交互作用对吸附率影响的响应面及等高线图

Fig. 8 Response surface and contour plots for the interactive effects of factors on adsorption rates

表 6 SA-2 型阳离子树脂动态解析优化实验设计与结果

Tab. 6 Experimental design and results for the dynamic desorption process of SA-2

实验号	A 洗脱液体积分数 (%)	B 洗脱流速	C 洗脱液 pH	吸附率 (%)
1	-1	-1	0	56.01
2	1	-1	0	61.21
3	-1	1	0	36.83
4	1	1	0	64.02
5	-1	0	-1	61.45
6	1	0	-1	48.57
7	0	0	1	53.19
8	0	0	1	35.49
9	0	-1	-1	57.74
10	0	1	-1	61.93
11	0	-1	1	65.21
12	0	1	1	45.09
13	0	0	0	44.92
14	0	0	0	55.22
15	0	0	0	53.24
16	0	0	0	48.62
17	0	0	0	53.63

表 7 解析实验回归模型方差分析

Tab. 7 Analyses of variance of the regression equation for the desorption experiment

方差来源	自由度 <i>df</i>	平方和	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
模型	9	1233.26	135.92	25.45	<0.0002	**
残差	7	37.38	5.34			
失拟	3	24.98	8.33	2.69	0.1818	
总和	16	1260.65				

注: 复相关系数 $R^2=0.9703$; 模型修正系数 $R^2_{Adj}=0.9322$; 信噪比=14.739

果如表所示: 模型中一次项 C 、二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 以及交互项 BC 对解析率有极显著影响。其余项的影响均不显著。各因素对样品解析率的影响顺序为: 洗脱液 pH>洗脱液流速>洗脱液质量浓度。模型回归方程为:

$$Y\% = 62.76 - 2.41C + 0.7BC - 1.7A^2 - 1.33B^2 - 4.03C^2$$

图 9 为洗脱流速(B)和洗脱液 pH(C)对解析率影响交互作用的响应面图和等高线图, 实验结果如图 9 所示, 在洗脱液质量分数固定为 3% 不变的情况下, 洗脱流速在 0.5~1.5 mg/mL 时, 随着洗脱流速的增大, 洗脱液对样品 MAAs 的解析率呈下降趋势, 当洗脱流速保持不变时, 随着洗脱液 pH 的增大, 样品 MAAs 的解析率呈先增大后缓慢减小趋势。

采用 Design-Expert 8.0 软件计算模型方程的逆矩阵, 得到样品解析率的最大预测值为 65.21%, 此时最佳工艺条件为: 洗脱液体积分数为 3%, 洗脱流速为 1 g/L, 洗脱液 pH 为 7。选取该工艺条件进行验证性实验, 得到样品 MAAs 的解析率为 $64.02\% \pm 1.27\%$, 与预测值相比, 相对误差仅为 1.19%。说明该工艺条件下解析实验回归模型有效。

2.3 MAAs 化合物抗紫外辐射活性分析

实验选用大肠杆菌及金黄色葡萄球菌进行紫外辐照模型, 实验前首先对 MAAs 样品本身是否具有抑菌作用进行验证性实验, 实验结果见表 9。

由表 9 统计结果可知, 将 MAAs 样品加入到生理盐水中作为稀释液涂布大肠杆菌、金黄色葡萄球菌中, 培养 48 h 后计数活菌个数。与对照组相比活菌数无显著性差异($P>0.05$)。说明 MAAs 化合物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌本身均无显著抑制作用, 可进行后续实验。

图 10 为大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的存活曲线图。由图可知, 随着紫外辐照时间的延长, 大肠杆菌与金黄色葡萄球菌的存活率显著降低。而添加了一

表 8 解析试验回归模型各因素显著性检验

Tab. 8 Significance test of the regression coefficient for the desorption experiment

因素	自由度 <i>df</i>	因素预测值	标准误差	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
截距	1	62.76	1.03			
A-洗脱液体积分数	1	-0.095	0.14	0.47	0.5156	
B-洗脱流速	1	-0.22	0.14	2.49	0.1589	
C-洗脱液 pH	1	-2.41	0.14	301.95	<0.0001	**
AB	1	-0.13	0.2	0.44	0.5289	
AC	1	0.45	0.2	5.26	0.0556	
BC	1	0.7	0.2	12.63	0.0093	**
A ²	1	-1.7	0.19	79.02	<0.0001	**
B ²	1	-1.33	0.19	48.55	0.0002	**
C ²	1	-4.03	0.19	444.52	<0.0001	**

注: *差异显著, $P < 0.05$; **差异极显著, $P < 0.01$

表 9 MAAs 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌抑菌作用

Tab. 9 Bacteriostatic effect on *E.coli* and *S. Aureus* for MAAs

组别	每组平行板数 <i>n</i>	$\bar{X} \pm SD$	<i>P</i>	显著性
大肠杆菌(对照组)	6	317 ± 12		
大肠杆菌(样品组)	6	311 ± 21	>0.05	不显著
金黄色葡萄球菌(对照组)	6	297 ± 14		
金黄色葡萄球菌(样品组)	6	294 ± 17	>0.05	不显著

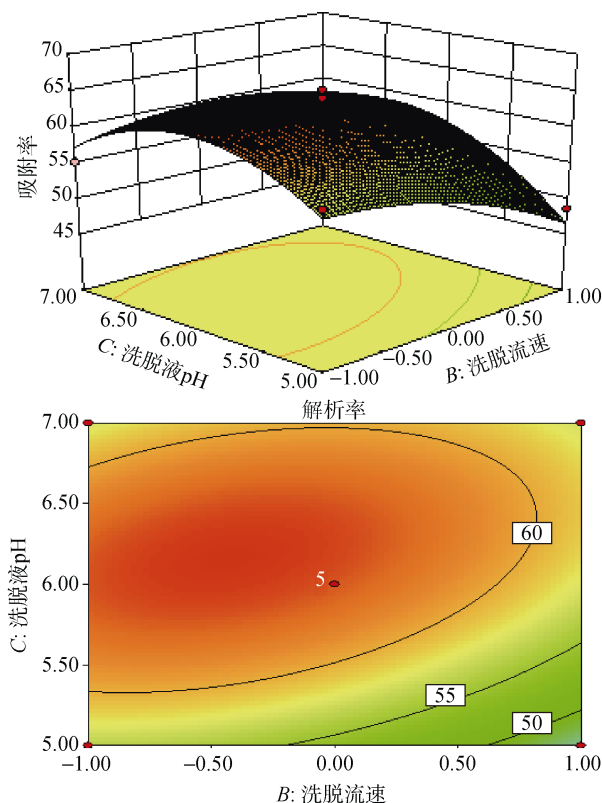
注: $P > 0.05$, 差异无显著性

图 9 因素交互作用对解析率影响的响应面图及等高线图

Fig. 9 Response surface and contour plots for the interactive effects of factors on the desorption rate

定浓度 MAAs 的样品组较空白对照组相比, 在相同辐照剂量的情况下, 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的存活率明显高于空白对照组。例如: 以辐照时间 10 min 为例, MAAs 样品组较空白对照组而言, 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌菌种存活率分别提高了 39.10%、40.58%。由此可知, 样品 MAAs 可以有效抑制紫外辐射而造成的损伤, 延缓菌种的失活速度。这可能是由于类菌孢素氨基酸这类物质在紫外中波长段 UVA (320~400 nm) 处及中波长段 UVB (275~320 nm) 处具有天然的紫外吸收作用, 从而有效的抵抗紫外线的辐射作用^[17-18]。这与叶翠芳等人研究的类孢菌素氨基酸具有抗紫外辐射活性作用结果相一致^[19-20]。

3 结论

(1) 本文通过静态动力学比较 5 种树脂的吸附率解析率, 筛选出 SA-2 型阳离子树脂作为纯化紫菜类菌孢素氨基酸 MAAs 的最佳树脂。

(2) 采用 Design Expert 8.0 软件设计了 SA-2 型阳离子树脂纯化 MAAs 的动态动力学吸附于解析工艺模型并优化了工艺条件, 对各因素间的交互影响作用建立二次多项式数学模型, 通过响应面和等高线交互分析确定: 各因素对吸附率的影响因素顺序

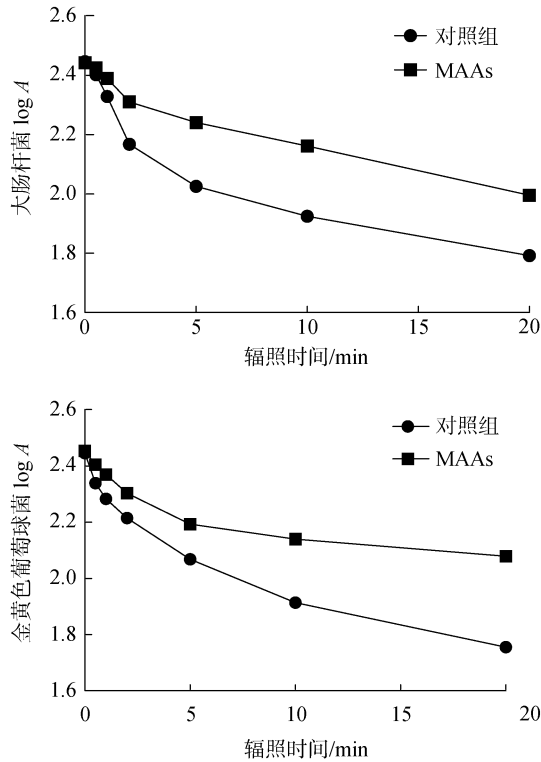


图 10 大肠杆菌与金黄色葡萄球菌存活曲线
Fig. 10 Survival rates of *E.coli* and *S.aureus*

为: 上样液 pH>上样流速>上样液质量浓度; 吸附的最佳工艺条件为: 上样液质量浓度为 3 g/L、上样流速为 1 mL/min、上样液 pH 为 6 的条件下吸附率达 79.21%。各因素对解析率的影响因素顺序为: 洗脱液 pH>洗脱流速>洗脱液体积分数; 解析最佳工艺条件为洗脱液体积分数为 3%的氨水、洗脱流速为 1.5 mL/min、洗脱液 pH 为 6, 在此条件下, 解析率可达 64.02%。

(3) 经 SA-2 树脂纯化后的 MAAs 样品用于大肠杆菌及金黄色葡萄球菌的体外抗紫外辐射实验, 对比在相同辐射剂量处理后菌种的存活率可知, 紫菜中 MAAs 化合物能有效缓解因紫外线造成的损伤, 具有显著的抵抗紫外辐射活性。

参考文献:

[1] Rastogi R P, Incharoensakdi A. UV radiation-induced biosynthesis, stability and antioxidant activity of mycosporine-like amino acids (MAAs) in a unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. CU2556[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2014, 130: 287-292.

[2] Ha S Y, La H S, Min J O, et al. Photoprotective function of mycosporine-like amino acids in a bipolar diatom (*Porosira glacialis*): evidence from ultraviolet radiation and stable isotope probing [J]. Diatom Research,

2014, 29(4): 399-409.

[3] Cui H X, Cheng F R, Xu D H, et al. The Optimization of the Extraction-Purification Process of the Total Anthocyanin from the Purple-Fleshed Sweet Potato[C]// Medicine and Biopharmaceutical: Proceedings of the 2015 International Conference. 2016: 963-971.

[4] Miyamoto K T, Komatsu M, Ikeda H. Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from Actinomycetales microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression[J]. Applied and environmental microbiology, 2014, 80(16): 5028-5036.

[5] 许志恒. 紫菜中抗紫外线活性物质的提取及其性质的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.

Xu Zhiheng. Extraction and characterization of anti-ultraviolet Substances from *Porphyra yezoensis* Abstract[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.

[6] 金宁宁, 张朝辉, 李八方, 等. 江蓠中类菌孢素氨基酸(MAAs)分离纯化及其成分分析[J]. 水产学报, 2011, 35(12): 1829-1836.

Jin Ningning, Zhang Zhaohui, Li Bafang, et al. Study on the isolation, purification and composition analysis of mycosporine-like amino acid(MAAs) in *Gracilaria changii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(12): 1829-1836.

[7] 金宁宁, 张朝辉, 李八方. 江蓠中类菌孢素氨基酸(MAAs)成分分析及提取研究[J]. 海洋科学, 2012, 36(3): 74-80.

Jin Ningning, Zhang Zhaohui, Li Bafang, et al. The constitutes and extraction analysis of mycosporine-like amino acid (MAAs) in the *Gracilariaceae*[J]. Marine Sciences, 2012, 36(3): 74-80.

[8] De la Coba F, Aguilera J, Figueroa F L, et al. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen[J]. Journal of Applied Phycology, 2009, 21(2): 161-169.

[9] 牛美英, 张朝辉, 高明, 等. 麒麟菜中类菌孢素氨基酸(MAAs)提取工艺的优化研究[J]. 农产品加工: 创新版 (中), 2014 (7): 42-45.

Niu Meiyong, Zhang Zhaohui, Gao Ming, et al. Optimization the extraction process of mycosporine amino acids from *Eucheuma*[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2014 (7): 42-45.

[10] Shrikhande A J, Race E J, Wightman J L D, et al. Process for extraction, purification and enrichment of polyphenolic substances from whole grapes, grape seeds and grape pomace: U.S. Patent 6, 544, 581[P]. 2003-4-8.

[11] Zhao P, Qi C, Wang G, et al. Enrichment and purification of total flavonoids from cortex juglandis mandshuricae extracts and their suppressive effect on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Mice[J]. Journal of Chromatography B, 2015, 1007: 8-17.

[12] Maran J P, Manikandan S. Response surface modeling and optimization of process parameters for aqueous extraction of pigments from prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit[J]. Dyes and Pigments, 2012, 95(3): 465-472.

- [13] 徐艳, 孙雪萍, 张秀国, 等. 响应面法优化香港巨牡蛎蛋白酶解工艺的研究[J]. 海洋科学, 2015, 39(3): 42-47.
Xu Yan, Sun Xueping, Zhang Xiuguo, et al. Improvement of *Crassostrea hongkongensis* hydrolysis by response surface methodology [J]. Marine Sciences, 2015, 39(3): 42-47.
- [14] 吴继明, 徐春芝, 潘宗岱, 等. 朗伯-比尔定律在生化分析仪中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(B12): 128.
Wu Jiming, Xu Chunzhi, Pan Zongdai, et al [J]. The application of Lambert beer's law in the biochemical analyzer[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2013, 34(B12): 128.
- [15] Silva E M, Rogez H, Larondelle Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology [J]. Separation and Purification Technology, 2007, 55(3): 381-387.
- [16] 周孙林, 陈华新, 姜鹏, 等. 响应面法优化重组大肠杆菌生物合成别藻蓝蛋白(holo-apcA)的发酵条件[J]. 海洋科学, 2015, 39(4): 56-63.
Zhou Sunlin, Chen Huaxin, Jiang Peng, et al. Optimization of fermentation conditions for production of Holo- α -allophycocyanin (holo-apcA) by recombinant *Escherichia coli* using response surface methodology[J]. Marine Sciences, 2015, 39(4): 56-63.
- [17] 郭赓艺. 粒毛盘菌 YM404 黑色素的纯化, 结构及抗紫外辐射活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013.
Guo Gengyi. Purification, structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum* YM404 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2013.
- [18] 王洪媛, 江晓路, 任虹, 等. 抗 UV-B 辐射菌紫外吸收代谢产物分析及其抗紫外辐射活性研究[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(4): 1-5.
Wang Hongyuan, Jiang Xiaolu, Ren Hong, et al. Analysis of the UV absorbing constituents of the metabolites from UV-B tolerance bacteria and study on its anti-ultraviolet mechanism[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2006, 25(4): 1-5.
- [19] 杜宁, 高天翔, 缪锦来, 等. 4 种南极冰藻中抗紫外辐射活性化合物类菌胞素类氨基酸(MAAs)的初步研究[J]. 中国海洋药物, 2007, 26(4): 5-10.
Du Ning, Gao Tianxiang, Liao Jinlai, et al. Preliminary study on the antiultraviolet irradiation active substances of mycosporine-like amino acids from four kinds of Antarctic ice microalgae[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2007, 26(4): 5-10.
- [20] 叶翠芳. 紫菜提取物及其抗紫外辐射活性的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2012.
Ye Cuifang. Studies on the anti-ultraviolet activity of Laver extracts[D]. 广州: 暨南大学, 2012.

Optimization of purification process of mycosporine-like amino acid from *Porphyra haitanensis* and study on its anti-ultraviolet activity

YING Rui, ZHANG Zhao-hui, DUAN Xiao-shan, ZHAO Xue, HOU Hu, LI Ba-fang
(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266023, China)

Received: Aug. 11, 2016

Key words: *Porphyra haitanensis*; mycosporine-like amino acids; SA-2 resin; purification; response surface; ultraviolet-resistant activity

Abstract:

Objective: To explore the optimal techniques in the separation of mycosporine-like amino acids (MAAs) in *Porphyra haitanensis* with cation-exchange resins and the study on its anti-ultraviolet activity after purification.

Method: In the screening cation-exchange resin through the static adsorption and desorption analytical experiment, response-surface methodology was employed to establish a mathematical regression model with the dynamic adsorption and desorption in the single-factor experiments for SA-2. The ultraviolet-radiation models (UVA and UVB) when compared with blank samples showed that the survival rates of the MAAs groups of *E. coli* and *S. aureus* increased; this proved that the MAAs after purification had certain anti-ultraviolet activity.

Result: SA-2 was found to be the most suitable resin for the mycosporine-like amino acid purification; the obtained adsorption and desorption rates were 86% and 56.63%, respectively. The optimum conditions for the purification were obtained when the sample containing 3 g/L MAAs at pH 6 was mounted onto a column at a flow rate of 1 mL/min; further, it was eluted with 3% ammonium hydroxide to pH 6 at a flow rate of 1.0 mL/min. The purification process yielded an adsorption and desorption rate of 79.21% and 64.02%, respectively. After the purification of MAAs sample, it had significant resistance to the ultraviolet radiation and the deactivation rate for *E. coli* and *S. aureus* decreased to 39.10% and 40.58%, respectively.

(本文编辑: 康亦兼)