

利用反應曲面法探討龍鬚菜類蕈孢素胺基酸之較適萃取條件

洪郁嵐·黃培安*·朱永淳·吳純衡

行政院農業委員會水產試驗所水產加工組

摘要

類蕈孢素胺基酸 (Mycosporine-like amino acids, MAAs) 是海洋生物的胞內物質，具有吸收 UV 光的能力，藉以保護海洋生物避免受光傷害，然有關 MAAs 的萃取方式並無確切的溶劑、濃度、溫度及時間流程。在考量成本及安全性下，本研究使用乙醇作為萃取龍鬚菜 *Gracilaria tenuistipitata* MAAs 的溶劑。接續運用反應曲面法 (Response surface methodology) 探討以乙醇萃取龍鬚菜 *G. tenuistipitata* MAAs 之較適化萃取條件，在 3D 反應曲面圖中得知較適操作條件之交集：萃取溫度 (X₁) 63°C、萃取時間 (X₂) 165 min 及乙醇濃度 (X₃) 74.3% 為龍鬚菜 MAAs 的較佳萃取條件，所得粗萃物及 MAAs 萃取率分別為 4.1 mg/g 及 0.83 mg/g 乾藻。此外，龍鬚菜 MAAs 粗萃物能促進 HS68 纖維母細胞增生及對減緩 UV-B 照射所造成之細胞損傷，推測：龍鬚菜 MAAs 粗萃物具有開發作為天然防曬劑之可行性。

關鍵詞：龍鬚菜、類蕈孢素胺基酸、反應曲面法、防曬劑

前言

類蕈孢素胺基酸 (Mycosporine-like amino acids, MAAs) 是一群廣泛存在於水生生物內的特異化合物，在藍綠藻、紅藻、地衣、珊瑚礁、海綿、豐年蝦、海膽、海星、海鞘、魚類等生物體內均可發現。MAAs 屬於光保護物質，其抗氧化能力能保護生物不被太陽輻射所傷害，因此 MAAs 的組成及含量會依生物生長的環境不同而有所差異。例如生長在高山湖泊或南極海洋等太陽輻射較強的生物，其體內的 MAAs 含量相對較高 (Carreto and Carignan, 2011)。細菌、微藻、海藻可藉由莽草酸途徑 (Shikimate pathway) 自行合成 MAAs，然動物缺乏該途徑，只能藉由攝食的方式來獲取。研究指出，魚類、棘皮動物、軟體動物等海洋生物透過食物鏈來蓄積 MAAs，在魚類的表皮層和眼睛組織中都曾檢測出 MAAs，推測 MAAs 分佈於表皮和眼睛組織是因為其能吸收紫外線，讓組織免於傷害 (Shick *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 1998; Shick and

Dunlap, 2002)。截至目前為止科學家已經將 50 餘種的 MAAs 完成結構鑑定，其結構主要是以環己烯 (Cyclohexene) 為主，上接有酮基、乙醯基、胺基、胺基酸等不同官能基 (Korbee *et al.*, 2005)。

海藻主要分為紅藻、綠藻、褐藻及藍綠藻四大類，然並非所有海藻都能合成 MAAs；其中多數紅藻具有合成 MAAs 的能力，其次為褐藻，而僅有少數綠藻能合成 MAAs (Sinha *et al.*, 2007; Kräbs *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008; Cardozo *et al.*, 2011)，因此研究紅藻內的 MAAs 是目前主流。歸納 MAAs 的相關應用研究如下：學者以 20% 甲醇萃取而得的龍鬚菜 *Gracilaria cornea* MAAs 能夠吸收 Ultraviolet (UV) A 及 UVB，進而抵抗紫外線的傷害 (Sinha *et al.*, 2000)。而 MAAs 除了能吸收紫外線輻射，也可藉著促進纖維母細胞的增生，進而保護細胞減少紫外線對其所造成的損傷 (李, 2003; Oyamada *et al.*, 2008)。另，由長紫菜 *Porphyra rosengurtii* 分離萃取而得的 MAAs，其具有清除自由基的能力及減緩皮膚組織中抗氧化酵素的衰減程度，以減少因紫外線輻射產生的活性氧對生物體的影響 (Coba *et al.*, 2009)。而以水萃取而得的細翼枝菜 *Pterocladia capillacea* MAAs，經研究指出除了具有抗氧化能力之外，還具有抑制腦瘤

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號; TEL: (02) 2462-2101; FAX: (02) 2463-2677; E-mail: pahwang@mail.tfrin.gov.tw

細胞生長的作用 (孫, 2006)。從上述文獻可以得知 MAAs 具有良好的生理活性, 但是萃取方法迥異; 有鑑於龍鬚菜養殖技術在臺灣已相當成熟, 是一項可供產業應用的原料, 因此本研究擬以龍鬚菜為原料, 透過反應曲面法篩選出龍鬚菜 MAAs 的較適萃取條件, 期望藉此開創龍鬚菜的多元化應用, 進而提升海洋保健品的競爭力, 來開創新的研究及應用領域。

材料與方法

一、試驗材料

(一) 龍鬚菜

本試驗所使用之龍鬚菜 *G. tenuistipitata* 取自雲林縣口湖鄉養殖場, 採集後經自來水清洗、去除附著泥沙及螺類, 再以烘箱 50°C 乾燥, 後以粉碎機進行粉碎, 再經 0.5 mm 孔徑篩網篩選備用。

(二) MAAs 標準品

由於 MAAs 目前無市售標準品, 因此本研究係參考 Cardozo *et al.* (2011) 方法萃取標準品。取 10 g 的龍鬚菜, 置於液態氮中靜置隔夜, 然後加入 100 ml 20% 甲醇 (Methanol, MeOH) 於 4°C 萃取 24 h, 後以 10,000 rpm 離心 10 min 取其上清液, 再重複前述步驟兩次。上清液減壓濃縮後, 以氮氣吹乾甲醇後以 0.1% 甲酸 (Formic acid) 回溶, 後以 HPLC 進行測定。分析圖譜依照 Cardozo *et al.* (2011) 的結果, 對照其滯留時間 (retention time) 出現的順序, 以及對照 Nakamura *et al.* (1982)、Dunlap and Chalker (1986)、Shick *et al.* (1999)、Tartarott and Sommaruga (2002)、Carreto *et al.* (2005)、Karsten *et al.* (2009) 及 Cardozo *et al.* (2011) 的 HPLC 圖譜波峰。以 1.5 ml 試管每 10 s 收集沖提液, 將各試管再打回 HPLC 確認是否在同一滯留時間為同一波峰, 確認其是否為相同波峰之物質, 後將收集之純化物以氮氣吹乾作為標準品備用。

(三) 試藥

化學分析藥品購自 Sigma (St. Louis, USA), 細胞試驗藥品購自 GIBCO BRL (Grand Island, N. Y., USA)。

(四) 細胞株

本試驗所使用的 HS68 纖維母細胞, 購自新竹食品工業研究所菌種中心。

二、實驗方法

(一) MAAs 粗萃物製備

參考 Tartarotti and Sommaruga (2002) 方法, 秤取 10 g 龍鬚菜藻粉, 分別加入 100 ml 之 25% 甲醇及 25% 乙醇 (Ethanol, EtOH) 兩種溶劑在 45°C 下進行萃取, 萃取時間為 1、2.5 及 4 h。之後取出萃取液, 以 5,500 rpm 離心 10 min, 取上清液供後續純化試驗使用。

(二) 反應曲面法實驗設計

以乙醇為溶劑, 利用反應曲面法 (Box and Behnken, 1960; 黃等, 2002) 探討龍鬚菜 MAAs 較適萃取條件。以三變數統計分析方法進行, 控制變因為萃取溫度、時間及溶劑濃度, 以萃取液中龍鬚菜 MAAs 的量作為評估指標。彙整 Dunlap *et al.* (1989)、Carreto *et al.* (1990)、Shick *et al.* (1992)、Garcia-Pichel and Castenholz (1993)、Banaszak and Trench (1995)、Adams and Shick (1996) 及 Whitehead *et al.* (2001) 7 篇文獻的條件, 設定三個控制變因之操作範圍, 按比例換算獲得實驗操作條件。使用萃取溫度 (X_1)、萃取時間 (X_2) 及萃取溶劑濃度 (X_3) 等三個控制變因之組合, 依據 Lee *et al.* (2006) 之三個因子 (factor) 和五個變級 (level) 之二階次中心組合旋轉設計 (central composite rotatable second order design), 並以萃取液中龍鬚菜 MAAs 的量為反應性狀 (Y)。以龍鬚菜: 乙醇 = 1: 10 比例進行萃取, 其操作條件與層級設計如 Table 1 所示。

試驗共計 15 個條件、20 次操作, 包括 8 個角點條件、6 個軸點條件、1 個中心點條件 (重複 6 次)。由實驗條件變數因子 (X_i) 之試驗組合及反應性狀所得之結果, 以統計迴歸方法進行反應曲面分析, 求出三變數之二次多項方程式 (反應曲面方程式), 公式為: $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1 X_1 + \beta_{22} X_2 X_2 + \beta_{33} X_3 X_3$ 。其中 β_i 表示各項之係數, 再以套裝軟體 EXCEL 繪製反應曲面圖, 以找出較大龍鬚菜

MAAs 萃取量，得較適萃取條件。此後依反應曲面圖所得之較適萃取條件進行萃取，所得之粗萃物供後續細胞試驗。

Table 1 The independent variables and their levels of this experiment Independent variables

Independent variables	Symbol (Xi)	Coded	Levels
Extraction temperature (°C)	X ₁	1.68	Axial Point
		1	Corner point
		0	Center point
		-1	Corner point
		-1.68	Axial Point
		1.68	Axial Point
Extraction time (min)	X ₂	1	Corner point
		0	Center point
		-1	Corner point
		-1.68	Axial Point
		1.68	Axial Point
Solvent concentration (%)	X ₃	1	Corner point
		0	Center point
		-1	Corner point
		-1.68	Axial Point
		1.68	Axial Point

(三) 純化流程

參考 Sinha *et al.* (2000) 方法，將粗萃液以 6 µm 濾紙進行過濾，後以 10,000 g 離心 10 min。將上清液以濃縮機 (BUCHI, Rotavapor R-114) 濃縮至乾後，分別加入 10 ml 95% 萃取溶劑進行溶解，後以 18,000 g 離心 10 min，再次將上清液濃縮至乾，以 2 ml 0.2% 醋酸 (Acetic acid) 進行溶解，後以 0.45 µm 濾膜過濾後，即為純化之 MAAs。後分別應用分光光度計 (spectrophotometer) 及高效能液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 對龍鬚菜 MAAs 進行組成分析。

(四) 分光圖譜分析

參考 Conde *et al.* (2000) 方法，取 0.1 ml 純化物稀釋至 1 ml，置於分光光度計中進行 200 ~ 700 nm (間隔為 1 nm) 全波長圖譜掃描，觀

察 310 ~ 360 nm 之吸收波峰的變化。以 1 ml 的水作為空白組進行歸零。

(五) 高效能液相層析分析

參考 Nakamura *et al.* (1982)、Dunlap and Chalker (1986)、Shick *et al.* (1999)、Tartarott and Sommaruga (2002)、Carreto *et al.* (2005)、Karsten *et al.* (2009) 及 Cardozo *et al.* (2011) 的方法，將上述純化物以 2 ml 0.2% 醋酸溶解，再以 0.2 µm 濾膜過濾後進行 HPLC 分析。HPLC 系統 (Pu-2089 plus, JASCO Corp., Japan) 中，固定相為 LiCrospher RP 18 管柱 (5 µm packing; 250×4 mm I.D.)，移動相甲醇：乙腈 (Acetonitrile) = 75% : 25% (含 0.1% 醋酸)，流速為 0.8 ml/min，配合紫外線偵檢器 (UV-2075 plus, JASCO Corp., Japan)，管柱溫度設定 30°C，樣品注入量為 20 µl，在 330 nm 波長下進行分析。依波峰滯留時間比對標準品與純化物，以辨別其組成份，並依其波峰面積做為定量分析。

(六) 細胞培養及存活率分析

1. HS68 纖維母細胞

細胞以 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 培養液外加 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 於 37°C、5% CO₂ 下進行培養，當細胞長滿為單層時即可進行繼代培養。在無菌操作台內，以抽氣機吸去上層液，再以 10 ml 磷酸緩衝溶液 (Phosphate buffer saline, PBS) 沖洗細胞 3 次，吸去 PBS 並加 1 ml 胰蛋白酶 (Trypsin)，前後左右搖晃使胰蛋白酶均勻分散於細胞層，同時吸走部分胰蛋白酶，並置於培養箱中約 5 min 後，加入 1 ml FBS 以 10 ml PBS 吸放多次以沖散細胞，移至離心管離心後將細胞與培養基培養，約 2~3 天細胞長滿，即可再行繼代培養。

2. 細胞存活率試驗

參照 Ferrari *et al.* (1990) 方法測定。將細胞離心收集後調整為 4 × 10⁴ cells/ml，以 100 µl/well 加入 96 well 培養盤中，經培養 24 h 後吸除上層液，添加不同濃度樣品，控制組則不添加樣品。接續培養 24 h 後吸去培養液，於各 well 加入 100 µl 含有 1 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 的PBS，置於 37°C 反應 4 h，將上層液吸去加入 100 μ l Dimethyl sulfoxide (DMSO) 使細胞破裂，釋放出 Formazan 結晶，於 570 nm 測定吸光值。

細胞存活率 (Cell viability) (%) = [(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / 控制組吸光值] \times 100%。以培養液取代樣品作為控制組，視為 100%，另空白組為不含細胞及樣品之培養液。

3. HS68 纖維母細胞之抗 UV 損傷分析

參照 Torita *et al.* (2004) 方法測定。細胞離心收集後調整為 4×10^4 cell/ml，以 100 μ l/well 加入 96 well 培養盤中，並加入 100 μ l 不同濃度的樣品於 96 well 培養盤中培養 24 h，爾後以 UVB (0.8 J/cm²) 照射 15 min，再置於 37°C、5% CO₂ 培養箱培養 24 h 後，進行細胞存活率分析。細胞存活率 (%) = [(樣品組吸光值 - 空白組吸光值) / 控制組吸光值] \times 100%。本試驗以培養液取代樣品、不照射 UVB 作為控制組並視為 100%，空白組為不含細胞及樣品之培養液。

(七) 統計分析

實驗結果是以 Statistical product & service solutions (SPSS) 統計軟體進行分析，統計上之顯著差異性以一維變方分析 (One-way ANOVA) 進行分析，繼之以多重比較測試 (Multiple comparison method)，即 Dunnett's Test 進行事後比較，而當 $P < 0.05$ 時表示具有統計上的顯著差異性。

結果與討論

一、甲醇及乙醇對 MAAs 收率之影響

Tartarotti and Sommaruga (2002) 針對甲醇濃度、萃取溫度及時間三項變因，進行紫菜 (*Porphyra* sp.) MAAs 的萃取率比較探討，結果得知以 25% 甲醇為溶劑，在 45°C 下萃取 2 h，可得較佳的萃取率。Sinha *et al.* (2000) 以 20% 甲醇萃取而得的龍鬚菜 *G. cornea* MAAs 具有高安定性。另，Carreto *et al.* (2005) 提到在萃取 MAAs 前，若先以超音波破碎處理紫菜，再以 100% 甲醇進行

萃取，則能顯著提升 MAAs 的萃取量。從上述文獻可以得知，萃取 MAAs 主要以甲醇為溶劑，然本研究為考量產物可能應用在保健或保養品上，必須排除甲醇殘留的疑慮，因此取甲醇、乙醇兩種溶劑進行萃取率比較，以瞭解乙醇取代甲醇之可行性。參照 Tartarotti and Sommaruga (2002) 的方法以 25% 甲醇及 25% 乙醇兩種溶劑在 45°C 下進行萃取，萃取時間為 1、2.5 及 4 h。

MAAs 對紫外線具有很高的吸收作用，是因為其結構以環狀化合物為主體，MAAs 能利用苯環上共軛電子對共振，將接受到的紫外線輻射轉成熟能而不會直接傷害生物體，且其在生物體內的濃度與外部環境的紫外線強度呈現高度正相關性 (Figuerola *et al.*, 2003; Yakovleva *et al.*, 2004)。其中對 UVA 吸收力強的 MAAs，其主要吸收波長在 340 nm (Kräbs *et al.*, 2004)，對 UVB 吸收力強的 MAAs 主要吸收波長在 310 nm (Portwich and Garcia-Pichel, 2000)。另，Sinha *et al.* (2000) 所萃取的 MAAs 的最大吸收波峰是介於 310 ~ 365 nm 之間；Conde *et al.* (2000) 研究也指出 MAAs 的最大吸收波長位於 310 ~ 360 nm 之間。故本研究先以分光圖譜分析來對 MAAs 作定性分析，而後再以收率量多寡來評斷較適萃取溶劑。首先將 MAAs 標準品以分光光度計進行 200 ~ 700 nm 全波長圖譜掃描，其最大吸收波長位於 310 ~ 360 nm (紫外線區域) 之間 (data not shown)。後將甲醇及乙醇 MAAs 進行全波長圖譜掃描，結果顯示：甲醇及乙醇 MAAs 均在 310 ~ 360 nm 有一明顯的吸收波峰 (Fig. 1)，此結果與 Rastogi and Incharoensakdi (2014a) 的結果相近。進而分析甲醇及乙醇 MAAs 之萃取率，得知隨著萃取時間愈長萃取率愈高，然兩者之間並無顯著差異，在 4 h 時其萃取率分別為 0.32 mg/g 及 0.38 mg/g (Fig. 2)。Cardozo *et al.* (2011) 指出以乙醇萃取龍鬚菜 *G. birdiae* 與 *G. domingensis* 所得粗萃物產率分別為 2.7% 與 2.9%，經換算其乾物重 MAAs 萃取率分別為 0.41 mg/g 與 0.44 mg/g，其結果與本試驗結果相近。Sinha *et al.* (2000) 透過增加紫外線強度及延長照射時間，來增加龍鬚菜 *G. lemaneiformis* MAAs 含量，推測未來在選取龍鬚菜來源時，可優先考量日照充足的地區。從上述實驗結果可知以乙醇為溶劑可有效萃取出 MAAs，且萃取率與使用甲醇相比無差異，在考量實用性與安全性下，本研究使用乙醇為萃取溶劑。

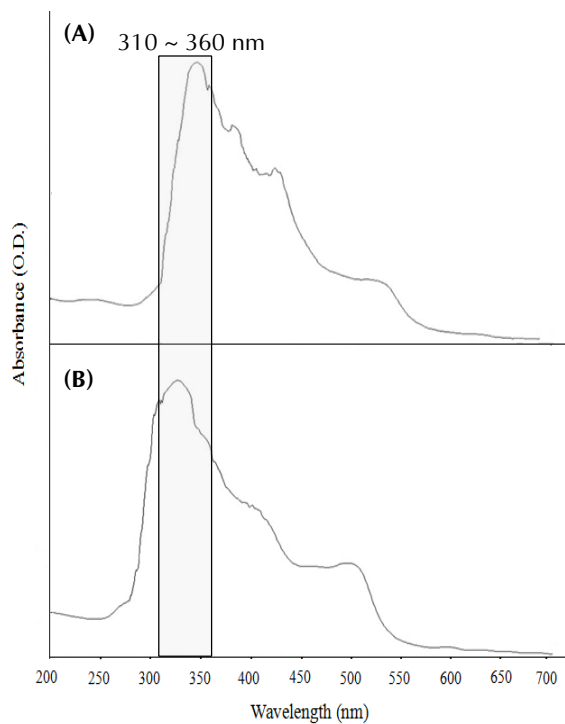


Fig. 1 Absorption spectra of the MAAAs from *Gracilaria tenuistipitata* extracted with (A) methanol and (B) ethanol solvents. *Conde *et al.* (2000) demonstrated MAAAs with maximum absorption ranging from 310~360 nm.

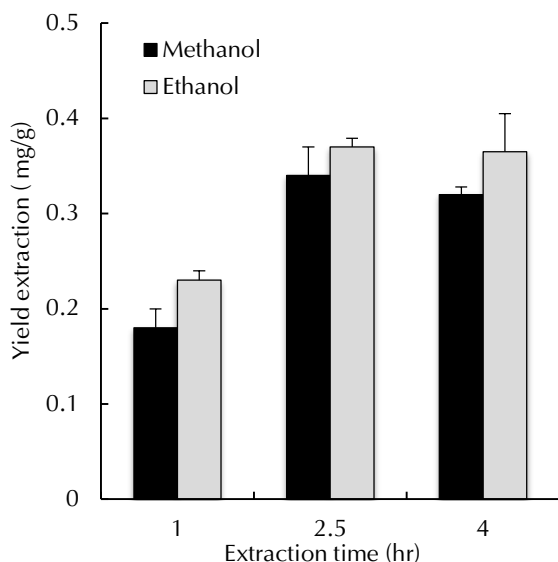


Fig. 2 Effects of different solvents on the extract yields of the MAAAs from *Gracilaria tenuistipitata* with various extraction times. Results were expressed as mean \pm SD. No significant different between the groups, $p > 0.05$.

二、乙醇 MAAAs 萃取物之組成分析

MAAAs 的最大吸收波峰多落在 310~360 nm 之間 (Conde *et al.*, 2000)，由紫外線吸收圖譜無法判斷 MAAAs 是由哪幾種化合物所組成，因此需要使用 HPLC 作進一步的分析。目前約有 20 餘種的 MAAAs 結構被鑑定出來 (Callone *et al.*, 2006)，而海藻中的 MAAAs 主要是由 Mycosporine-glycine、Mycosporine-2-glycine、Shinorine 及 Porphyrin-334 合成或轉換而來 (Callone *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010)。由於 MAAAs 目前無市售標準品，因此學者多依照文獻方法萃取 MAAAs 作為標準品，故本研究參考 Cardozo *et al.* (2011) 萃取龍鬚菜 *G. tenuistipitata* MAAAs 的方法來進行標準品製備。有關 MAAAs 的 HPLC 分析法亦有多篇文獻探討：Nakamura *et al.* (1982) 選用逆相低矽醇基 (Low silanol-free group) 的正十八烷 二氧化矽 (Octadecylsilica, ODS; C18) 管柱作為固定相，以 0.02% 醋酸溶液作為移動相，並於低溫 15°C 下進行分析；而 Dunlap and Chalker (1986) 以單體單元聚矽氧化合物 (Monomeric octyl silica; C8) 管柱作為固定相，以 10% 甲醇 (添加 0.1% 醋酸溶液) 作為移動相進行分析。綜合以上結論可知，在弱酸的环境下可成功分析 MAAAs 組成。

另，Stochaj *et al.* (1994) 指出，若將移動相的甲醇濃度提升至 75% 可更有效的分析酸性 MAAAs。Carreto *et al.* (2001) 使用含有乙腈的移動相並搭配 C18 管柱進行分析，可同時分析酸性與中性 MAAAs。綜合上述文獻及測試分析，我們將龍鬚菜 MAAAs 的 HPLC 分析法設定為：固定相 LiCrospher RP 18 管柱 (5 μ m packing; 250 \times 4 mm I.D.)；移動相甲醇：乙腈 = 75%：25% (含 0.1% 醋酸)，流速為 0.8 ml/min，以 330 nm 之吸光值作為判定標準。Fig. 3 為 MAAAs 標準品及萃取自龍鬚菜 *G. tenuistipitata* 中之乙醇 MAAAs 的 HPLC 結果，對照波峰滯留時間可以得知：乙醇 MAAAs 有 5 個波峰與標準品滯留時間吻合，分別為：Shinorine (8.05 min)、Palythine (9.34 min)、Asterina-330 (10.60 min)、Prophyra-334 (11.12 min) 及 Palythanol (14.44 min) 組成。而圖中的 16.60 min 未知波峰推測為藻體中其他胜肽或多醣類 (Klisch and Häder, 2008)。

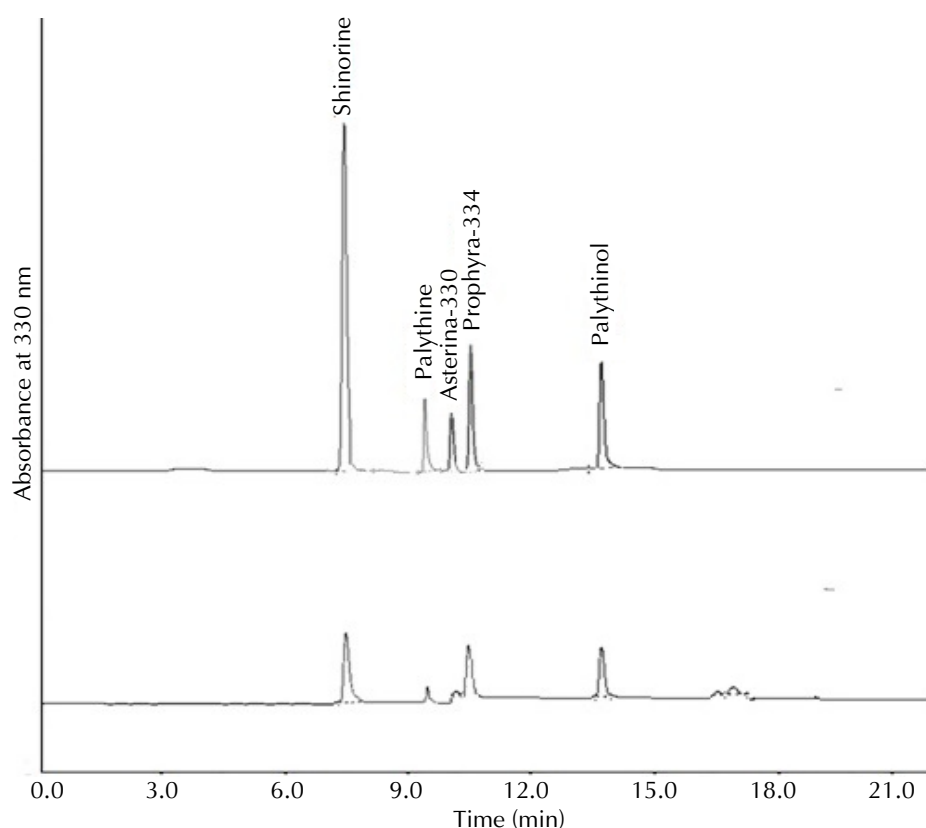


Fig. 3 High performance liquid chromatographs of (A) MAA standards isolated from *Gracilaria tenuistipitata* and (B) MAAs extracted from *G. tenuistipitata* using 25% ethanol at 45°C for 4 h.

三、較適萃取條件之選定與評估

Tartarott and Sommaruga (2002) 探討紫菜、浮游藻及浮游動物 MAAs 的較適萃取條件，發現：紫菜在 25% 甲醇、45°C、2 h 下萃取率較佳；浮游藻在 25% 甲醇、45°C、2 h 或是 25% 甲醇、4°C、24 h 下萃取率相近且佳；而浮游動物不論在 25 ~ 100% 甲醇、4 ~ 45°C、2 ~ 24 h 其萃取率均無顯著差異。Sommaruga and Garcia-Pichel (1999) 則提到提升溫度有助於縮短萃取浮游藻 MAAs 的時間，但李 (2003) 指出以 80% 甲醇低溫萃取細翼枝藻 (*Pterocladia capillacea*) MAAs 其效果優於高溫，因此可以得知其萃取最佳條件並非絕對。從上述文獻我們推論：MAAs 的萃取條件會因原料物種不同而有所差異，儘管同為大型紅藻其萃取方式也大有不同，因此難以從文獻中推估其萃取條件。雖然 MAAs 的萃取方法雖迥異，但主要可以歸納出使用 20 ~ 100% 甲醇或 50 ~ 80% 乙醇進行萃取，溫度範圍介於 -20 ~ 50°C，時間範圍介於 20 min ~

3 days。本研究為建立具產業化之萃取技術，將實驗條件設定如下：溫度 30 ~ 100°C、時間 60 ~ 240 min 及乙醇濃度為 60 ~ 100%，選用三個因子和五個變級的反應曲面設計，可得 15 個萃取條件，其中萃取溫度 65°C、萃取時間 150 min、乙醇濃度 80% 之條件進行 6 重覆，故有 20 個條件進行測試。並以 HPLC 分析其萃取物於 330 nm 之波峰積分面積 (Y) 作為 MAAs 萃取量指標，以探討其較適萃取條件。在 HPLC 圖譜中，選取 Shinorine、Palythine、Asterina-330、Propyrya-334 及 Palythinol 的波峰來進行總積分面積計算，Table 2 為實驗操作參數與相對應之龍鬚菜 MAAs 總積分面積結果。將實驗結果以統計迴歸方法進行反應曲面法分析，依萃取溫度 (X_1)、萃取時間 (X_2) 及萃取溶劑比例 (X_3) 求出反應曲面方程式如下，並以此反應曲面方程式繪製反應曲面圖及等高線圖，萃取溫度、萃取時間及萃取溶劑比例三變因之相互關係呈現於 Figs. 4 ~ 6。結果顯示萃取溫度、萃取時間及萃取溶劑比例三個變因間的三維座標皆有波峰曲面

Table 2 Experimental data and the observed response values peak area (mVsec) for different values of the three independent factors, namely, X_1 (extraction temperature, °C), X_2 (extraction time, min), and X_3 (ethanol concentration, %)

Run No.	Factors ^a			Response values peak area (mVsec, Y)
	Temperature (°C, X_1)	Time (min, X_2)	Ethanol (% , X_3)	
1	44.19 (-1)	96 (-1)	68.11 (-1)	5143.45 ^b
2	85.81 (1)	96 (-1)	68.11 (-1)	3709.92
3	44.19 (-1)	204 (1)	68.11 (-1)	4792.78
4	85.81 (1)	204 (1)	68.11 (-1)	2478.54
5	44.19 (-1)	96 (-1)	91.89 (1)	1982.52
6	85.81 (1)	96 (-1)	91.89 (1)	1750.93
7	44.19 (-1)	204 (1)	91.89 (1)	1581.82
8	85.81 (1)	204 (1)	91.89 (1)	1031.62
9	30.00 (-1.68)	150 (0)	80.00 (0)	3159.00
10	100.00 (1.68)	150 (0)	80.00 (0)	3095.31
11	65.00 (0)	60 (-1.68)	80.00 (0)	4687.52
12	65.00 (0)	240 (1.68)	80.00 (0)	4195.80
13	65.00 (0)	150 (0)	60.00 (-1.68)	3980.09
14	65.00 (0)	150 (0)	100.00 (-1.68)	935.74
15	65.00 (0)	150 (0)	80.00 (0)	5882.85
16	65.00 (0)	150 (0)	80.00 (0)	5859.24
17	65.00 (0)	150 (0)	80.00 (0)	5867.35
18	65.00 (0)	150 (0)	80.00 (0)	5894.21
19	65.00 (0)	150 (0)	80.00 (0)	5847.65
20	65.00 (0)	150 (0)	80.00 (0)	5898.59

^aValues in parentheses are levels set for independent factors.

^bEach value represents the mean of 3 replications.

產生。反應曲面方程式：

$$Y = 3887.189 - 432.025X_1 + 148.985X_2 - 100.790X_3 + 154.738X_1X_2 + 1041.195X_1X_3 + 282.755X_2X_3 + 44.412X_1X_1 - 586.700X_2X_2 + 90.631X_3X_3$$

首先探討萃取溫度與萃取時間之間的關係，結果顯示：在固定 80% 乙醇條件下，溫度低於 61.36 °C 時，龍鬚菜 MAAs 萃取量會隨著萃取溫度的上升而增加，推測因為溫度的上升會增加溶質的擴散係數，因此使得溶解力提高、萃取率增加 (Tartarotti and Sommaruga, 2002)；然而當溫度超過 61.36 °C 時，龍鬚菜 MAAs 量會隨之遞減。Hirata *et al.* (1979) 研究指出部份 MAAs 較不穩定且易於水解，如：Mycosporine-glycine 在 80°C

水浴下 3 h，就會水解成雙二酮基 (6-Deoxygadusol) 和甘氨酸 (Glycine)，推測可能因為高溫產生裂解，使得萃取率有下降的趨勢。文獻也指出溫度是影響 MAAs 安定性的重要因子之一，若將 *Porphyra-334* 溶解於 pH 1 ~ 11 的溶液中，於室溫下靜置 24 h，則各組皆非常安定；但若靜置於 80°C 時，則發現 *Porphyra-334* 趨於不穩定 (Zhang *et al.*, 2005)，由此可知適當的提升溫度，有助於龍鬚菜 MAAs 的萃取，但仍有其較適範圍。由試驗結果得知在 61.36°C、165 min 條件下的萃取量最高 (Fig. 4)。

接著探討萃取溫度與萃取溶劑濃度之間的關係，結果顯示：在固定 150 min 萃取時間下，萃取

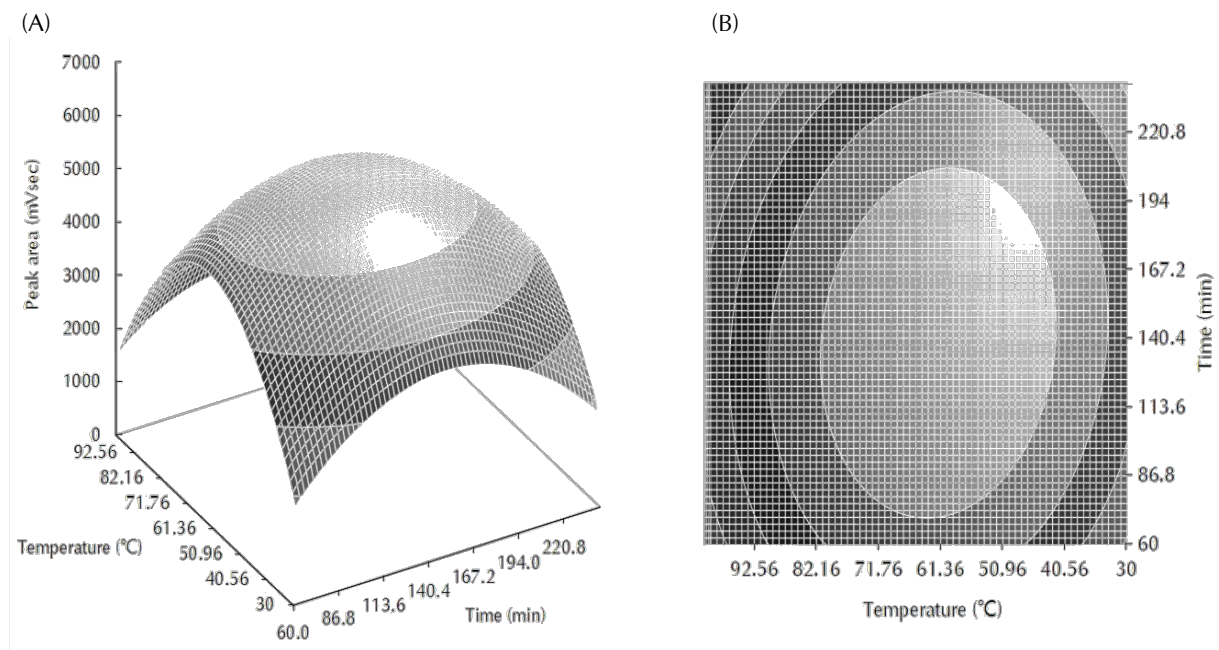


Fig. 4 3-D mesh plot (A) and contour plot (B) of the effects of extraction temperature and extraction time on the yield of MAAs from *Gracilaria tenuistipitata* extracted with 80% ethanol.

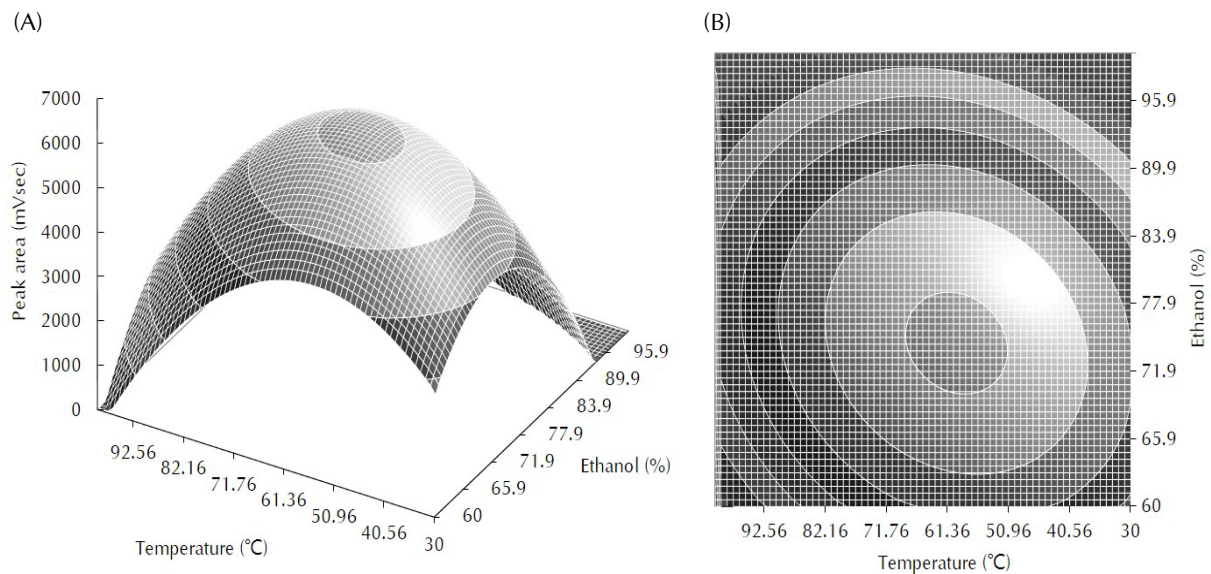


Fig. 5 3-D mesh plot (A) and contour plot (B) of the effects of extraction temperature and ethanol concentration on the yield of MAAs from *Gracilaria tenuistipitata* under extraction for 150 min.

溫度愈高、龍鬚菜 MAAs 萃取量愈高，乙醇濃度愈高、龍鬚菜 MAAs 萃取量也愈高，然當溶劑濃度高於 74.3% 時，龍鬚菜 MAAs 量即隨之遞減。Hirata *et al.* (1979) 指出：在有氧的條件下，Mycosporine-glycine 非常不安定且可能經由甲基化轉換成穩定的甲酯 (Methyl ester)，Takano *et al.*

(1978) 也提到當萃取環境的親疏水性有變化時，MAAs 易轉變成其它化合物或水解成胺基酸及其他衍生物，因此推測乙醇濃度會影響萃取環境的親疏水性，進而影響龍鬚菜 MAAs 萃取量。由試驗結果得知在 74.3% 乙醇、63°C 條件下的萃取量最高 (Fig. 5)。

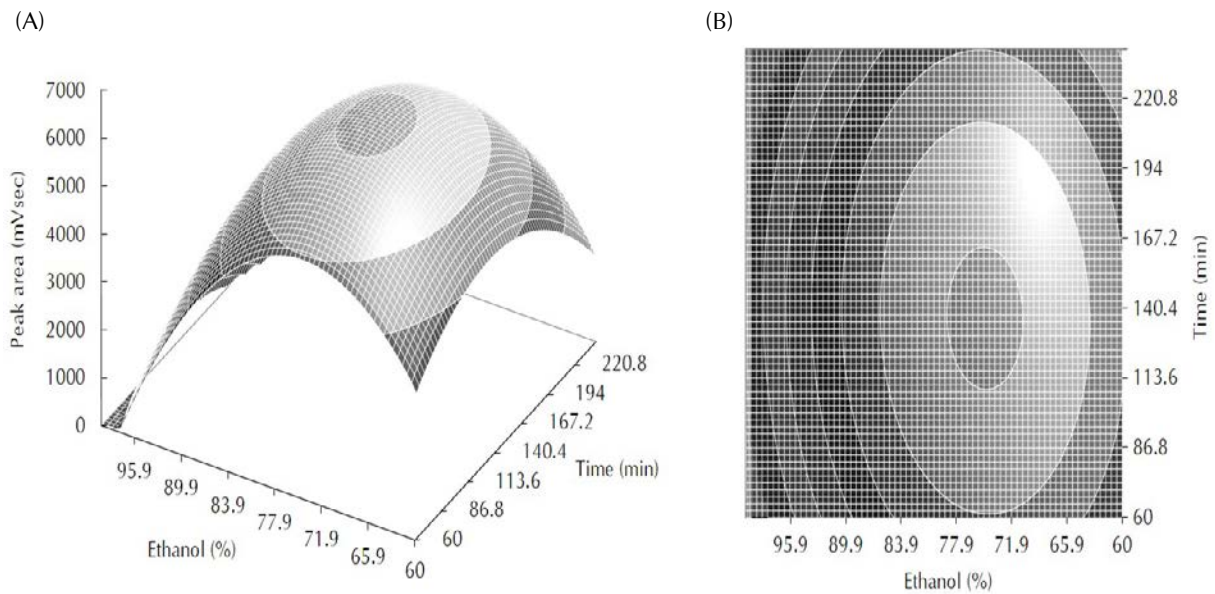


Fig. 6 3-D mesh plot (A) and contour plot (B) of the effects of extraction temperature and extraction time on the yield of MAAs from *Gracilaria tenuistipitata* extracted with 80% ethanol.

最後探討萃取溶劑比例與萃取時間的關係，結果顯示：在固定 65°C 萃取溫度下，溶劑濃度愈高、龍鬚菜 MAAs 萃取量愈高；然當乙醇濃度高於 74.9% 時，龍鬚菜 MAAs 萃取量則隨之遞減。隨著萃取時間增加，龍鬚菜 MAAs 萃取量有上升的趨勢，其萃取量在 165 min 時最佳，當超過 165 min 萃取量則開始緩降趨勢。Nhan 和 Phu (2012) 認為當萃取率未隨時間延長而顯著增加時，代表萃取率已達極限，再延長萃取時間也無助提升產率，亦可能影響其安定性。由此可知，適當的萃取時間有助於提升龍鬚菜 MAAs 萃取率，但過長的萃取時間不僅增加時間、人力、機械成本，也可能會破壞龍鬚菜 MAAs。由試驗結果得知在 74.9% 乙醇、165 min 條件下的萃取量最高 (Fig. 6)。綜合 Fig. 4 ~ 6 各圖較適操作條件之交集，得知：採用 74.3% 乙醇為溶劑，在 63°C 下，萃取 165 min 為龍鬚菜 MAAs 的較佳萃取條件，所得粗萃物及 MAAs 萃取率分別為 4.1 mg/g 及 0.83 mg/g 乾藻。

四、較適條件萃取產物之抗 UVB 能力分析

MAAs 的特色在於可吸收紫外線，因此其應用

研究多著重在肌膚保養品的開發 (徐, 2007; Rastogi and Incharoensakdi, 2014b)，基於本研究建立了龍鬚菜 MAAs 及其粗萃物之較適萃取條件，因此希望進一步探討所得粗萃物開發作為天然防曬劑之可行性。為了解龍鬚菜 MAAs 粗萃物對 HS68 纖維母細胞是否具有毒性，先以 1、2、3 及 4 mg/ml 之濃度與 HS68 纖維母細胞共同培養 24 h 後觀察其細胞存活率。結果得知：隨著龍鬚菜 MAAs 粗萃物濃度增加，HS68 纖維母細胞的存活率就隨之增加，呈劑量依存效應，顯示龍鬚菜 MAAs 粗萃物對 HS68 纖維母細胞無毒性反應。在 2、3 及 4 mg/ml 濃度下能活化 HS68 纖維母細胞使其細胞存活率達 120% 以上，且在顯微鏡下觀察細胞生長狀況良好。進而探討龍鬚菜 MAAs 粗萃物是否具有防曬作用，先以 1、2、3 及 4 mg/ml 濃度之龍鬚菜 MAAs 粗萃物與 HS68 纖維母細胞進行共同培養 24 h，爾後以 0.8 J/cm² UVB 對 HS68 纖維母細胞進行損傷，再培養 24 h 後分析其細胞存活率，結果顯示：細胞受 UVB 損傷後其細胞存活率降至 79%，然在添加 2、3 及 4 mg/ml 龍鬚菜 MAAs 粗萃物組別，其細胞存活率有顯著的提升 (Fig. 7)，由此推測龍鬚菜 MAAs 粗萃物能夠降低 UVB 對 HS68 纖維母細胞的傷害，同時顯著提升

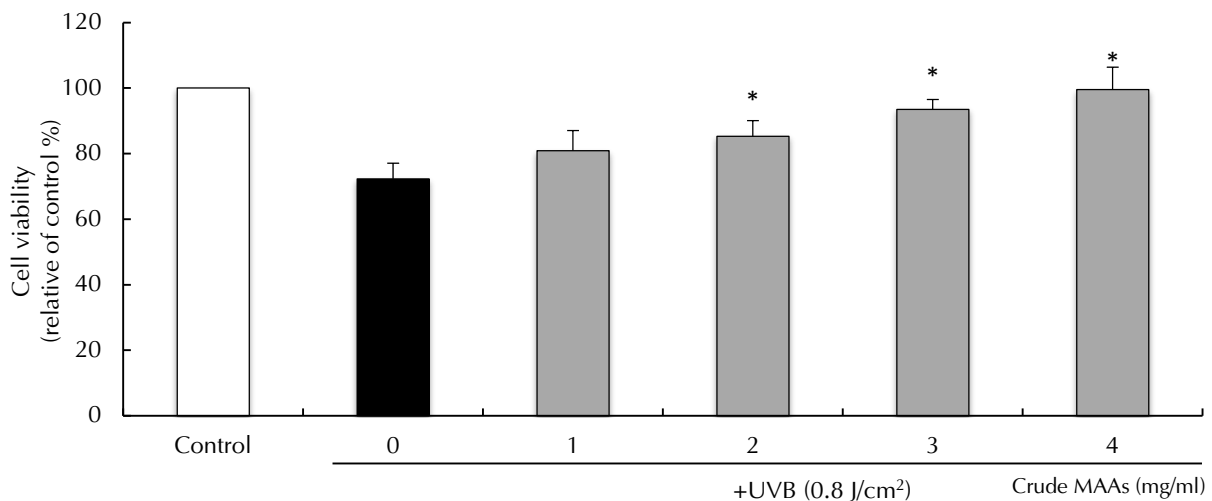


Fig. 7 Effect of the crude MAAs extracted from *Gracilaria tenuistipitata* under optimal conditions on the viability of HS68 fibroblast cells treated with UVB. *Compared with the UVB alone treated group of $p < 0.05$; results were expressed as mean \pm SD.

UVB 光損傷 HS68 纖維母細胞之存活率，具有作為天然防曬劑之潛力。

謝辭

感謝本所海水繁養殖研究中心臺西試驗場林媽勳先生協助採購龍鬚菜 *G. tenuistipitata*，使本研究得以順利進行，特此致謝。本研究經費來源為本所科技計畫-「水產保健產品開發-海洋機能素材之研發與應用：龍鬚菜機能性類胺基酸之萃取技術」，計畫編號為 103 農科-11.3.2-水-A2。

參考文獻

- 黃書政, 蕭泉源, 紀學斌 (2002) 利用反應曲面法探討葡萄糖酸內酯、丙二醇及乳酸鈉之混合添加對中式香腸保存性之影響. 臺灣農業化學與食品科學, 40: 295-306.
- 李澤民 (2003) 大型海藻生物多樣性資源之永續利用 (II) 含抗UV物質及氧化能力之評估. 國科會計畫.
- 孫乃云 (2006) 石花菜 (*Gelidium*) 水萃取液抗氧化及抗癌活性之探討. 國立臺灣海洋大學碩士論文.
- 徐嘉穗 (2007) 龍鬚菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) mycosporine-like amino acids (MAAs) 之抗氧化與抗皮膚光老化能力的評估及其在防曬化妝品之應用. 國立臺灣海洋大學碩士論文.

- Adams, N. L. and J. M. Shick (1996) Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Photochem. Photobiol., 64: 149-158.
- Banaszak, A. T. and R. K. Trench (1995) Effect of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. II. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima* and *Cassiopeia xamachana*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 194: 233-250.
- Box, G. E. P. and D. W. Behnken (1960) Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics., 2: 455-463.
- Callone, A. I., M. O. Carignan, N.G. Montoya and J. I. Carreto (2006) Biotransformation of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. J. Photochem. Photobiol. B, 84: 204-212.
- Cardozo, K. H. M., L. G. Marques, V. M. Carvalho, M. O. Carignan, E. Pinto, E. Marinho-Soriano and P. Colepicolo (2011) Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn., 21: 202-208.
- Carreto, J. I. and M. O. Carignan (2011) Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. Mar. Drugs, 9: 387-446.
- Carreto, J. I., M. O. Carignan and N. G. Montoya (2001)

- Comparative studies on mycosporine-like amino acids, paralytic shellfish toxins and pigment profiles of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *A. catenella* and *A. minutum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 223: 49-60.
- Carreto, J. I., M. O. Carignan and N. G. Montoya (2005) A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Mar. Biol.*, 146: 237-252.
- Carreto, J. I., M. O. Carignan, G. Daleo and S. G. De Marco (1990) Occurrence of mycosporine-like amino acid in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds? *J. Plankton. Res.*, 12: 909-921.
- Coba, F. de la, J. Aguilera, F. L. Figueroa, M. V. de Gálvez and E. Herrera (2009) Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J. Appl. Phycol.*, 21: 161-169.
- Conde, F. R., M. S. Churio and C. M. Previtali (2000) The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. B*, 56: 139-144.
- Dunlap, W. C. and B. E. Chalker (1986) Identification and quantification of near-UV absorbing compound (S-320) in a hermatypic scleractinian. *Coral Reefs*, 5: 1-5.
- Dunlap, W. C., D. McB. Williams, B. E. Chalker and A. T. Banaszak (1989) Biochemical photoadaptation in vision: UV absorbing pigments in fish eye tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, 93: 601-607.
- Ferrari, M., M. C. Fornasiero and A. M. Isetta (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods*, 131: 165-172.
- Figueroa, F. L., L. Escassi, E. Pérez-Rodríguez, N. Korbee, A. D. Giles and G. Johnsen (2003) Effects of short-term irradiation on photoinhibition and accumulation of mycosporine-like amino acids in sun and shade species of the red algal genus *Porphyra*. *J. Photochem. Photobiol. B*, 69: 21-30.
- Garcia-pichel, F. and R. W. Castenholz (1993) Occurrence of UV-absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 163-169.
- Hirata, Y., D. Uemura, K. Ueda and S. Takano (1979) Several compounds from *Palythoa tuberculosa* (Coelenterata). *Pure Appl. Chem.*, 51: 1875-1883.
- Karsten, U., K. Escoubeyrou and F. Charles (2009) The effect of re-dissolution solvents and HPLC columns on the analysis of mycosporine-like amino acids in the eulittoral macroalgae *Prasiola crispa* and *Porphyra umbilicalis*. *Helgol. Mar. Res.*, 63: 231-238.
- Klisch, M. and D. P. Häder (2008) Mycosporine-like amino acids and marine toxins- the common and the different. *Mar. Drugs*, 6: 147-163.
- Korbee, N., F. L. Figueroa and J. Aguilera (2005) Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Photochem. Photobiol. B*, 80: 71-78.
- Kräbs, G., M. Watanabe and C. A. Wiencke (2004) Monochromatic action spectrum for the photoinduction of the UV-absorbing mycosporine-like amino acid shinorine in the red alga *Chondrus crispus*. *Photochem. Photobiol.*, 79: 515-519.
- Lee, W. C., S. Yusof, N. S. A. Hamid and B. S. Baharin (2005) Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *J. Food Eng.*, 73: 55-63.
- Mason, D. S., F. Schafer, J. M. Shick and W. C. Dunlap (1998) Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) are acquired from their diet by medaka fish (*Oryzias latipes*) but not by SKH-1 hairless mice. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 120: 587-598.
- Nakamura, H., J. Kobayashi and Y. Hirata (1982) Separation of mycosporine-like amino acids in marine organisms using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 250: 113-118.
- Nhan, P. P. and N. T. Phu (2012) Effect of time and water temperature on caffeine extraction from coffee. *Pak. J. Nutr.*, 11: 100-103.
- Oyamada, C., M. Kaneniwa, K. Ebitani, M. Murata and K. Ishihara (2008) Mycosporine-like amino-acids extracted from scallop (*Patinopecten yessoensis*) ovaries: UV protection and growth stimulation activities on human cells. *Mar. Biotechnol.*, 10: 141-150.
- Portwich, A. and F. Garcia-Pichel (2000) A novel prokaryotic UVB photoreceptor in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Photochem. Photobiol.*, 71: 493-498.
- Rastogi, R. P. and A. Incharoensakdi (2014a) Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. *FEMS*.

- Microbiol. Ecol., 87: 244-256.
- Rastogi, R. P. and A. Incharoensakdi (2014b) Analysis of UV-absorbing photoprotectant mycosporine-like amino acid (MAA) in the cyanobacterium *Arthrospira* sp. CU2556. Photochem. Photobiol. Sci., 13: 1016-1024.
- Shick, J. M. and W. C. Dunlap (2002) Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. Annu. Rev. Physiol., 64: 223-262.
- Shick, J. M., M. P. Lesser and P. L. Jokiel (1996) Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. Glob. Change Biol., 2: 527-545.
- Shick, J. M., S. Romaine-Lioud, C. Ferrier-Pagès and J. P. Gattuso (1999) Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. Limnol. Oceanogr., 44: 1667-1682.
- Shick, J. M., W. C. Dunlap, B. E. Chalker, A. T. Banaszak and T. K. Rosenzweig (1992) Survey of ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in organs of coral reef holothuroids. Mar. Ecol. Prog. Ser., 90: 139-148.
- Singh, S. P., M. Klisch, R. P. Sinha and D. P. Häder (2010) Sulfur deficiency changes mycosporine-like amino acid (MAA) composition of *Anabaena variabilis* PCC 7937: A possible role of sulfur in MAA bioconversion. Photochem. Photobiol., 86: 862-870.
- Singh, S. P., S. Kumari, R. P. Rastogi, K. L. Singh and R. P. Sinha (2008) Mycosporine-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. Indian J. Exp. Biol., 46: 7-17.
- Sinha, R. P., S. P. Singh and D. P. Häder (2007) Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. J. Photochem. Photobiol. B, 89: 29-35.
- Sinha, R. P., M. Klisch, A. Groniger and D. P. Häder (2000) Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea*-effects of UV and heat. Environ. Exp. Bot., 43: 33-34.
- Sommaruga, R. and F. Garcia-Pichel (1999) UV-absorbing mycosporine-like amino acids in planktonic and benthic organisms from a high-mountain lake. Arch. Hydrobiol., 144: 255-269.
- Stochaj, W. R., W. C. Dunlap and J. M. Shick (1994) Two new UV-absorbing mycosporine-like amino acids from the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and the effects of zooxanthellae and spectral irradiance on chemical composition and content. Mar. Biol., 118: 149-156.
- Takano, S., D. Uemura and Y. Hirata (1978) Isolation and structure of two new amino acids, palythanol and palythene, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. Tetrahedron Lett., 49: 4909-4912.
- Tartarott, B. and R. Sommaruga (2002) The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine-like amino acid (MAAs) in algae and zooplankton. Arch. Hydrobiol., 154: 691-703.
- Torita, A., Y. Chun and Y. Hasegawa (2004) Photoprotective activity of scallop shell water-extract in keratinocyte cells. Fish. Sci., 70: 910-915.
- Whitehead, K., D. Karentz and J. I. Hedges (2001) Mycosporine-like amino acids (MAAs) in phytoplankton, a herbivorous pteropod (*Limacina helicina*), and its pteropod predator (*Clione antarctica*) in McMurdo Bay, Antarctica. Mar. Biol., 139: 1013-1019.
- Yakovleva, I. M., R. Bhagooli, A. Takemura and M. Hidaka (2004) Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine. Comp. Biochem. Physiol. B, 139: 721-730.
- Zhang, Z., Y. Tashiro, S. Matsukawa and H. Ogawa (2005) Influence of pH and temperature on the ultraviolet-absorbing properties of porphyra-334. Fish. Sci., 71: 1382-1384.

Optimizing Conditions for Mycosporine-like Amino Acids of *Gracilaria tenuistipitata* Using Response Surface Methodology

Yu-Lan Hung, Pai-An Hwang*, Yung-Chun Chu and Chwen-Herng Wu

Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

Mycosporine-like amino acids (MAAs) are a family of intracellular ultraviolet (UV) -absorbing compounds involved in the protection of aquatic organisms against solar UV radiation. The protocols used to extract MAAs largely differ; for example, differences include the type of solvent, concentrations, temperatures, and times used. Since ethanol is less expensive and less toxic than methanol, the procedure used in this study to extract the MAAs of *Gracilaria tenuistipitata* was based on ethanol. An optimization study of *G. tenuistipitata* MAA extraction using response surface methodology (RSM) was performed, and 3D response surfaces were plotted from the mathematical models. The optimal conditions based on combination responses were as follows: a temperature (X_1) of 63°C, a time (X_2) of 165 min, an ethanol concentration (X_3) of 74.3% ethanol. Under the optimum extraction procedure conditions, the yields of crude MAAs and MAAs were 4.1 mg/g and 0.83 mg/g dry weight. Additionally, crude MAAs of *G. tenuistipitata* significantly increased cell proliferation and protected against UVB-induced damage in HS68 fibroblast cells. Our study revealed that crude MAAs of *G. tenuistipitata* present a potential source of natural photoprotective compounds.

Key words: *Gracilaria* sp., mycosporine-like amino acids (MAAs), response surface methodology, photoprotective compounds

*Correspondence: Seafood Technology Division, Fisheries Research Institute, Council of Agriculture, 199 Hou-I Road, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02) 2462-2101 ext. 2613; E-mail: pahwang@mail.tfrin.gov.tw