李田乐, 蒋秀婧, 潘明轩, 等. 马尾藻类菌孢素氨基酸的提取工艺优化及其对酪氨酸酶活性的抑制机理 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(3): 263−274. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030033

LI Tianle, JIANG Xiujing, PAN Mingxuan, et al. Extraction Process of Mycosporine-like Amino Acids from *Sargassum* sp. and Its Inhibition Mechanism on the Activity of Tyrosinase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(3): 263−274. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030033

· 工艺技术 ·

马尾藻类菌孢素氨基酸的提取工艺优化及其对酪氨酸酶活性的抑制机理

李田乐[1], 蒋秀婧[1], 潘明轩[2], 韦　欣[1], 焦　学[2], 王欣冉[1], 胡亚东[2], 孙颖颖[1,*]

（1.江苏海洋大学海洋食品与生物工程学院, 江苏连云港 222005;
2.江苏省沿海开发投资有限公司, 江苏南京 210000）

摘　要: 为探究马尾藻类菌孢素氨基酸（Mycosporine-like amino acids，MAAs）提取物对酪氨酸酶活性的影响，本研究首先采用单因素和响应面优化试验，分析甲醇浓度、液料比、提取温度和提取时间等因素，以马尾藻 MAAs 的得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率为指标，建立马尾藻 MAAs 的适宜提取工艺。在此基础上，采用薄层层析、紫外光谱、高效液相色谱和分光光度法，对工艺优化后的 MAAs 提取物进行定性定量、体外抗氧化和抗酪氨酸酶活性分析。进一步，通过酶反应动力学分析、铜离子螯合实验和酪氨酸酶荧光猝灭实验，确定马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶活性的抑制作用机理。结果表明，马尾藻 MAAs 的适宜提取参数为温度 41 ℃、液料比 26 mL/g、时间 2.6 h 和甲醇浓度 31%，MAAs 得率为 89.87±0.73 mg/g，其对酪氨酸酶活性的抑制率 IC_{50} 为 2.23±0.32 mg/mL。马尾藻 MAAs 具备清除 DPPH（IC_{50} 为 0.17±0.06 mg/mL）和 $ABTS^{+}$（IC_{50} 为 1.03±0.21 mg/mL）自由基的能力，以及螯合铜离子（半螯合浓度为 0.70±0.21 mg/mL）的能力。马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶活性的抑制作用为可逆、混合型抑制。马尾藻 MAAs 具有酪氨酸酶抑制活性，可有效阻断黑色素合成途径，在防止生鲜果蔬和饮料褐变以及预防虾类黑变病等方面具有潜在应用前景。

关键词: 马尾藻, 类菌孢素氨基酸, 提取工艺, 酪氨酸酶, 抑制机理

中图分类号: TQ464.7　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2026)03−0263−12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025030033　　本文网刊:

Extraction Process of Mycosporine-like Amino Acids from *Sargassum* sp. and Its Inhibition Mechanism on the Activity of Tyrosinase

LI Tianle[1], JIANG Xiujing[1], PAN Mingxuan[2], WEI Xin[1], JIAO Xue[2], WANG Xinran[1], HU Yadong[2], SUN Yingying[1,*]

（1.School of Marine Food and Biological Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2.Jiangsu Coastal Development Investment Co., Ltd., Nanjing 210000, China）

Abstract: To explore the effect of mycosporine-like amino acids (MAAs) extracted from *Sargassum* sp. on the activity of tyrosinase, this study first employed single-factor and response surface optimization experiments to analyze the effects of several factors such as methanol concentration, liquid-to-solid ratio, extraction temperature and extraction time on the extraction of MAAs from *Sargassum* sp. An optimal extraction process for MAAs from *Sargassum* sp. was then established using the yield of MAA extracts and their inhibitory rate against tyrosinase activity as indicators. Further, thin-layer chromatography, ultraviolet spectroscopy, high-performance liquid chromatography, and spectrophotometry were used to conduct qualitative and quantitative analysis, *in vitro* antioxidant analysis, and anti-tyrosinase activity analysis of MAA

收稿日期: 2025−03−05

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金（CX(24)3063）; 连云港市“521 工程”科研项目（LYG065212024015）; 连云港市科技项目重点研发计划（CG2415）; 江苏海洋大学大学生创新训练计划项目。

作者简介: 李田乐（2000−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1910467724 @qq.com。

*** 通信作者:** 孙颖颖（1978−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 海洋生物提取与分离工程, E-mail: syy-999@163.com。

extracts. And then, the inhibition mechanism of MAAs from *Sargassum* sp. on the activity of tyrosinase was determined through enzyme reaction kinetics analysis, copper ion chelation experiments, and tyrosinase fluorescence quenching experiments. The results showed that the appropriate extraction parameters for MAAs from *Sargassum* sp. were a temperature of 41 ℃, a liquid-solid ratio of 26 mL/g, a time of 2.6 h, and a methanol concentration of 31%. The yield of MAA extracts was 89.87±0.73 mg/g, and the IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) value of its inhibitory rate on the activity of tyrosinase was 2.23±0.32 mg/mL. MAA extracts from *Sargassum* sp. exhibited the capacity to scavenge DPPH (IC_{50} of 0.17±0.06 mg/mL) and $ABTS^{+}$ (IC_{50} of 1.03±0.21 mg/mL) free radicals, and could chelate copper ions (with a half-chelation concentration of 0.70±0.21 mg/mL). The inhibitory effect of MAAs from *Sargassum* sp. on the activity of tyrosinase was a reversible and mixed-type inhibition. MAAs from *Sargassum* sp. possess the inhibitory activity against tyrosinase and can effectively block the melanin synthesis pathway. They have potential application prospects in preventing the enzymatic browning of fresh fruits, vegetables and beverages, as well as in preventing melanosis in shrimps.

Key words: *Sargassum* sp.; mycosporine-like amino acids; extraction process; tyrosinase; inhibition mechanism

酪氨酸酶(Tyrosinase, TYR)又名多酚氧化酶,是含双核铜离子的金属氧化还原酶,存在于包括人类在内的许多生物体中[1]。在生物体内,酪氨酸酶能够催化 L-酪氨酸和多巴发生羟基化反应,分别生成左旋多巴和多巴醌。TYR 还参与二羟基吲哚的氧化过程,二羟基吲哚通过氧化聚合反应形成一种不溶性高分子聚合物——黑色素[2]。在食品加工和贮藏过程中,由酪氨酸酶引发的酶促褐变对鲜切的山药、藕、苹果等食品的感官品质有较大的负面影响[3];同时人为和非人为污染物的持续释放导致了 UVR 强度的显著变化,人体内酪氨酸酶活性升高,也会使黑色素合成增多,色素沉着导致雀斑、黄褐斑、老年斑块、恶性黑色素瘤,甚至与阿尔茨海默病和帕金森病[4]进展相关的神经退行性病变[5]。酪氨酸酶抑制剂可以通过抗氧化作用、螯合 Cu^{2+}、结合氨基酸残基这三种机制抑制酪氨酸酶活性及黑色素生成[6]。因此,使用有效的酪氨酸酶抑制剂是控制食品酶促褐变、减少皮肤色素沉积的重要手段之一。目前,常见的酪氨酸酶抑制剂主要有对苯二酚、曲酸、亚硫酸盐、抗坏血酸和熊果苷等。这些酪氨酸酶抑制剂存在细胞毒性、皮肤刺激性、长期使用致癌性、皮肤渗透性低、稳定性低、接触过敏和缺乏疗效等不利影响[7]。因此,食品加工行业亟需新型、安全和有效的酪氨酸酶抑制剂。

大型海藻是海洋生态系统中关键的初级生产者,是多糖、多肽和不饱和脂肪酸等活性物质的主要来源之一。我国是世界上最大的海藻生产国之一,海藻年产量在 260~280 万吨之间,养殖面积在 14 万公顷以上[8]。在海藻生产、消费和出口方面,我国占据着举足轻重的地位。然而,海藻资源却未获得充分利用[6],特别是马尾藻。马尾藻(*Sargassum* sp.)广泛分布在热带和温带海洋,目前仅被用作动物饲料、食品原料和肥料。研究发现,马尾藻具有抗氧化[9]、抗肿瘤[10]、抗炎[11]、抗凝血[12] 和抗病毒[13] 等活性,可作为活性物质的良好来源。

类菌孢素氨基酸(mycosporine-like amino acids, MAAs)是一类具有多种活性的化合物,由环己烯酮或环己烯胺的发色基团与其氨基或亚氨基醇基团的氮取代基偶联而成[14],存在于大型海藻中[15],具有抗氧化、抗衰老、抗炎、抑菌和保湿等活性[16]。前期研究发现,马尾藻含有 MAAs[17]。基于此,本文通过探究马尾藻 MAAs 提取工艺的优化、MAAs 的定性定量检测,以及 MAAs 抗氧化作用、螯合 Cu^{2+}、结合氨基酸残基三个方面抑制酪氨酸酶活性作用的机理,旨在为利用 MAAs 开发具有较低的刺激性、避免细胞毒性、较好的光稳定性和热稳定性、抗氧化、抗炎、保湿等功能的新型酪氨酸酶抑制剂提供实验依据。本研究在提取工艺优化、作用机制深入探索以及应用前景拓展等多个方面展现了显著的创新性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

马尾藻　购于山东省威海市;曲酸、左旋多巴和酪氨酸酶(≥1000 U/mg)　购于上海麦克林生化科技有限公司;色谱纯甲醇　购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;其他分析纯试剂　均购于国药集团化学试剂有限公司。

BUCHIR R210 旋转蒸发仪　瑞士 BUCHIR 公司;LGJ-10FD 冷冻干燥机　北京松源华兴生物技术有限公司;Revvity 全波长酶标分析仪　安捷伦科技公司;VQDUO-DUALLC 高效液相色谱仪　美国赛默飞世尔公司。

1.2 实验方法

1.2.1 马尾藻 MAAs 提取工艺

1.2.1.1 单因素实验　工艺流程:马尾藻经清洗烘干、超微粉碎机粉碎后,过 40 目筛备用。参考实验室前期建立的提取工艺[15]:称取 5 g 马尾藻藻粉于锥形瓶中,按照实验因素水平加入甲醇水溶液,搅拌后密封放入恒温水浴摇床(180 r/min),在设定温度下振荡浸提。提取结束后,冷却至室温,倒出浸提液。按照上述相同的条件重复浸提两次,合并浸提液。于 10000 r/min 下离心 20 min 后,收集上清液,沉淀用纯水洗涤 2~3 次。洗涤液和先前收集的上清液合并,抽滤和减压蒸发获得浓缩液。按照 1∶4(v∶v,体积比)加入无水乙醇,于−20 ℃ 下沉淀 6 h。抽滤后,

45 ℃减压浓缩，浓缩液经冷冻干燥，得到马尾藻 MAAs 提取物。

得率测定：得率按照公式（1）计算。根据 MAA 的摩尔消光系数 ε[18] 及公式（2）[19]，可计算出 MAAs 提取物中 MAAs 的含量。

$$\text{MAAs得率}(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \qquad \text{式（1）}$$

式中：m_1 为提取的 MAAs 质量，g；m_2 为马尾藻干粉末质量，g。

$$\text{MAAs含量}(mg) = A \times \frac{M}{\varepsilon} \qquad \text{式（2）}$$

式中：A 为特征吸收波长 475 nm 下的吸光度；M 为 MAA 的分子质量（shinorine, 332; palythine, 244; porphyra-334, 346; palythenic acid, 328）；ε 为 MAA 的摩尔消光系数（shinorine, 43700; palythine, 35500; porphyra-334, 42300; palythenic acid, 29200）[20]。

酪氨酸酶活性的抑制率指标测定：酪氨酸酶活性抑制试验[21] 反应体系组成见表 1。将 PBS 缓冲液（pH6.8）、不同浓度的样品溶液和 20 μg/mL 酪氨酸酶溶液按照顺序，依次加入 96 孔板中，并将其充分混合。将其置于 37 ℃恒温水浴 10 min，随后加入 2.5 mg/mL 的 L-多巴溶液，37 ℃恒温 15 min。同时以相同浓度的曲酸对照品溶液作为阳性对照，以相同体积 PBS 为阴性空白对照。用酶标仪在 475 nm 处测定吸光度值 OD_{475}。测得 MAAs 提取物的抑制作用以 IC_{50} 值表示，根据公式（3）计算酪氨酸酶活性抑制率：

$$\text{酪氨酸酶活性抑制率}(\%) = \frac{(A_1 - A_2) - (A_3 - A_4)}{(A_1 - A_2)} \times 100 \qquad \text{式（3）}$$

式中：A_1 为对照溶液 OD_{475} 值，A_2 为对照空白溶液 OD_{475} 值，A_3 为样品溶液 OD_{475} 值，A_4 为样品空白溶液 OD_{475} 值。

表 1　反应液的组成和用量

Table 1　Composition and dosage of reagents

反应液（μL）	管号			
	A_1	A_2	A_3	A_4
缓冲液	130	180	120	170
样品溶液	0	0	10	10
酪氨酸酶溶液	20	20	20	20
L-多巴溶液	50	0	50	0

实验因素水平设计：按照提取工艺流程，分别考察提取温度（35、40、45、50、55 ℃）、液料比（10、15、20、25、30 mL/g）、提取时间（1、1.5、2、2.5、3 h）以及甲醇浓度（15%、20%、25%、30%、35%）对马尾藻 MAAs 的得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率的影响，考察某一因素时，其他因素条件固定为：提取温度 45 ℃，提取时间 2 h，甲醇浓度 25%，液料比 25 mL/g。每组实验平行 3 次。

1.2.1.2　响应面试验　在单因素实验结果的基础上，选取温度（A）、液料比（B）、提取时间（C）和甲醇浓度（D）为响应因子，以 MAAs 得率和酪氨酸酶活性抑制率为响应值，按照响应面法 Box-Behnken 中心组合试验设计的原理，进行四因素三水平试验设计（表 2）。

表 2　响应面试验的因素与水平

Table 2　Factors and levels of response surface experiments

因素	水平		
	−1	0	1
A 提取温度（℃）	35	40	45
B 液料比（mL/g）	20	25	30
C 提取时间（h）	2	2.5	3
D甲醇浓度（%）	25	30	35

1.2.2　马尾藻 MAAs 定性定量检测

1.2.2.1　定性分析　薄层层析检测：参考实验室前期建立的薄层层析法[16]。称取 0.1 g 马尾藻 MAAs 提取物，溶于 1 mL 蒸馏水。点样在硅胶 G 板上，展开剂为甲醇/乙醇/蒸馏水（8∶10∶0.5，体积比），显色剂为碘化铋钾试剂（7.3 g 碘化铋钾，冰醋酸 10 mL，蒸馏水 60 mL）。静置显色 20~40 min，含氮化合物会呈现橙色或黄色斑点[16]。

紫外光谱检测：将马尾藻 MAAs 提取物 0.005 g 溶于 10 mL 超纯水，用紫外分光光度计进行 240~400 nm 波长扫描。

高效液相色谱检测：将马尾藻 MAAs 提取物 0.005 g 溶于 10 mL 超纯水，经 0.22 mm 水系滤膜过滤后，采用 C_{18} 柱（5 μm，4.6 mm×150 mm），柱温为 25 ℃，进样量 10 μL，流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液，流动相 B 为甲醇，流速为 0.8 mL/min，检测波长为 330 nm，梯度洗脱条件：0~20 min，B%：10%~90%[22]。

1.2.2.2　定量测定　取马尾藻 MAAs 提取物 0.01 g 溶解于 10 mL 水中，吸取 1 mL，按下述方法测定吸光值（X），获得 MAAs 提取物中的各组分浓度（Y），按公式（4）计算各组分含量：

$$\text{组分含量}(mg/g) = \frac{C \times V}{M} \qquad \text{式（4）}$$

式中：C 为提取物中组分浓度，mg/mL；V 为提取物溶液总体积，mL；M 为提取物质量，g。

蛋白质含量测定：采用二喹啉甲酸（bicinchoninic acid, BCA）法[23] 进行测定，以牛血清白蛋白为标准品，于 562 nm 处测定吸光值，标准曲线 y=9.364x+0.0348（R^2=0.9959）。

总多酚含量测定：采用 Folin-Ciocalteu 比色法[24] 进行测定，以没食子酸为标品，于 765 nm 处测定吸光值，标准曲线 y=20.205x+0.0454（R^2=0.9997）。

总黄酮含量测定：采用 $NaNO_2$-Al$(NO_3)_3$ 比色法[25] 测定。以芦丁为标品，于 510 nm 处测定吸光值，标准曲线 y=12.843x+0.0342（R^2=0.994）。

总多糖含量测定：采用苯酚-硫酸法[26]。以葡萄糖为标品，于 490 nm 处测吸光值，标准曲线 y=0.0081x+0.0772（R^2=0.9804）。

1.2.3 抗氧化活性的测定

1.2.3.1 DPPH 自由基清除能力测定 将马尾藻 MAAs 提取物，配制为 0.2、0.4、0.6、0.8、1 mg/mL 的样液作为待测样液，取 2 mL 样品溶液加入 2 mL DPPH-无水乙醇溶液，充分混合后于室温条件下避光孵育 30 min 后测定其波长 517 nm 处的吸光值（A_1）。以无水乙醇溶液代替 DPPH-无水乙醇溶液测定吸光值（A_2），无水乙醇溶液代替样液测定吸光值（A_0）。以曲酸为阳性对照。按照公式（5）计算 DPPH 自由基清除率。

$$清除率(\%)=\frac{A_0-(A_1-A_2)}{A_0}\times 100 \quad 式（5）$$

1.2.3.2 $ABTS^+$自由基清除能力测定 将马尾藻 MAAs 提取物，配制为 1、2、3、4、5 mg/mL 的样液作为待测样液，将 0.1 mL 样液与 3.9 mL ABTS 工作液混合，在避光条件下反应 10 min，随后在 734 nm 处测定吸光度（A_1）。同时，以蒸馏水分别代替 ABTS 工作液和样液测定吸光值（A_2 和 A_0）。以曲酸为阳性对照，按照公式（5）计算样品的 $ABTS^+$自由基清除率。

1.2.4 铜离子螯合能力测定 采用铜离子络合比色法。取 10 μL 0.01 mg/mL 铜离子标准溶液与 150 μL 0.2 mol/L 乙酸缓冲液（pH5.0）、5×10^{-2} mol/L 抗坏血酸混匀，37 ℃ 孵育 5 min，测定吸光度（A_1）。加入样品溶液混匀，37 ℃ 孵育 5 min，测定吸光度（A_2）。以纯净水为空白对照（A_0），以 50 μL 2×10^{-5} mol/L 的 3,2-二溴-PAESA 络合剂作为标准对照（A），在 600 nm 处测定吸光度，按照公式（6）计算铜离子螯合率：

$$铜离子螯合率(\%)=\frac{(A_2-A_1)-A_0}{A}\times 100 \quad 式（6）$$

1.2.5 马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶抑制动力学分析

1.2.5.1 酪氨酸酶抑制的可逆性分析 固定底物左旋多巴浓度为 2.5 mg/mL，取不同浓度的 MAAs 溶液（0、0.5、1、1.5、3 mg/mL），加入到不同浓度的酪氨酸酶溶液（10、20、40 μg/mL）中进行反应，以酶的浓度为横坐标，相对剩余酶活为纵坐标作图，判断其对酪氨酸酶的抑制作用是否可逆[27]。

1.2.5.2 酪氨酸酶的抑制类型分析 固定酪氨酸酶浓度为 20 μg/mL，改变 MAAs 溶液的浓度（0、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL），加入到不同浓度的左旋多巴（2、4、6、8、10 mg/mL）中进行反应。采用 Lineweave-Burk 双倒数作图法，以底物浓度的倒数（1/S）为横坐标，酶促反应速率的倒数（1/V）为纵坐标，绘制不同底物浓度下的双倒数曲线图，判断 MAAs 溶液对酪氨酸酶活性的抑制类型[28]，并通过二次作图法确定抑制常数。抑制酪氨酸酶的动力学参数通过 Lineweaver-Burk 方程计算，公式（7）如下：

$$\frac{1}{V}=\frac{K_m}{V_{max}}\times\frac{1}{S}+\frac{1}{V_{max}} \quad 式（7）$$

式中：V_{max} 为最大反应速率，min/A；K_m 为米氏常数，mg/mL；S 为底物浓度，mg/mL。

1.2.6 酪氨酸酶荧光猝灭实验 为了研究马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶的荧光猝灭作用，采用荧光分光光度计进行荧光光谱分析。向 96 孔板中加入 10 μL 250 U/mL 酪氨酸酶，再分别加入 100 μL 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1 mg/mL 马尾藻 MAAs 提取物，振荡混匀后加入缓冲液使得反应总体积为 200 μL。荧光激发波长为 280 nm，扫描范围为 360~420 nm，激发和发射缝均为 3 nm[29]。

1.3 数据处理

所有实验均重复 3 次以确保数据准确，使用 SPSS26 软件进行显著性分析和 IC_{50} 计算，P<0.05，差异显著。数据整理和分析绘图采用 OriginPro 2021、Design-Expert13.1.0.1 软件进行。相关性分析采用 SPSS26 软件计算皮尔森（Pearson）相关系数和进行显著性检验，OriginPro2021 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 马尾藻 MAAs 提取的单因素实验

2.1.1 提取温度对马尾藻 MAAs 提取的影响 在图 1 中，马尾藻 MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率随提取温度的增加呈现先显著（P<0.05）增加后降低的趋势。在提取温度为 40 ℃ 时，马尾藻 MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率达到最大，分别为 7.2% 和 76.63%。提取温度在 35~55 ℃ 范围内，较高的提取温度有利于马尾藻 MAAs 的提取。在海水红毛菜（*Bangia fusco-purpurea*）[30]、石莼（*Ulva lactuca*）[17] 和羊栖菜（*Hizikia fusifarme*）[22] 等大型海藻中，同样也是较高温度有利于 MAAs 的提取。然而，与这些已有报道[17,22,30] 不同的是，本文中

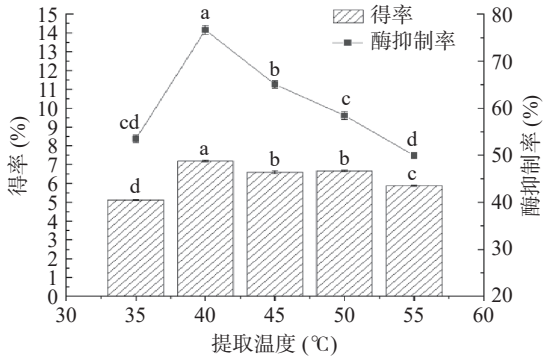


图 1 提取温度对马尾藻 MAAs 得率和酪氨酸酶抑制率的影响

Fig.1 Effect of extraction temperature on the yield of MAAs and tyrosinase inhibition rate of *Sargassum* sp.

注：不同字母表示数据之间存在显著差异，P<0.05，图 2~图 4 同。

提取温度在 45~55 ℃ 范围内，马尾藻 MAAs 得率虽下降但仍然高于提取温度为 35 ℃ 时 MAAs 得率。这可能与大型海藻种类或大型海藻中 MAAs 组成有关，在后续工作中将针对这个问题开展研究。当提取温度为 40 ℃ 时，马尾藻 MAAs 得率最高且其酪氨酸酶抑制率最强，因此，选择 40 ℃ 为马尾藻 MAAs 的提取温度。

2.1.2　液料比对马尾藻 MAAs 提取的影响　从图 2 可以看出，液料比对马尾藻 MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率有显著（P<0.05）影响。当液料比从 10 mL/g 增加到 25 mL/g 时，MAAs 得率显著（P<0.05）增加，并在 25 mL/g 时，得率达到最大值。当液料比继续增加，MAAs 得率开始下降，但仍然显著（P<0.05）高于液料比为 10 mL/g 和 15 mL/g 时的 MAAs 得率。在液料比 10~30 mL/g 范围内，马尾藻 MAAs 提取物对酪氨酸酶活性的抑制率与 MAAs 得率变化趋势相似，即随着液料比的增加，其对酪氨酸酶活性的抑制率先升高再降低，在 20 mL/g 时，MAAs 提取物对酪氨酸酶活性的抑制率最大。这表明，较大的液料比有利于马尾藻中 MAAs 的溶出。当液料比进一步增加时，马尾藻 MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率均会下降，可能是由于过多的提取溶剂稀释了目标物浓度。综合考虑，选择 25 mL/g 为马尾藻 MAAs 提取的适宜液料比。

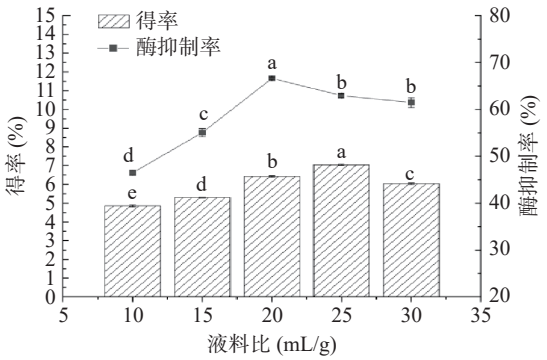


图 2　液料比对马尾藻 MAAs 得率和酪氨酸酶抑制率的影响

Fig.2　Effect of liquid-to-material ratio on the yield of MAAs and tyrosinase inhibition rate of *Sargassum* sp.

2.1.3　提取时间对马尾藻 MAAs 提取的影响　随着提取时间的延长，马尾藻 MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率均呈现先上升后下降趋势（图 3）。当提取时间在 1~2 h 内，MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率均随提取时间的增加而显著（P<0.05）增大。当提取时间为 2.5 h 时，得率达到最大值。当提取时间继续增加时，MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率显著（P<0.05）下降。这表明，过长的提取时间可能导致了 MAAs 降解。当提取时间达到 2 h 时，酶抑制率达到最高 69.87%，当提取时间达到 2.5 h 时，得率达到最高 7.66%，为了节省时间，确定适宜的提取时间为 2 h。

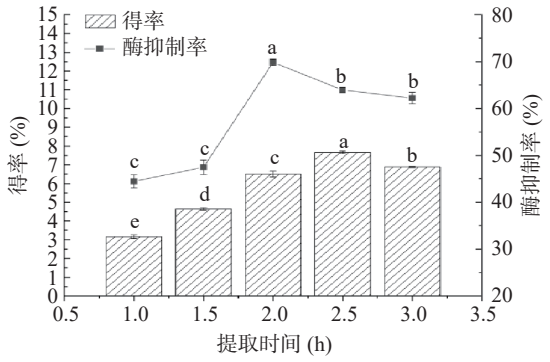


图 3　提取时间对马尾藻 MAAs 得率和酪氨酸酶抑制率的影响

Fig.3　Effect of extraction time on the yield of MAAs and tyrosinase inhibition rate of *Sargassum* sp.

2.1.4　甲醇浓度对马尾藻 MAAs 提取的影响　由图 4 可知，甲醇浓度对马尾藻 MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率的影响类似。随着甲醇浓度的增加，二者均呈先增加后下降趋势，在甲醇浓度为 30% 时，MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率均达到最高值。当甲醇浓度继续增加，MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率均显著（P<0.05）降低。

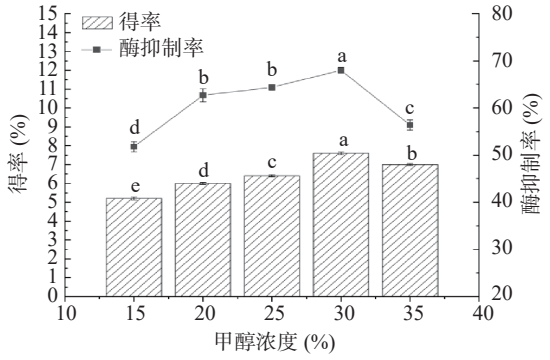


图 4　甲醇浓度对马尾藻 MAAs 得率和酪氨酸酶抑制率的影响

Fig.4　Effect of methanol concentration on the yield of MAAs and tyrosinase inhibition rate of *Sargassum* sp.

综合上述实验结果，当提取温度为 40 ℃、液料比为 25 mL/g、提取时间为 2 h、甲醇浓度为 30% 时马尾藻 MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率有较大值。基于这些单因素实验结果，采用响应面试验进一步优化马尾藻 MAAs 的提取工艺。

2.1.5　响应面试验结果　在上述实验基础上，以提取温度、液料比、提取时间和甲醇浓度为自变量，马尾藻 MAAs 得率和酪氨酸酶抑制率为响应值，进行响应面试验设计，进一步优化马尾藻 MAAs 提取工艺，结果见表 3。各交互因素对马尾藻 MAAs 得率及其对酪氨酸酶活性的抑制率的响应面图和等高线图见补充材料（详见本刊官网 https://www.spgykj.com/文章的网络版）。

采用 Design-Expert13.1.0.1 软件分别对表 3 中试验结果进行回归分析，得到回归模型（1）和（2）。

从表 4 可知，马尾藻 MAAs 得率的模型 F=

表 3 响应面法试验设计与结果

Table 3 Experimental design and results of response surface method

试验号	A提取温度	B液料比	C提取时间	D甲醇浓度	得率(%)	酶抑制率(%)
1	−1	−1	0	0	6.40	56.9
2	1	−1	0	0	7.41	65.8
3	−1	1	0	0	6.84	56.9
4	1	1	0	0	7.70	67.7
5	0	0	−1	−1	7.80	65.2
6	0	0	1	−1	7.96	68.4
7	0	0	−1	1	7.97	68.1
8	0	0	1	1	8.20	72.5
9	−1	0	0	−1	6.75	57.8
10	1	0	0	−1	7.50	64.9
11	−1	0	0	1	7.04	55.7
12	1	0	0	1	7.74	67.9
13	0	−1	−1	0	7.70	70.3
14	0	1	−1	0	8.05	70.1
15	0	−1	1	0	8.05	70.4
16	0	1	1	0	8.30	74.5
17	−1	0	−1	0	6.38	59.1
18	1	0	−1	0	7.24	63.2
19	−1	0	1	0	6.50	59.5
20	1	0	1	0	7.62	68.5
21	0	−1	0	−1	7.85	66.8
22	0	1	0	−1	8.10	69.7
23	0	−1	0	1	8.02	70.8
24	0	1	0	1	8.60	72.9
25	0	0	0	0	9.03	78.6
26	0	0	0	0	9.25	76.7
27	0	0	0	0	8.97	77.8
28	0	0	0	0	9.17	77.9
29	0	0	0	0	8.90	76.7

表 4 马尾藻 MAAs 得率为响应值的回归模型方差分析结果

Table 4 ANOVA results of the regression model with the yield of *Scagassum* sp. MAAs as the response value

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	18.1	14	1.29	90.2	<0.0001	**
A-提取温度	2.34	1	2.34	163.35	<0.0001	**
B-液料比	0.39	1	0.39	27.13	0.0001	**
C-提取时间	0.19	1	0.19	12.91	0.0029	**
D-甲醇浓度	0.22	1	0.22	15.07	0.0017	**
AB	5.63	1	5.63	0.39	0.5411	不显著
AC	0.017	1	0.017	1.18	0.2958	不显著
AD	6.25	1	6.25	0.044	0.8376	不显著
BC	2.50	1	2.50	0.17	0.6825	不显著
BD	0.027	1	0.027	1.9	0.1897	不显著
CD	1.23	1	1.23	0.085	0.7743	不显著
A^2	13.9	1	13.9	969.68	<0.0001	**
B^2	1.47	1	1.47	102.63	<0.0001	**
C^2	2.59	1	2.59	181.03	<0.0001	**
D^2	1.1	1	1.1	76.99	<0.0001	**
残差	0.2	14	0.014			
失拟项	0.12	10	0.012	0.57	0.7854	不显著
纯误差	0.083	4	0.021			
总误差	18.3	28				

注: **表示影响极显著(P<0.01), *表示影响显著(P<0.05), 表5同。

90.2, P<0.0001, 表明此回归模型极显著; 失拟值 P=0.7854>0.05, 表明失拟项与纯误差不显著相关, 拟合程度好; 决定系数 R^2=0.9890, C.V.=1.53%。因此, 该方程可用于分析和预测马尾藻 MAAs 得率: Y_1=9.06+0.44A+0.18B+0.12C+0.13D−0.038AB+0.065AC−0.012AD−0.025BC+0.083BD+0.017CD−1.46A^2−0.48B^2−0.63C^2−0.41D^2。

从表 4 可以看出, 模型自变量一次项 A、B、C 和 D 对 MAAs 得率呈极显著(P<0.01)影响, 但其交互作用对 MAAs 得率的影响并不显著(P>0.05); 二次项 A^2、B^2、C^2 和 D^2 对 MAAs 得率有极显著(P<0.01)影响, 表明各因素对 MAAs 得率的影响不是简单的线性关系。由 F 值大小可以看出, 4 个因素对马尾藻 MAAs 得率的影响顺序为 A>B>D>C, 即提取温度>液料比>甲醇浓度>提取时间。

如表 5 所示, 马尾藻 MAAs 酪氨酸酶抑制率的回归模型 F=47.65, P<0.0001, 该回归模型极显著; 失拟项 P=0.1234, 决定系数 R^2=0.9794, C.V.=2.01%, 表明该响应面模型拟合程度好、回归模型稳定, 可用于分析和预测 MAAs 提取物对酪氨酸酶活性的抑制率。Y_2=77.54+4.34A+0.90B+1.48C+1.26D+0.47AB+1.22AC+1.27AD+1.07BC−0.20BD+0.30CD−11.77A^2−3.15B^2−3.53C^2−4.67D^2。

表 5 马尾藻 MAAs 酶抑制率为响应值的回归模型方差分析结果

Table 5 ANOVA results of the regression model with the inhibition rate of MAAs enzyme in *Scagassum* sp. MAAs as the response value

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
模型	1244.85	14	88.92	47.65	<0.0001	**
A-提取温度	226.2	1	226.2	121.23	<0.0001	**
B-液料比	9.72	1	9.72	5.21	0.0386	*
C-提取时间	26.4	1	26.4	14.15	0.0021	**
D-甲醇浓度	19	1	19	10.18	0.0065	**
AB	0.9	1	0.9	0.48	0.4981	不显著
AC	6	1	6	3.22	0.0945	不显著
AD	6.5	1	6.5	3.48	0.083	不显著
BC	4.62	1	4.62	2.48	0.1378	不显著
BD	0.16	1	0.16	0.086	0.7739	不显著
CD	0.36	1	0.36	0.19	0.6672	不显著
A^2	897.96	1	897.96	481.24	<0.0001	**
B^2	64.5	1	64.5	34.57	<0.0001	**
C^2	80.75	1	80.75	43.28	<0.0001	**
D^2	141.21	1	141.21	75.68	<0.0001	**
残差	26.12	14	1.87			
失拟项	23.39	10	2.34	3.42	0.1234	不显著
纯误差	2.73	4	0.68			
总误差	1270.97	28				

在表 5 中, 模型自变量一次项 A、C、D 对酪氨酸酶抑制率影响呈极显著水平(P<0.01), B 的影响呈显著水平(P<0.05), 其交互因素对抑制率影响不显著(P>0.05)。在二次项中, A^2、B^2、C^2 和 D^2 极显著

(P<0.01)，说明各影响因素不是简单的线性关系；由 F 值大小可以看出，马尾藻 MAAs 酪氨酸酶抑制率的影响因素顺序为 A>C>D>B，即提取温度>提取时间>甲醇浓度>液料比。

用 Design-Expert13.1.0.1 软件可以以马尾藻 MAAs 得率和酶抑制率为目标进行预测，得到一个最佳实验条件：提取温度 40.9 ℃，液料比 25.93 mL/g，提取时间 2.59 h，甲醇浓度 30.85%，马尾藻 MAAs 得率预测值为 9.13%，酪氨酸酶活性的抑制率预测值为 78.36%。为方便操作，设定提取温度为 41 ℃，液料比为 26 mL/g，提取时间为 2.6 h，甲醇浓度为 31%，进行实验验证，重复实验 3 次。最终，马尾藻 MAAs 得率为 8.987%±0.73%，MAAs 提取物对酪氨酸酶活性的抑制率为 77.69%±0.23%。该验证结果与回归模型预测结果非常(P>0.05)接近，说明模型可靠，可用于分析马尾藻 MAAs 提取工艺。通过双指标协同优化，既实现了 MAAs 的高效提取，又保障了其酶抑制活性，为开发兼具提取效率与生物活性的功能性提取物提供了科学依据。

2.2　马尾藻 MAAs 化学成分分析

2.2.1　定性分析　采用响应面试验优化的因素水平，制备马尾藻 MAAs 提取物，对其进行定性定量分析。马尾藻 MAAs 在硅胶板上呈现一个明显的黄色斑点，这一现象是含氮化合物的典型阳性反应[16]，表明马尾藻 MAAs 中很可能存在 MAAs 成分(图 5a)。紫外光谱检测表明，马尾藻 MAAs 在 240~400 nm 范围内存在明显吸收，最大吸收波长为 306 nm(图 5b)，为 MAAs 的特征吸收范围[14]。研究者采用薄层层析和紫外光谱检测了某些大型海藻是否含有 MAAs[16]。本文采用这种方法确定了马尾藻 MAAs 提取物中含有 MAA(s)。高效液相色谱检测表明，马尾藻 MAAs 提取物包含比较多的组分，其中，保留时间 2.98 min 吸收峰最明显，吸收波长为 330 nm，符合常见 MAAs 特征吸收(图 5c)。

2.2.2　定量分析　从表 6 可以看出，马尾藻 MAAs 中除了主要含有 MAAs 外，还含有蛋白质、多酚、多糖和黄酮。其中，多糖含量可达 27.47±1.65 mg/g，蛋白质、多酚和黄酮含量分别为 17.43±0.93、20.28±0.46 和 18.49±1.36 mg/g。表 6 的定量检测结果也与图 5(c)检测出的马尾藻 MAAs 提取物含有主要的 MAAs 吸收峰和多个杂峰相符。

表 6　马尾藻 MAAs 提取物组成分析

Table 6　Compound composition analysis of MAA extracts from *Sargassum* sp.

生物活性物质	MAAs	蛋白质	多酚	黄酮	多糖
含量(mg/g)	48.31±1.74	17.43±0.93	20.28±0.46	18.49±1.36	27.47±1.65

上述定性定量检测结果表明，采用响应面试验优化获得的马尾藻 MAAs 提取物中主要组成为 MAAs，还含有多糖等非目标物。在后续研究中，可以进行凝胶柱层析或硅胶柱层析，将 MAAs 与多糖等其他组分分离。

2.3　马尾藻 MAAs 体外抗氧化活性的测定

2.3.1　MAAs 对 DPPH 自由基清除能力　以曲酸为阳性对照，测定马尾藻 MAAs 清除 DPPH 自由基的能力(图 6)。结果表明，随着曲酸及马尾藻 MAAs 浓度的升高，两者清除 DPPH 自由基的能力逐渐增强，曲酸和马尾藻 MAAs 都表现出较强的(P<0.05) DPPH 自由基清除能力，它们对 DPPH 自由基清除的 IC_{50} 分别为 0.15±0.04 mg/mL 和 0.17±0.06 mg/mL。马尾藻 MAAs 作为一类提取物展现出了与曲酸比较接近的清除 DPPH 自由基的能力。目前，已见大型海藻提取物具有清除 DPPH 自由基能力的报道。例如，裙带菜(*Alaria esculenta*)海藻酸[30]、趾状海带(*Laminaria digitata*)多糖[31] 等，但它们清除 DPPH 自由基的 IC_{50} 明显大于马尾藻 MAAs。

2.3.2　MAAs 对 $ABTS^+$自由基清除能力　马尾藻 MAAs 对 $ABTS^+$自由基清除能力的结果如图 7 所示，随着 MAAs 浓度的升高，其清除 $ABTS^+$自由基的能力显著(P<0.05)增强。相比而言，低浓度曲酸表现出更强的(P<0.01)$ABTS^+$自由基清除能力，其对 $ABTS^+$自由基清除的 IC_{50} 为 0.42±0.11 mg/mL，马尾藻 MAAs 对 $ABTS^+$自由基清除的 IC_{50} 为 1.03±0.21 mg/mL，明显弱于曲酸。然而，马尾藻 MAAs 对 $ABTS^+$自由基的清除能力要明显好于海藻多酚[32]

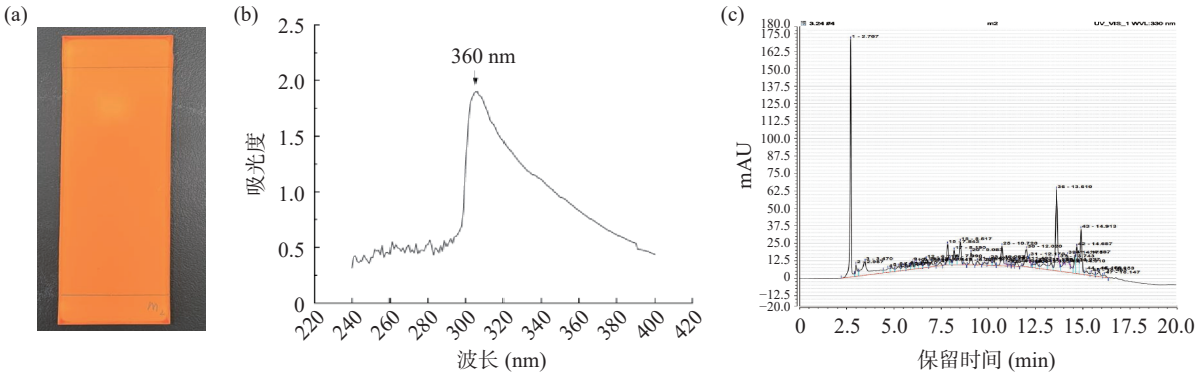


图 5　马尾藻 MAAs 提取物的硅胶薄层层析(a)、紫外光谱(b)和高效液相色谱(c)检测

Fig.5　TLC detection on silica gel (a), ultraviolet wavelength scanning (b) and HPLC (c) of MAA extracts from *Sargassum* sp.

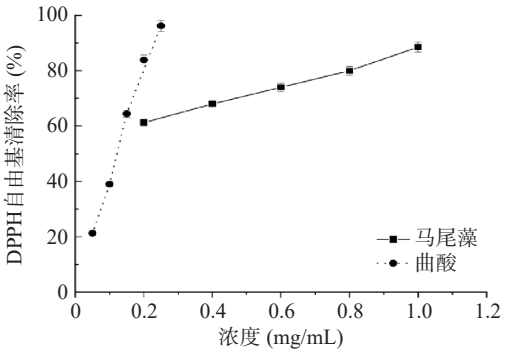


图 6 马尾藻 MAAs 提取物的 DPPH 自由基清除率

Fig.6 Scavenging effect of MAA extracts from *Sargassum* sp. on DPPH radical

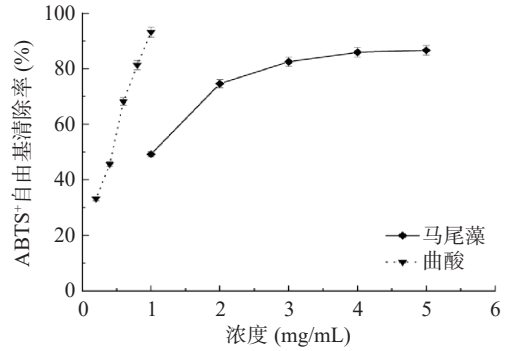


图 7 马尾藻 MAAs 提取物的 $ABTS^+$自由基清除率

Fig.7 Scavenging effect of MAA extracts from *Sargassum* sp. on $ABTS^+$ radical

和海藻多糖[33] 等大型海藻活性物质。

2.4 MAAs 对铜离子的螯合能力

由图 8 可知, 随着 MAAs 浓度的增大, 马尾藻 MAAs 对铜离子的螯合率逐渐上升, 不同浓度组间螯合率差异显著(P<0.05), 呈现明显的浓度依赖性, 其对铜离子的半螯合质量浓度为 0.70±0.21 mg/mL。酪氨酸酶是一种含有铜离子作为活性中心的金属酶[1], 在催化酪氨酸或多巴氧化的过程中, 底物首先必须与活性中心的铜离子相互作用, 随后才会发生亲电取代反应, 进而实现底物的氧化[34]。当活性铜离子被占据时, 催化反应便无法进行[35]。马尾藻 MAAs 凭借其铜离子螯合的特性, 与酪氨酸酶的活性中心竞争, 通过占据活性中心, 抑制酪氨酸酶的活性。研究指出, 某些 MAAs 能螯合 Fe^{3+}、Fe^{2+}和 Ca^{2+}, 例如 palythine、poryphyra-334 和 shinorine 等常见 MAA, MAAs 螯合金属离子是因为它们含有多个–OH、$–NH_2$ 和–COOH 等[36]。本研究中, 马尾藻 MAAs 对铜离子也呈现出一定的螯合能力, 尽管目前尚未鉴定马尾藻 MAAs 的组成, 但从 MAAs 基本结构来看, MAA 均含有多个–OH、$–NH_2$ 和–COOH, 从而, 马尾藻 MAAs 呈现出了螯合铜离子的能力。

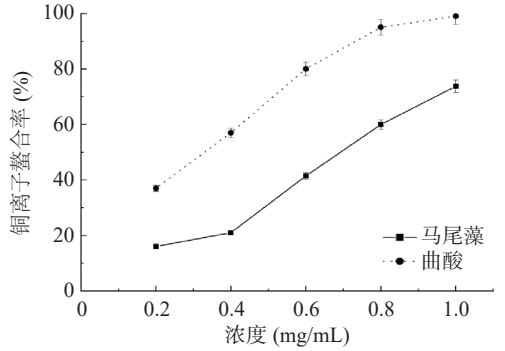


图 8 马尾藻 MAAs 提取物的铜离子螯合率

Fig.8 Chelating effect of MAA extracts from *Sargassum* sp. on copperion

2.5 马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶活力的影响

2.5.1 马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶活性的抑制作用

图 9 表明, 在一定浓度范围内, 不同浓度的马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶活性有显著(P<0.05)抑制作用, 并且随着 MAAs 浓度的升高, 对酪氨酸酶活性的抑制作用逐渐增强。MAAs 对酪氨酸酶活性的 IC_{50} 为 2.23±0.32 mg/mL, 曲酸对酪氨酸酶活性的 IC_{50} 为 0.158±0.02 mg/mL, 马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶活性的抑制作用明显弱于曲酸, 但要明显好于海藻多肽 IC_{50} 值为 5.76±0.06 mg/mL[37]、海藻多糖 IC_{50} 值为 2.16±0.37 mg/mL[38] 等提取物。结果表明, 马尾藻 MAAs 具有开发为酪氨酸酶抑制剂的潜力。在后续研究中, 将对马尾藻 MAAs 提取物进行分离, 提高其纯度将可能增强马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶活性的抑制作用。

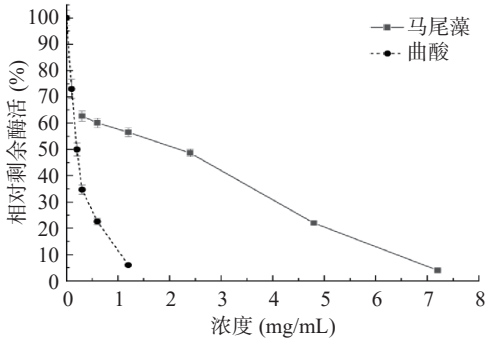


图 9 马尾藻 MAAs 提取物对酪氨酸酶活力的抑制作用

Fig.9 Inhibition of MAA extracts from *Sargassum* sp. against the activity of tyrosinase

2.5.2 马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶活性的抑制动力学

固定底物左旋多巴的浓度, 改变酪氨酸酶浓度时,

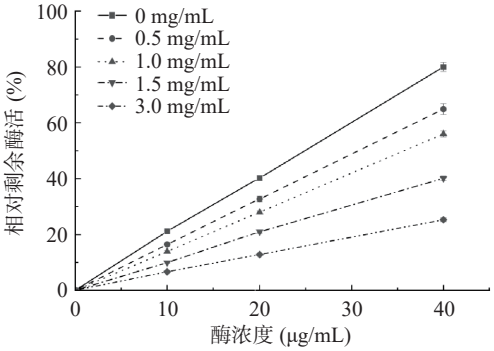


图 10 马尾藻 MAAs 提取物对酪氨酸酶的抑制机理

Fig.10 Inhibition mechanism of MAA extracts from *Sargassum* sp. against the activity of tyrosinase

绘制了不同浓度马尾藻 MAAs 溶液的相对剩余酶活与酪氨酸酶不同浓度的曲线图。如图 10 所示，所得直线均经过原点，并且，随着马尾藻 MAAs 提取物溶液浓度的升高，斜率均随抑制剂浓度的增大而减小，这说明马尾藻 MAAs 提取物对酪氨酸酶的抑制作用属于可逆过程[39]。即马尾藻 MAAs 提取物通过非共价键与酪氨酸酶的某些关键基团相互作用，抑制了其催化活性，导致反应速率降低[39]。这种结合方式不会直接引起酶分子结构的永久性变性，从而保持了酶活性[40]。相较于不可逆抑制剂，可逆型抑制剂展现出较低的脱靶毒性和致敏感性。同时，马尾藻 MAAs 不会失活，因此能够在催化系统中发挥更持久的效果[41]。在已报道研究中，中药提取物[40]、海藻多糖[38]等均属于可逆型抑制剂。

根据 Lineweaver-Burk 双倒数法可以判断抑制剂的抑制类型，以底物浓度倒数为横坐标，反应速率的倒数为纵坐标作图，直线相交于 y 轴为竞争型抑制，相交于 x 轴为非竞争型抑制，相交于第二象限或第四象限为混合型抑制[42]。如图 11(a)所示，当酪氨酸酶浓度固定，改变左旋多巴底物浓度时，马尾藻 MAAs 提取物的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图交叉点在第二象限，因此推测马尾藻 MAAs 提取物一方面通过竞争抑制作用与酪氨酸酶结合，另一方面通过非竞争性抑制作用与底物-酪氨酸酶复合物结合，这表明马尾藻 MAAs 提取物对酪氨酸酶的抑制类型属于混合型抑制。

将直线的斜率和垂直截距对马尾藻 MAAs 浓度进行二次作图，如图 11(b)和图 11(c)所示，拟合直线的斜率(K_m/V_{max})和 Y 轴截距($1/V_{max}$)均通过线性拟合得到，且呈现出上升趋势。说明米氏常数(K_m)值随着抑制剂浓度的增加而增加，而最大反应速率(V_{max})的值随之不断减小。图 11(b)和图 11(c)各组拟合直线均呈现出良好的线性关系，表明其与酪氨酸酶有 1 个或 1 类抑制位点[43]。抑制常数 K_I 和 K_{IS} 的值分别为 0.95 mg/mL 和 0.27 mg/mL，抑制常数 $K_I>K_{IS}$(表 7)，表明马尾藻 MAAs 与酶-底物复合物的结合比游离酶的结合更容易且更紧密[44]。

表 7　马尾藻 MAAs 提取物对酪氨酸酶的抑制动力学和参数
Table 7　Inhibitory kinetics and parameters of MAA extracts from *Sargassum* sp. for the activity of tyrosinase

浓度 (mg/mL)	动力学参数				IC_{50} (mg/mL)	抑制机制	抑制类型
	V_{max} (A/min)	K_m (mg/mL)	K_I (mg/mL)	K_{IS} (mg/mL)			
0	0.050	2.384					
0.2	0.043	2.921					
0.4	0.035	3.929	0.95	0.27	1.091±0.32	可逆	混合型
0.6	0.030	4.399					
0.8	0.028	4.794					

2.6　酪氨酸酶荧光猝灭作用

在 280 nm 的激发波长下，酪氨酸酶在 375 nm 处有荧光发射峰，当加入马尾藻 MAAs 后，酪氨酸酶的荧光强度明显降低，且呈现出一定的剂量依赖性(图 12)。酪氨酸酶的内源性荧光是由酪氨酸酶中的色氨酸等发色基团残基产生的，当酪氨酸酶的疏水性

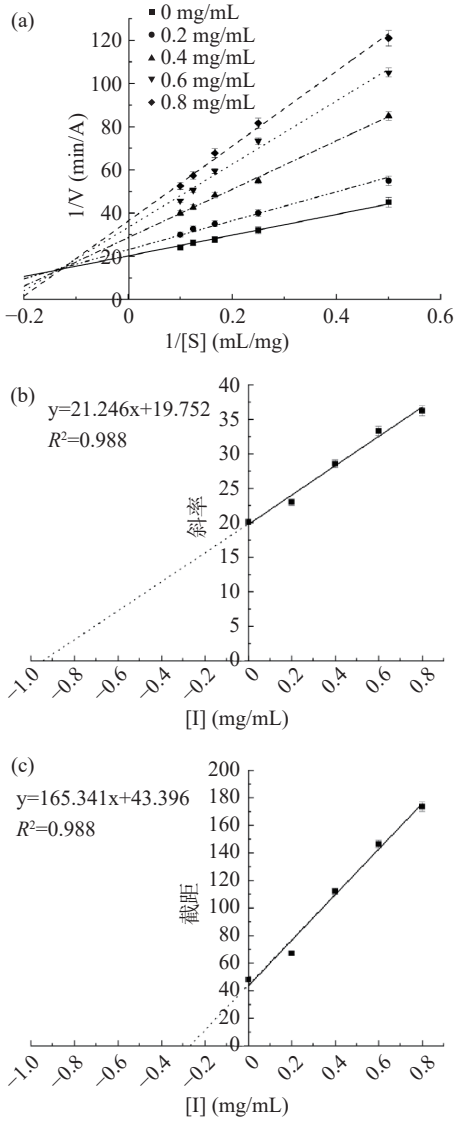


图 11　马尾藻 MAAs 提取物对酪氨酸酶活性抑制作用的 Lineweaver-Burk 图

Fig.11　Lineweaver-Burk plot of the inhibitory effect of MAA extracts from *Sargassum* sp. on the activity of tyrosinase

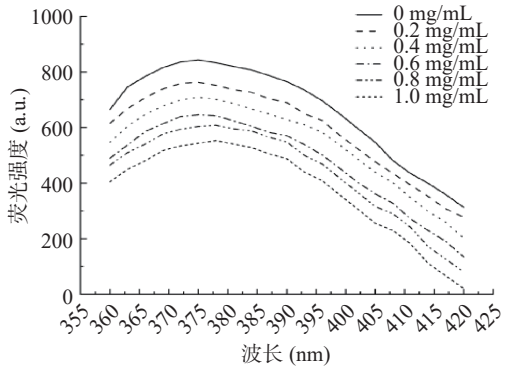


图 12　不同浓度马尾藻 MAAs 提取物下酪氨酸酶的荧光猝灭光谱图

Fig.12　Fluorescence quenching spectra of tyrosinase under the different concentration of MAA extracts from *Sargassum* sp.

或构象发生改变时，会引起荧光强度的下降或最大吸收峰的红移或蓝移[45]。在马尾藻 MAAs 加入后，酪氨酸酶最大吸收峰在 378 nm，出现了红移，这表明马尾藻 MAAs 与酪氨酸酶相结合导致了酪氨酸酶的构象发生改变。

通过上述研究，本文初步探明了马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶活性的抑制作用机理，即马尾藻 MAAs 通过螯合铜离子，与酪氨酸酶的活性中心竞争，抑制酪氨酸酶的活性，并促使酪氨酸酶构象发生变化，进而导致酪氨酸酶的活性降低。马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶的抑制是可逆的、混合型抑制作用。后续研究将集中在马尾藻 MAAs 的纯化，制备对酪氨酸酶活性具有强烈抑制活性的单体 MAA，探索此 MAA 在食品中的应用。

2.7 相关性分析

在本文中，马尾藻 MAAs 提取物中还包含多糖、蛋白质、多酚和黄酮等非目标物，为了明确 MAAs 提取物中 MAAs 清除 DPPH 和 $ABTS^+$自由基的能力及其对酪氨酸酶活性的抑制作用之间的关系，进行了相关性分析，结果见图 13。由图 13 可知，MAAs、多酚、黄酮和多糖含量与 DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除率以及酪氨酸酶活性的抑制率呈正相关。其中，MAAs 含量与其对 DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除率以及酪氨酸酶活性的抑制率之间呈显著正相关($P<0.05$)，相关系数 R^2 分别为 0.78、0.76 和 0.74；而蛋白质含量与 DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除率以及酪氨酸酶活性的抑制率之间呈现负相关。这说明相比于黄酮、多酚与多糖，马尾藻 MAAs 提取物中的 MAAs 是清除 DPPH 和 $ABTS^+$自由基和抑制酪氨酸酶活性的主要原因，蛋白质则对 DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除以及抑制酪氨酸酶活性无积极作用。

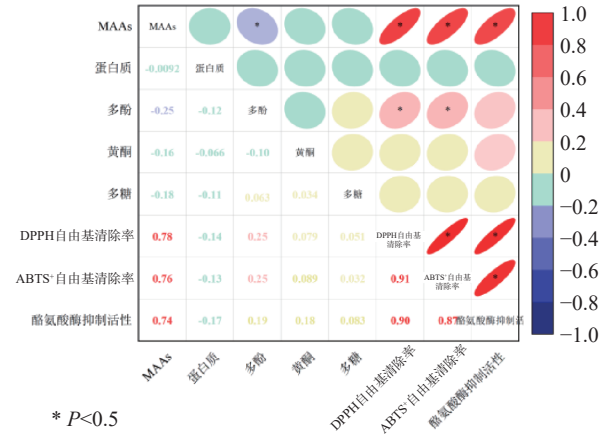


图 13 马尾藻 MAAs 提取物化学成分与生物活性相关性

Fig.13 Correlation of chemical composition and biological activity of MAA extracts from *Sargassum* sp.

注：红、蓝色分别表示正、负相关的关系，圆圈越扁相关系数的绝对值越大，相关性越强；图中数字表示 Pearson 相关系数 R^2，其绝对值越大表示相关性越强；**表示极显著相关($P<0.01$)，*表示显著相关($P<0.05$)。

3 结论

采用一系列单因素和响应面实验，建立了马尾藻 MAAs 的提取工艺。提取温度为 41 ℃，液料比为 26 mL/g，提取时间为 2.6 h，甲醇浓度为 31%。制备到的 MAAs 得率为 89.87±0.73 mg/g，马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶抑制率 IC_{50} 值为 2.23±0.32 mg/mL。马尾藻 MAAs 对 DPPH 和 $ABTS^+$自由基清除作用的 IC_{50} 值分别为 0.17±0.06 mg/mL 和 1.03±0.21 mg/mL。通过酶动力学、荧光光谱等方法，明确了马尾藻 MAAs 对酪氨酸酶活性的抑制作用为可逆的、混合型抑制，推测马尾藻 MAAs 通过与酪氨酸酶活性中心的铜离子螯合，改变酪氨酸酶构象，从而实现对酪氨酸酶活性的抑制。在后续研究中，将采用 3D 荧光光谱和 CD 光谱来验证酪氨酸酶构象的变化。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 李莉莉，邢蕊，邓阳阳，等. 酪氨酸酶抑制剂的研究新进展[J]. 食品工业，2016，37(8)：235−239. [LI Lili, XING Rui, DENG Yangyang, et al. New developments of tyrosinase inhibitors[J]. The Food Industry, 2016, 37(8): 235−239.]

[2] MARTÍNEZ-ALVAREZ O, ELVIRA L C M, MONTERO P, et al. The effect of different melanosis-inhibiting blends on the quality of frozen deep-water rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*)[J]. Food Control, 2020, 109: 106889.

[3] NAGATSU T, NAKASHIMA A, WATANABE H, et al. Neuromelanin in Parkinson's disease: Tyrosine hydroxylase and tyrosinase[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(8): 4176.

[4] BELTRAN E, SERAFINI M R, ALMEIDA ALVES I, et al. Novel synthesized tyrosinase inhibitors: A systematic patent review (2012-present)[J]. Current Medicinal Chemistry, 2024, 31(3): 308−335.

[5] 李盼盼，杨胜祥，庞林江，等. 甘薯叶提取物对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 食品研究与开发，2022，43(22)：8−14. [LI Panpan, YANG Shengxiang, PANG Linjiang, et al. Inhibitory effect of sweet potato leaf extracts on tyrosinase[J]. Food Research and Development, 2022, 43(22): 8−14.]

[6] SONG Yuqiong, CHEN Shengjun, LI Laihao, et al. The hypopigmentation mechanism of tyrosinase inhibitory peptides derived from food proteins: An overview[J]. Molecules, 2022, 27(9): 2710.

[7] SARITHAKUMARI C H, KURUP G M. Alginic acid isolated from *Sargassum wightii* exhibits anti-inflammatory potential on type II collagen induced arthritis in experimental animals[J]. International Immunopharmacology, 2013, 17(4): 1108−1115.

[8] 刘志强，梁桂珠，王皓，等. 中国海藻养殖的碳汇及环境效益分析[J]. 中国生态农业学报(中英文)，2024，32(9)：1578−1591. [LIU Zhiqiang, LIANG Guizhu, WANG Hao, et al. Carbon sink and environmental benefit analysis of seaweed cultivation in China[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2024, 32(9): 1578−1591.]

[9] 薛卫，王培培，吴文惠，等. 海洋植物多糖及其在食品工业应

用的研究进展[J]. 中国酿造, 2022, 41(10): 1−7. [XUE Wei, WANG Peipei, WU Wenhui, et al. Research progress of polysaccharides from marine plants and their applications in food industry[J]. China Brewing, 2022, 41(10): 1−7.]
[10] 袁慧情, 胡佳敏, 刘思溢, 等. 马尾藻多糖拮抗 LPS 诱导的巨噬细胞极化及铁死亡[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(10): 2034−2040. [YUAN Huiqing, HU Jiamin, LIU Siyi, et al. *Sargassum* polysaccharides antagonize LPS-induced macrophage polarization and ferroptosis[J]. Chinese Journal of Immunology, 2023, 39(10): 2034−2040.]
[11] WANG Lei, YANG H W, AHN G, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of sulfated polysaccharides isolated from the edible brown seaweed, *Sargassum fulvellum*[J]. Marine Drugs, 2021, 19(5): 277.
[12] 韩玥颖, 张自业, 李自豪, 等. 马尾藻多酚的提取纯化工艺优化及其对虾原肌球蛋白致敏性的消减作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(7): 93−102. [HAN Yueying, ZHANG Ziye, LI Zihao, et al. Optimization of extraction and purification of polyphenol from *Sargassum carpophyllum* and its attenuating effects on the allergenicity of shrimp tropomyosin[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2024, 15(7): 93−102.]
[13] YIM S K, KIM K, KIM I H, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 virus entry by the crude polysaccharides of seaweeds and abalone viscera *in vitro*[J]. Marine Drugs, 2021, 19(4): 219.
[14] OREN A, GUNDE-CIMERMAN N. Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites?[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 269(1): 1−10.
[15] SUN Yingying, ZHANG Naisheng, ZHOU Jing, et al. Distribution, contents, and types of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine macroalgae and a database for MAAs based on these characteristics[J]. Marine Drugs, 2020, 18(1): 43.
[16] FIGUEROA F L. Mycosporine-like amino acids from marine resource[J]. Marine Drugs, 2021, 19(1): 18.
[17] 朱文轩, 钱亮亮, 程同杰, 等. 4 种大型褐藻类菌胞素氨基酸的提取工艺优化及鉴定[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(4): 114−121. [ZHU Wenxuan, QIAN Liangliang, CHENG Tongjie, et al. Extraction process and identification of mycosporine-like amino acids from 4 species of brown macroalga[J]. Food Research and Development, 2023, 44(4): 114−121.]
[18] SINHA R P, SINGH S P, HÄDER D P. Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2007, 89(1): 29−35.
[19] CHUANG Lifan, CHOU Hongnong, SUNG P J. *Porphyra*-334 isolated from the marine algae *Bangia atropurpurea*: Conformational performance for energy conversion[J]. Marine Drugs, 2014, 12(9): 4732−4740.
[20] 孙颖颖, 杨子轩, 周静, 等. 大型海藻类菌孢素氨基酸提取工艺及定性检测研究[J]. 食品科技, 2021, 46(3): 205−211. [SUN Yingying, YANG Zixuan, ZHOU Jing, et al. Extraction process and a qualitative detection method of mycosporine-like amino acids from six species of marine macroalgae[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(3): 205−211.]
[21] 倪丹, 蒋新元, 唐玉莲, 等. 鞣花酸抑制酪氨酸酶的动力学、荧光光谱分析及分子对接[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 104−112. [NI Dan, JIANG Xinyuan, TANG Yulian, et al. Kinetic, fluorescence spectroscopy and molecular docking studies of tyrosinase inhibition by ellagic acid[J]. Food Science, 2024, 45(2): 104−112.]
[22] 胡晓琪, 徐沈晨, 王思宇, 等. 石莼类菌孢素氨基酸的提取工艺及对副溶血弧菌的抑菌机理[J]. 食品工业科技, 2024, 45(18): 175−183. [HU Xiaoqi, XU Shenchen, WANG Siyu, et al. Research of extraction process of mycosporine-like amino acids of *Ulva lactuca* and its mechanism of anti-bacterial properties against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(18): 175−183.]
[23] 吕媛, 马钰, 冯志明, 等. 二喹啉甲酸法在牛奶蛋白质定量中的应用[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 151−154. [LÜ Yuan, MA Yu, FENG Zhiming, et al. Bicinchoninic acid method for determination of protein content in milk[J]. Food Science, 2010, 31(6): 151−154.]
[24] 刘丽香, LAURA T, 梁兴飞, 等. Folin-Ciocalteu 比色法测定苦丁茶中多酚含量[J]. 茶叶科学, 2008, 28(2): 101−106. [LIU Lixiang, LAURA T, LIANG Xingfei, et al. Determination of the total content of polyphenols in Kudincha by Folin-Ciocalteu colorimetry[J]. Journal of Tea Science, 2008, 28(2): 101−106.]
[25] 张霞, 刘伟锐, 姜蕊, 等. 不同产地、采收时间的苣荬菜地上部位总黄酮含量的考察[J]. 中南药学, 2015, 13(4): 417−420. [ZHANG Xia, LIU Weirui, JIANG Rui, et al. Determination of the total flavonoids from the aerial part of *Sonchus arvensis* L. in different regions and time[J]. Central South Pharmacy, 2015, 13(4): 417−420.]
[26] 钟方晓, 任海华, 李岩. 多糖含量测定方法比较[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 1916−1917. [ZHONG Fangxiao, REN Haihua, LI Yan. Comparison of methods in determination of polysaccaride content[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2007, 18(8): 1916−1917.]
[27] YANG H, WANG Z, SONG W, et al. Isolation of proanthocyanidins from Pinus thunbergii needles and tyrosinase inhibition activity[J]. Process Biochemistry, 2021, 100: 245−251.
[28] 何毅帆, 龙芸鸾, 李征, 等. 天然植物美白成分作用机理的研究进展[J]. 日用化学品科学, 2022, 45(10): 37−43. [HE Yifan, LONG Yunluan, LI Zheng, et al. Research progress on the mechanism of natural plant skin-whitening ingredients[J]. Detergent & Cosmetics, 2022, 45(10): 37−43.]
[29] 李帅浩, 谭充, 冯子健, 等. 茶多酚对酪氨酸酶的抑制作用及分子机制研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(15): 40−46. [LI Shuaihao, TAN Chong, FENG Zijian, et al. Inhibitory effect of tea polyphenols on tyrosinase and its molecular mechanism[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(15): 40−46.]
[30] de LIMA X B T, FRANCHIN M, MOHAMMADI N, et al. Designing sustainable antioxidant and anti-inflammatory ingredients from seaweeds for functional gummies[J]. Future Foods, 2024, 10: 100474.
[31] ZHU Xianglu, HEALY L, WANIGASEKARA J, et al. Characterisation of laminarin extracted from brown seaweed *Laminaria digitata*, using optimized ultrasound- and ultrafiltration-assisted extraction method[J]. Algal Research, 2023, 75: 103277.
[32] EBRAHIMI F, SUBBIAH V, AGAR O T, et al. LC-ESI-QTOF-MS/MS characterization of phenolic compounds from Victorian shorebound red seaweeds and their antioxidant capacity[J]. Algal Research, 2024, 82: 103609.
[33] PREMARATHNA A D, AHMED T A E, KULSHRESHTHA G, et al. Polysaccharides from red seaweeds: Effect of extraction methods on physicochemical characteristics and antioxidant activities[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 147: 109307.
[34] 孙笑, 乔青安, 刘昌春, 等. 酪氨酸酶催化反应机理的研究进

展[J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 2016, 32(4): 345−350. [SUN X, QIAO Q A, LIU C C, et al. Research progress on tyrosinase-catalyzed reaction mechanism[J]. Journal of Ludong University (Natural Science Edition), 2016, 32(4): 345−350.]
[35] MENG Zan, DONG Tiantian, MALIK A U, et al. Harvest maturity affects the browning of fresh-cut potatoes by influencing contents of amino acids[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 173: 111404.
[36] VARNALI T, BOZOFLU M, ŞENGÖNÜL H, et al. Potential metal chelating ability of mycosporine-like amino acids: A computational research[J]. Chemical Papers, 2022, 76(4): 2279−2291.
[37] 王迪, 宾雁林, 赵大洲, 等. 螺旋藻中酪氨酸酶抑制活性多肽的研究[J]. 现代食品, 2022, 28(23): 167−170. [WANG Di, BIN Yanlin, ZHAO Dazhou, et al. Study on tyrosinase inhibitory activity peptide from spirulinaon[J]. Modern Food, 2022, 28(23): 167−170.]
[38] 张捷, 陈忠浩, 叶森, 等. 羊栖菜多糖提取物对酪氨酸酶的抑制作用研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 116−120. [ZHANG Jie, CHEN Zhonghao, YE Sen, et al. Study on inhibition effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on activity of tyrosinase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(20): 116−120.]
[39] 丁小梅, 户晶晶, 孙乐常, 等. 轮型和球型高核钼簇对酪氨酸酶的抑制作用[J]. 分子科学学报, 2020, 36(4): 271−276,I0001. [DING Xiaomei, HU Jingjing, SUN Lechang, et al. Inhibition of tyrosinase by round and spherical high-nuclear molybdenum clusters[J]. Journal of Molecular Science, 2020, 36(4): 271−276, I0001.]
[40] HEMACHANDRAN H, ANANTHARAMAN A, MOHAN S, et al. Unraveling the inhibition mechanism of cyanidin-3-sophoroside on polyphenol oxidase and its effect on enzymatic browning of apples[J]. Food Chemistry, 2017, 227: 102−110.
[41] FARIDOON, NG R, ZHANG G P, et al. An update on the discovery and development of reversible covalent inhibitors[J]. Medicinal Chemistry Research, 2023, 32(6): 1039−1062.
[42] 涂彩霞, 刘之力, 任凤, 等. 47 种中药对酪氨酸酶活性的影响及酶动力学的研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(6): 456−458. [TU Caixia, LIU Zhili, REN Feng, et al. The effects of 47 traditional Chinese herbs on the activity of tyrosinase and enzyme kinetics[J]. China Journal of Leprosy and Skin Diseases, 2006, 22(6): 456−458.]
[43] FAN Yangyang, TAO Yanzhou, LIU Guiming, et al. Interaction study of engeletin toward cytochrome P450 3A4 and 2D6 by multi-spectroscopy and molecular docking[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2022, 264: 120311.
[44] LIU Yujia, ZHU Jie, YU Jiamei, et al. A new functionality study of vanillin as the inhibitor for α-glucosidase and its inhibition kinetic mechanism[J]. Food Chemistry, 2021, 353: 129448.
[45] SHENG Feng, WANG Yuning, ZHAO Xingchen, et al. Separation and identification of anthocyanin extracted from mulberry fruit and the pigment binding properties toward human serum albumin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(28): 6813−6819.