

江蓠中类菌孢素氨基酸(MAAs)成分分析及提取研究

金宁宁, 张朝辉, 李八方

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 利用高效液相色谱技术对江蓠(Gracilariaceae)中类菌孢素氨基酸(MAAs)进行了分析, 并采用响应面分析法对 MAAs 物质的提取工艺进行优化研究。根据正交旋转组合试验设计原理, 采用四因素五水平的响应面分析法, 依据回归分析确定各因素的显著程度及最优工艺条件。结果表明, 江蓠中 MAAs 的主要成分为 porphyra-334; 提取温度、浸提时间、甲醇浓度及液固比为影响 MAAs 物质提取的显著因素。通过多元二次回归拟合模型响应面分析, 得到最优工艺条件: 提取温度 48.12℃, 液固比 34:1, 甲醇浓度 25%, 浸提时间 1.85 h, 优化条件下预测提取率为 4.943 mg/g; 试验值为 4.893 mg/g, 试验值与预测值吻合较好, 响应面回归模型的准确性得到验证。

关键词: 江蓠(Gracilariaceae); 类菌孢素氨基酸; 高效液相色谱; 响应面

中图分类号: Q311

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)03-0074-07

江蓠隶属于红藻门(Rhodovhyta)、真红藻纲(Florideae)、杉藻目(Gigartinales)、江蓠科(Gracilariaceae)^[1], 广泛分布在全世界的热带、亚热带和温带海区, 在我国主要是分布在南方的广东、海南等沿海地区。它是一种高膳食纤维, 高蛋白, 低脂肪, 低热能, 且富含矿物质, 微量元素和维生素的天然优质保健食品原料, 已在南方沿海地区实现了大范围的人工养殖。江蓠中含有的类菌孢素氨基酸(MAAs)是以环己烯酮为基本骨架, 与不同类型氨基酸通过胺缩合作用形成的一大类水溶性物质。由于共轭双键和不同侧链上活性基团的存在, 在 310~360 nm 的紫外光区具有强的吸收能力^[2], 可以作为紫外防护用品的原材料, 具有广阔的开发价值和应用空间。影响 MAAs 提取率的因素很多, 如提取温度、浸提时间、液固比及甲醇浓度等, 需要通过大量试验来得到最佳的提取工艺, 而目前仅有贺庆梅等^[3]利用正交试验方案对 MAAs 物质的提取工艺进行了优化, 利用响应面回归法(RSM)优化 MAAs 提取工艺的研究相对较少。

响应面回归法的原理就是利用一个多元二次回归方程拟合多因子试验中多个因子与试验结果之间的关系, 估计回归方程的系数, 通过对方程求极值的方法达到参数优化的目的。各因子与相应值之间的关系的显著性程度用方差分析来验证, 从而确定分析结果的可靠程度。

本文在江蓠中 MAAs 物质的提取过程中, 以研磨的江蓠为原料, 对江蓠中 MAAs 的成分进行了分析, 同时利用 MATLAB 软件将响应面回归分析法应用于 MAAs 物质的提取中, 研究了各种条件对提取结果的影响, 并对提取工艺进行了优化。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

江蓠(Gracilariaceae), 产于海南湛江沿海; 甲醇、乙酸等分析用试剂均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

仪器: 高速冷冻离心机: GL-20G- , 上海飞鸽科学仪器厂; 电子精密天平: AR2140 型, Ohaus Corp. Pine Brook, NJ, USA; 冷冻干燥机: ALPHA1-4LD Germany, 上海斯高勒生物科技有限公司; 水浴摇床: SHA-B 型, 常州国华电器有限公司; 旋转蒸发器: RE-52AA 型, 上海亚荣生化仪器厂; 紫外-可见光谱仪: Shimadzu UV-2550 Japan, 上海航欧机电设备有限公司; 高效液相色谱: Agilent 1100series, 美

收稿日期: 2011-03-16; 修回日期: 2011-07-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771674); 教育部重点项目(109099)

作者简介: 金宁宁(1986-), 女, 山东省德州人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物活性物质提取, 电话: 13864837680, E-mail: jinningning123@yahoo.com.cn; 张朝辉, 通信作者, 电话: 0532-82031936, E-mail: zhangzh@ouc.edu.cn

国安捷伦公司; 万能组织粉碎机: A11 德国 IKA, 上海万捷科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理

取贮藏在 4℃ 冰箱中的江蓠, 洗净、晾干、剪碎, 立即冻干 36 h, 取出后粉碎至 20 至 60 目。

1.2.2 提取步骤

在原料预处理完成后, 用 25% 甲醇在 45℃ 水浴浸提 2 h。冷却至常温, 8 000 r/min, 冷冻离心 3 次。上清液加无水乙醇调乙醇最终浓度为 80%, -20 条件下稳定 2 h, 使蛋白质、核酸及其他大分子变性沉淀。再以 10 000 r/min, 冷冻离心 15 min, 上清液 40 减压蒸干。超纯水复溶后过 C-18 Sep-Pak 柱以除去色素和悬浮脂质。最后在 -60 条件下冷冻干燥 36 h, 获得冻干粗品, 备用。

1.2.3 MAAs 成分分析方法

取冻干粗品复溶后过 0.22 μm 的无机滤膜, 分别进行高效液相色谱分析和紫外光谱扫描。高效液相色谱仪(HPLC): Agilent 1100series; 色谱柱: Zorbax SB-C18 柱(5μm packing; 250 mm×4 mm I.D); 检测器: 紫外检测器, 检测波长: 330 nm; 流动相: A 相: 色谱纯甲醇, B 相: 0.2% 乙酸溶液(1 : 9), 流速为 1.0 mL/min; 柱温: 25℃; 标准品按照文献[4-6]的方法来进行制备。

1.2.4 标准曲线的绘制

以 100% 甲醇溶液为对照, 将标准品的甲醇溶液进行梯度稀释, 依次标记为 1~5, 用紫外分光光度计在 334 nm 处测吸光值, 取紫外吸收位于 0.15 ~ 1.0 的值。根据 $A = bc$, 主要成分 porphyra-334 的为 $4.23 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, 分子质量为 346 g/mol^[7], 液层厚度为 1 cm, 得标准品的质量浓度为 $2.56 \times 10^{-3} \text{ g/L}$ 。取该浓度下的标准品, 溶于 10 mL 色谱甲醇中, 进行梯度稀释, 过膜处理后从低浓度到高浓度依次进行高效液相色谱分析, 取峰高响应值位于 50~300 mAU 的标准品, 在此浓度范围左右进行稀释, 以质量浓度为横坐标, 峰高响应值为纵坐标绘, 制标准曲线为: $y = 238.87x - 6.5621$, 线性度 R^2 为 0.995 2。

1.2.5 色谱图结果分析

图 1、图 2 分别为冻干粗品及标准品的高效液相色谱图, 由图中可以看出, 江蓠提取物的高效液相色谱图中含有 3 个保留时间分别为 4.447、7.524 和 10.673 min 的组分, 说明 MAAs 的甲醇提取物中在波

长 334 nm 处含有 3 种紫外吸收物质, 通过与图 2 porphyra-334 标准品色谱图的比较, 江蓠中保留时间为 7.524 min 的组分可以断定为 porphyra-334, 而且通过图 1 可以看出 porphyra-334 是江蓠中 MAAs 化合物的主要成分。其他两种组分含量相对较少。

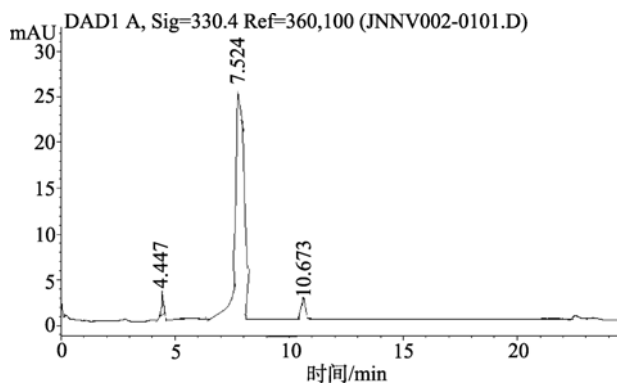


图 1 江蓠的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of extract from gracilaria chilensis

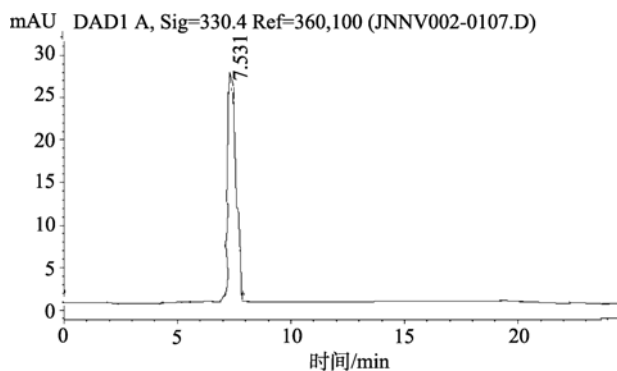


图 2 Poroehya-334 标准溶液的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of poroehya-334 standard

1.2.6 MAAs 主要成分 porphyra-334 提取率的测定

将冻干样品溶于一定体积色谱纯甲醇中进行高效液相色谱分析, 将提取样品特征峰高响应值与标准曲线对照, 计算出样品中 MAAs 化合物主要成分 porphyra-334 的提取率。其提取率的计算公式为:

$$\text{提取率} = \frac{\text{峰高响应值}y + 6.5621}{23887 \times 0.1} \times 0.1 \times 100 \quad (1)$$

由于其他两种 MAAs 组分的含量相对较少, 因此本文中的 MAAs 物质提取率指的是 porphyra-334 成分的提取率。

1.2.7 试验设计

根据文献[8]单因素试验结果, 选择甲醇法浸提江蓠中 MAAs。确定甲醇为最佳提取溶剂, 原料粒度为

60 目, 提取 2 次, 同时选取对提取率影响较大的浸提温度、液固比、甲醇浓度及浸提时间四个主要因素, 通

过四因素五水平正交旋转组合试验, 确定 MAAs 物质最佳提取工艺条件。其因素水平表见表 1。

表 1 试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of extraction test

水平	提取温度(°C)	液固比	甲醇浓度(%)	浸提时间(h)
-2	35	10 1	10	1
-1	40	20 1	15	1.5
0	45	30 1	20	2
1	50	40 1	25	2.5
2	55	50 1	30	3

1.2.8 统计分析

在 MATLAB 中编制程序对正交旋转试验数据进行多元二次回归方程^[9]拟合。其拟合方程形式为:

$$y = b_0 + \sum_{j=1}^m b_j x_{ij} + \sum_{k < j} b_{kj} x_{ik} x_{ij} + \sum_{j=1}^m b_{jj} x_j^2 \quad (2)$$

其中, y 表示响应值, b_0 为常数项, b_i 为线性系数, b_{ij} 为二次系数, b_{kj} 为交互作用系数, x 代表变量。方程(1)中系数的确定采用回馈消除回归分析法, 即由试验得到的响应值首先通过多元回归与影响因素相拟合。方程可用于反应条件的优化和响应值的预测。利用响应面法得到模型优化的工艺条件和预测值, 在优选的工艺条件下进行 MAAs 物质提取试验, 将试验所得结果与预测值相对照, 从而对模型的有效性进行验证。

2 结果与讨论

2.1 回归方程的建立及显著性分析

根据本文试验数据, 采用回馈回归分析法得到 MAAs 物质提取率的多元二次回归拟合方程为:

$$y = 4.7575 + 0.2165x_1 + 0.1117x_2 + 0.1655x_3 - 0.1697x_4 - 0.2691x_1^2 + 0.0294x_1x_2 + 0.0022x_1x_3 - 0.0875x_1x_4 - 0.1578x_2^2 + 0.0331x_2x_3 + 0.0299x_2x_4 - 0.1817x_3^3 + 0.0143x_3x_4 - 0.1294x_4^2$$

其中, x_1, x_2, x_3, x_4 分别代表提取温度(°C), 液固比, 甲醇浓度(%), 及浸提时间(h)对应的编码自变量。

根据正交旋转试验确定的因素和水平的实际设定值, MAAs 提取率试验值以及由拟合方程得来的预测值列于表 2。通过该表可以看出, 预测值与实际值绝对误差绝大部分都在 0.2 以内。预测精度相对来说较高。

回归方程中各变量对响应值影响的显著性由 F

检验来判定, P 值越小, 则相应变量的显著程度越高。由表 3 可以看出, 方程中 $X_1, X_4, X_3, X_1X_1, X_2X_2, X_3X_3$ 和 X_4X_4 项对响应值的影响较为显著, 综合来说一次项和二次项对响应值的影响最为显著, 交互项的影响相对较小。按照各因素的 F 值大小, 各因素对 MAAs 提取率影响的显著性从大到小依次为: 提取温度 > 浸提时间 > 甲醇浓度 > 液固比。试验因子对响应值不是简单的线性关系, 回归方程是高度显著的。同时失拟项也进一步表明回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系, 因此可以利用该回归方程确定最佳提取工艺条件。

根据回归分析结果, 利用 MATLAB 软件进行回归方程降维^[10]分析, 做出相应的响应曲面图及其等高线图, 以确认各因素对 MAAs 提取率的影响, 结果如图 3 所示。

响应面图形是响应值对各试验因子所构成的三维空间的曲面图, 从响应面分析图上可以形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用。根据回归方程得到不同因子的响应面分析图及相应等高线图。从响应面的最高点及等高线可以看出, 在所选范围内均存在极大值, 响应面的最高点处于椭圆中心处。由图可以看出各因素对 MAAs 提取率的影响, 曲线越陡峭, 则表明该因素对 MAAs 提取率的影响越大, 相应表现为响应值变化的大小。通过分析, 提取温度对 MAAs 提取率的影响最大, 浸提时间次之, 甲醇浓度和固液比的影响较小。这与上文中回归分析的结果是较为一致的。根据拟合好的多元二次回归方程, 求取 MAAs 提取率最大情况下对应的各因素水平值。经过计算, 其最优工艺条件为: 提取温度、液固比、甲醇浓度和浸提时间具体值分别为 48.12°C、34:1、25% 和 1.85 h。该条件下得到的最大提取率为 4.943 mg/g。

表 2 正交旋转组合试验结果及预测值

Tab. 2 The estimated and actual results of orthogonal rotation combination test

试验序列	提取温度(°C)	液固比 (X-1)	甲醇浓度 (%)	浸提时间 (h)	试验结果 (mg/g)	预测结果 (mg/g)	差值 (mg/g)
1	50(1)	40(1)	25(1)	2.5(1)	4.2287	4.3648	-0.1361
2	50(1)	40(1)	25(1)	1.5(-1)	4.6652	4.7909	-0.1257
3	50(1)	40(1)	15(-1)	2.5(1)	3.7315	3.9346	-0.2031
4	50(1)	40(1)	15(-1)	1.5(-1)	4.283	4.4178	-0.1348
5	50(1)	20(-1)	25(1)	2.5(1)	3.8181	3.9567	-0.1386
6	50(1)	20(-1)	25(1)	1.5(-1)	4.4403	4.5024	-0.0621
7	50(1)	20(-1)	15(-1)	2.5(1)	3.4991	3.6588	-0.1597
8	50(-1)	20(-1)	15(-1)	1.5(-1)	4.1181	4.2617	-0.1436
9	40(-1)	40(1)	25(1)	2.5(1)	3.9292	4.0436	-0.1144
10	40(-1)	40(1)	25(1)	1.5(-1)	4.0467	4.1197	-0.0730
11	40(-1)	40(1)	15(-1)	2.5(1)	3.4517	3.6222	-0.1705
12	40(-1)	40(1)	15(-1)	1.5(-1)	3.6361	3.7555	-0.1194
13	40(-1)	20(-1)	25(1)	2.5(1)	3.6551	3.7529	-0.0978
14	40(-1)	20(-1)	25(1)	1.5(-1)	3.8939	3.9487	-0.0548
15	40(-1)	20(-1)	15(-1)	2.5(1)	3.3316	3.4639	-0.1323
16	40(-1)	20(-1)	15(-1)	1.5(-1)	3.6203	3.7168	-0.0965
17	55(2)	30(0)	20(0)	2(0)	4.4207	4.1142	0.3065
18	35(-2)	30(0)	20(0)	2(0)	3.4321	3.2481	0.1840
19	45(0)	50(2)	20(0)	2(0)	4.6431	4.3499	0.2932
20	45(0)	10(-2)	20(0)	2(0)	4.1004	3.903	0.1974
21	45(0)	30(0)	30(2)	2(0)	4.5174	4.3615	0.1559
22	45(0)	30(0)	10(-2)	2(0)	4.0341	3.6994	0.3347
23	45(0)	30(0)	20(0)	3(2)	4.2312	3.9003	0.3309
24	45(0)	30(0)	20(0)	1(-2)	4.7389	4.5792	0.1597
25	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.7682	4.7575	0.0107
26	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.7858	4.7575	0.0283
27	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.7582	4.7575	0.0007
28	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.8013	4.7575	0.0438
29	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.8113	4.7575	0.0538
30	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.7432	4.7575	-0.0143
31	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.7882	4.7575	0.0307
32	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.7258	4.7575	-0.0317
33	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.7482	4.7575	-0.0093
34	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.7558	4.7575	-0.0017
35	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.6982	4.7575	-0.0593
36	45(0)	30(0)	20(0)	2(0)	4.7058	4.7575	-0.0517

注: 表中括号内数值为各因素水平编码值

表 3 方差分析表

Tab. 3 Variance analysis of regression equation

方差来源	离差平方和	自由度	均方差	F 值	P
X1	1.1252	1	1.1252	29.4517	<0.0001
X2	0.2995	1	0.2995	7.8391	0.0107
X3	0.6575	1	0.6575	17.2099	0.0005
X4	0.6916	1	0.6916	18.1014	0.0004
X1X1	2.3173	1	2.3173	60.6541	<0.0001
X1X2	0.0138	1	0.0138	0.3614	0.5542
X1X3	0.0001	1	0.0001	0.0021	0.9643
X1X4	0.1225	1	0.1225	3.2055	0.0878
X2X2	0.7964	1	0.7964	20.8468	0.0002
X2X3	0.0175	1	0.0175	0.4581	0.5059
X2X4	0.0143	1	0.0143	0.3750	0.5469
X3X3	1.0572	1	1.0572	27.6720	<0.0001
X3X4	0.0033	1	0.0033	0.0855	0.7729
X4X4	0.5361	1	0.5361	14.0331	0.0012
回归模型	7.6522	14	0.5466	14.3067	<0.0001
一次项	2.7737	4	0.6934	18.1505	<0.0001
二次项	4.7071	4	1.1768	30.8015	<0.0001
交互项	0.1714	4	0.0429	1.1219	0.3728
失拟项	0.0142	10	0.0014	0.0371	0.9665
纯误差	0.7881	11	0.0716	1.8754	
总误差	0.8023	21	0.0382		

2.2 模型验证

为了检验模型预测的准确性,按最佳提取条件提取,试验重复 3 次。3 次平行试验的 MAAs 提取率分别为 4.801, 4.923 和 4.957 mg/g, 平均提取率为 4.893 mg/g, 与理论预测值相比相对误差为 1.1%, 可见该模型能较好地模拟和预测江蓠中 MAAs 物质的提取率。

3 结论

(1) 利用正交旋转试验获得的数据, 采用响应面回归方法对 MAAs 提取率与各影响因素的关系进

行了拟合。结果表明, 拟合方程的一次项和二次项对于响应值的影响最为显著, 提取温度、浸提时间、甲醇浓度及液固比是影响 MAAs 提取率的显著因素。按照各因素 F 值的大小, 各因素对 MAAs 提取率的影响显著性从大到小依次为: 提取温度>浸提时间>甲醇浓度>液固比。

(2) 通过拟合模型响应面分析, 得到了最优工艺条件: 提取温度 48.12℃、液固比 34 : 1、甲醇浓度 25%和浸提时间 1.85 h。优化条件下预测提取率为 4.943 mg/g; 试验值为 4.893 mg/g, 试验值与预测值吻合较好, 响应面回归模型的有效性得到验证。

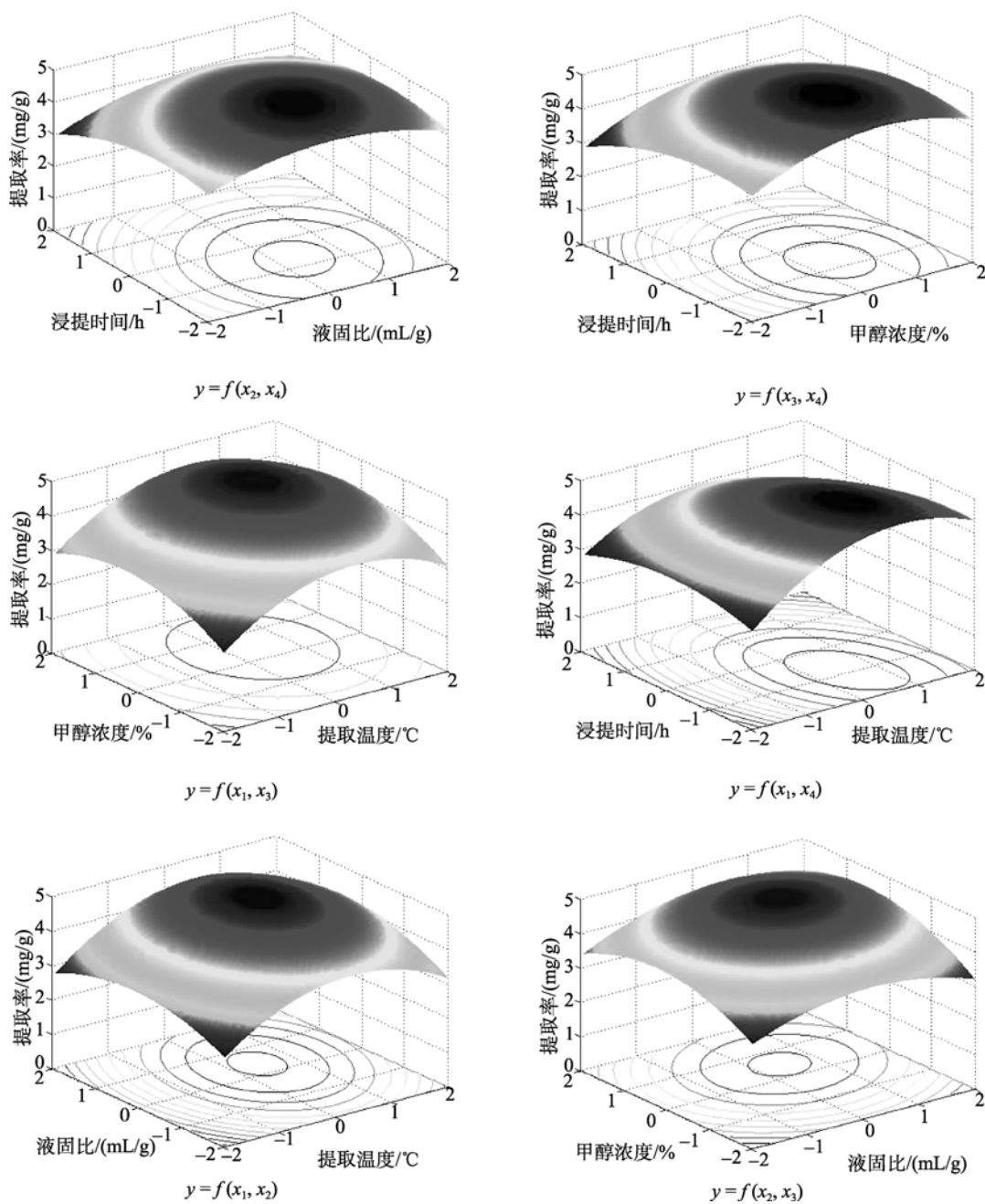


图3 $y=f(x_i, x_j)$ 响应面分析图

Fig. 3 Response surface plots of $y=f(x_i, x_j)$

参考文献:

- [1] 曾呈奎. 中国海藻志(第二卷)红藻门 第五册 伊谷藻目 杉藻目 红皮藻目[M]. 北京: 科技出版社, 2005.
- [2] Manfred Klisch, Rajeshwar P Sinha, Peter R Richter, Donat-P Häde. Mycosporine-like amino acids (MAAs) protect against UV-B-induced damage in Gyrodinium dorsum Kofoid[J]. *J Plant Physiol*, 2009, 158: 1449-1454.
- [3] 贺庆梅. 海藻中紫外线吸收物质的制备与特性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [4] Parthasarathy S, Santanam N, Ramachandran S, et al. Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal [J]. *J Lipid Res*, 1999, 40: 2143-2157.
- [5] Dunlap W C, Yamamoto Y. Small-molecule antioxi-

- dants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine[J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Molecular Biol*, 1995, 112(1): 105-114.
- [6] Carreto J I, Carignan M O, Daleo G. et al. Occurrence of mycosporine-like amino acids in red tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-protective compounds? [J]. *J Plankton Res*, 1990, 12: 909-921.
- [7] Groniger A, Sinha R P, Klisch M, et al. Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae—a database[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2000, 58: 115-122.
- [8] 许志恒. 紫菜中类菌孢素氨基酸 MAAs 的提取及其性质的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [9] 周品, 赵新芬. MATLAB 数理统计分析[M]. 北京: 国防工业出版社, 2009.
- [10] 于刚, 徐伟, 栾东磊, 等. 亚临界流体中酶催化制备富含多不饱和脂肪酸甘油酯[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2009, 39(2): 238-242.

The constitutes and extraction analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the Gracilariaceae

JIN Ning-ning, ZHANG Zhao-hui, LI Ba-fang

(Institute of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Mar., 16, 2011

Key words: Gracilariaceae; Mycosporine-like amino acids (MAAs); HPLC; response surface methodology

Abstract: The constitutes of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the Gracilariaceae were analyzed with HPLC, and the response surface method was used for modification of MAAs extraction. According to the theory of the orthogonal rotation combination experiment design, four factors and five levels of response surface was used to model the reaction. The factors' affection and the optimal reaction conditions were analyzed. The results showed that the main constituent of MAAs is porphyra-334. The extraction temperature and time, methanol concentration and the ratio of liquid to solid are the significant factors affecting the extraction of MAAs. A well-fitting quadratic polynomial regression model for the degree of MAAs was established after regression analysis with backward elimination and verified by a test. The optimal conditions are: the extraction temperature is 48.12°C; the extraction time is 1.85 h; the ratio of liquid to solid is 34:1 (mL:g), the methanol concentration is 25%. The estimated best MAAs extraction rate is 4.943 mg/g, and the actual extraction rate is 4.893 mg/g and they matches well with each other. Thereby the good accuracy of the response surface regression model has been verified.

(本文编辑: 康亦兼)