

响应面法优化黑玉米粒多糖提取工艺及其抗氧化活性分析

王燕, 段雪伟, 张敏君, 杨慧文, 刘冰, 由天辉

Optimization of Extraction Process of Polysaccharide from Black Corn Kernel by Response Surface Method and Analysis of Its Antioxidant Activity

WANG Yan, DUAN Xuewei, ZHANG Minjun, YANG Huiwen, LIU Bing, and YOU Tianhui

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023020118>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

双孢菇废弃菇柄多糖的超声波提取及其体外抗氧化活性

Optimization of ultrasonic extraction and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharide from *Agaricus bisporus* stipe

食品工业科技. 2018, 39(2): 163-167 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.02.031>

杨树口蘑多糖的超声波辅助提取工艺及其抗氧化活性

Optimization of ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Tricholoma populinum*

食品工业科技. 2018, 39(5): 180-184 <https://doi.org/>

响应面法优化新疆芜菁多糖提取工艺及体外抗氧化活性研究

Optimization the extraction process of polysaccharide by response surface methodology from *Brassica rapa* L. and its antioxidant activity

食品工业科技. 2018, 39(2): 229-233 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.02.043>

松乳菇多糖提取工艺优化及抗氧化活性评价

Optimization of extraction technology of polysaccharide and antioxidant activity determination from *Lactarius deliciosus*

食品工业科技. 2018, 39(4): 123-130 <https://doi.org/>

微波辅助提取牡丹籽粕多糖工艺优化及其体外抗氧化活性

Optimization of microwave-assisted extraction technology of polysaccharide from tree peony seed meal and evaluation of antioxidant activity *in vitro*

食品工业科技. 2018, 39(1): 167-171 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.01.031>

超声辅助提取灰灰菜多糖工艺优化及体外抗氧化活性

Optimal process of ultrasonic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Chenopodium album* Linn

食品工业科技. 2018, 39(1): 235-240,252 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.01.042>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

王燕, 段雪伟, 张敏君, 等. 响应面法优化黑玉米粒多糖提取工艺及其抗氧化活性分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(22): 191-200.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020118

WANG Yan, DUAN Xuewei, ZHANG Minjun, et al. Optimization of Extraction Process of Polysaccharide from Black Corn Kernel by Response Surface Method and Analysis of Its Antioxidant Activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(22): 191-200. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020118

· 工艺技术 ·

响应面法优化黑玉米粒多糖提取工艺及其 抗氧化活性分析

王 燕¹, 段雪伟¹, 张敏君¹, 杨慧文², 刘 冰², 由天辉^{1*}

(1. 广东药科大学护理学院, 广东广州 510006;

2. 广东药科大学药学院, 广东广州 510006)

摘要: 为探究黑玉米粒多糖的最佳提取工艺及其体外抗氧化活性。本研究以黑玉米粒为原材料, 采用超声辅助法提取黑玉米粒多糖, 探究超声功率、料液比、提取时间、提取温度、提取次数对黑玉米粒多糖得率的影响, 在此基础上结合响应面法优化黑玉米粒多糖提取工艺, 并通过测定 DPPH·、ABTS⁺、·OH 的清除率来评价黑玉米粒多糖的体外抗氧化能力。结果表明, 在料液比 1:20 (g/mL)、提取温度 74 °C、提取时间 60 min、提取 3 次的条件下, 黑玉米粒多糖得率最高, 可达 41.09%±0.59%。黑玉米粒多糖对 DPPH·、ABTS⁺、·OH 清除率的半数清除浓度 (IC₅₀) 分别为 1.959、1.529、0.3554 mg/mL, 且清除能力在一定范围内与浓度呈量效关系, 具有较强的体外抗氧化能力, 为其深入研究及开发利用提供重要依据。

关键词: 黑玉米粒, 多糖, 超声波, 提取工艺优化, 抗氧化活性

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)22-0191-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020118

本文网刊:



Optimization of Extraction Process of Polysaccharide from Black Corn Kernel by Response Surface Method and Analysis of Its Antioxidant Activity

WANG Yan¹, DUAN Xuewei¹, ZHANG Minjun¹, YANG Huiwen², LIU Bing², YOU Tianhui^{1*}

(1. School of Nursing, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to explore the optimum extraction process of polysaccharide and antioxidant activity *in vitro* in black corn kernel. In this study, black corn kernel was used as raw material, ultrasonic-assisted extraction was applied to extract polysaccharides from black corn kernel. To explore the effects of ultrasonic power, solid-liquid ratio, extraction time, temperature and frequency on the yield of polysaccharide. The extraction process of polysaccharide from black corn kernel was optimized by response surface methodology. Besides, the antioxidant activity of the polysaccharide was investigated by measuring its scavenging ability on DPPH·, ABTS⁺, and ·OH. The results showed that the extraction yield of polysaccharide from black corn kernel could reach up to 41.09%±0.59%, in these conditions: The solid-liquid ratio was 1:20 g/mL, the extraction temperature was 74 °C, the extraction time was 60 min and the extraction frequency was 3 times. The IC₅₀ values of scavenging rates on DPPH·, ABTS⁺ and ·OH were 1.959, 1.529 and 0.3554 mg/mL, respectively. Moreover, the scavenging rates showed a certain dose-effect relationship with the sample concentration, indicating that the polysaccharide had a strong antioxidant activity, thus providing a theoretical basis for further research and utilization.

收稿日期: 2023-02-14

基金项目: 广东省教育委员会项目 (2021KCXTD056)。

作者简介: 王燕 (1985-), 女, 硕士, 主管护师, 研究方向: 天然产物开发与利用, E-mail: 315021016@qq.com。

* 通信作者: 由天辉 (1973-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 慢性病护理, E-mail: youth888cn@aliyun.com。

Key words: black corn kernel; polysaccharide; ultrasonic; optimization of extraction process; antioxidant activity

黑玉米(*Zea mays* L.)是被子植物门单子叶植物纲,禾本目玉蜀黍属植物^[1]。黑玉米是玉米栽培品种的一种特殊类型,因富含大量黑色素而呈现黑色^[2]。黑玉米浑身都是宝,其粒、须、苞叶、芯、秸秆都可生产使用,且营养丰富,黑玉米粒中多糖、氨基酸等含量均超过了黄玉米粒,而且微量元素硒的含量是黄玉米粒的3~8.5倍^[3-4]。

多糖是一种广泛分布于动植物、藻类及微生物中的天然大分子聚合物,其由10个以上的单糖通过 α -或 β -糖苷键聚合形成^[5]。多项研究结果表明,植物多糖具有增强免疫力^[6]、抗疲劳^[7]、抗氧化^[8]、抑癌^[9]、降血糖^[10]、降血脂^[11]、抗病毒^[12]等功效。目前研究表明黑玉米粒多糖具有抗疲劳、降血糖等功效,杨占群等^[13-14]报道黑玉米粒多糖能够有效延长负重小鼠的运动时间,提高肌糖原和肝糖原的含量,降低尿素氮和乳酸的含量。Zhang等^[15]研究表明黑玉米粒多糖对四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠有显著的降血糖作用。而有关黑玉米粒多糖体外抗氧化活性的研究报道不多,因此有必要对黑玉米粒多糖的提取方法开展研究,并探讨其体外抗氧化活性。

植物多糖的提取方法有热水浸提法、酶解萃取法、微波或者超声波辅助萃取法等^[14]。魏俊青等^[3]用纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶分步酶法提取紫玉米多糖,多糖得率仅为8.42%,可见单用酶法得率较低。杨占群等^[14]采用微波辅助酶法提取黑玉米多糖,多糖得率为49.21%。关海宁等^[16]用超声辅助酶法提取黑玉米多糖,多糖得率为46.01%。微波或超声波辅助酶法均可大大提高黑玉米多糖的得率,但酶解法成本较高^[17],且采用微波辅助法得到的多糖分子量范围过广,会导致分支链分子质量的下降^[18],因而需要在保证提取率的同时降低成本,优化提取方法。超声波辅助热水提取法可利用超声波产生高速、强烈的空化效应增加固体与液体的界面接触,加速植物的高效萃取速度^[19],该方法操作简单,成本较低,具有高重现性被广泛应用于多糖提取^[20]。关海宁等^[21]用超声辅助水提醇沉法萃取黑玉米粒多糖,在超声功率180 W、超声温度60℃、pH6.8、醇沉浓度75%的最佳操作条件下,提取1次时多糖得率为16.11%。而研究发现提取时间、提取次数、液料比和超声功率是超声辅助提取多糖工艺优化中极受关注的变量参数^[22-26],同时对原材料进行预处理有利于除杂^[27],也有助于提高多糖提取率,因此本文对原材料进行浸泡预处理,并将提取次数、提取时间和液料比等因素作为考察条件开展更全面的提取工艺优化,旨在进一步提高超声波辅助水提醇沉法对黑玉米粒多糖的提取效率,并考察黑玉米粒多糖对DPPH·、ABTS⁺·、·OH的清除率,对其体外抗氧化活性进行研究,为其开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜黑玉米 吉林省金塔实业(集团)股份有限公司;苯酚、浓硫酸 分析纯,广东广试试剂科技有限公司;无水乙醇 分析纯,天津市大茂化学试剂厂;葡萄糖 分析纯,常德比克曼生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

SN-QX-65型超声波清洗机 上海市尚仪仪器设备有限公司;DD-6M型低速离心机 长沙市平凡仪器仪表有限公司;RE-5299型旋转蒸发器 广州市星烁仪器有限公司;Multiskan FC型酶标仪 赛默飞世尔科技公司;VORTEX-5型漩涡混合仪 海口市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 黑玉米粒多糖的提取 黑玉米粒晒干后,95%乙醇浸泡过夜,50℃干燥至恒重,粉碎过60目筛。将脱脂粉碎后的黑玉米粒粉末与去离子水以料液比1:20(g/mL)混合,70℃、100 W超声提取1 h;然后3000 r/min、4℃离心10 min,收集上清液,沉淀物再次超声辅助水提,重复以上步骤2次;将2次离心所得上清液旋蒸,浓缩至原液体积的1/5;向浓缩液中加入3倍体积的95%乙醇沉淀,不断搅拌,4℃静置过夜后,3000 r/min、4℃离心10 min,收集沉淀,沉淀物用去离子水溶解后旋蒸,冷冻干燥得黑玉米粒粗多糖,于干燥器中4℃保存,用于体外抗氧化活性测定。

1.2.2 单因素实验 以黑玉米粒为原材料,采用超声辅助水提醇沉法提取多糖进行单因素实验考察。在固定料液比1:20(g/mL)、提取温度70℃、提取时间60 min、提取2次的基础上,分别考察超声波功率(60、80、100、120、140 W)对多糖得率的影响;在固定料液比1:20(g/mL)、提取温度70℃、超声功率100 W、提取2次的基础上,分别考察提取时间(20、30、40、50、60、70、80 min)对多糖得率的影响;在固定料液比1:20(g/mL)、超声功率100 W、提取时间60 min、提取2次的情况下,分别考察不同提取温度(40、50、60、70、80℃)对多糖得率的影响;在固定提取温度70℃、超声功率100 W、提取时间60 min、提取2次的情况下,分别考察不同料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 g/mL)对多糖得率的影响;在固定料液比1:20(g/mL)、提取温度70℃、超声功率100 W、提取时间60 min的基础上,分别考察提取次数(1、2、3、4、5次)对黑玉米粒多糖得率的影响。

1.2.3 响应面优化试验 在单因素实验的结果上,基于Box-Behnken试验设计原理^[28],选用对多糖得率影响较大的提取次数、料液比、提取温度、提取时间为自变量,以黑玉米粒多糖的得率为观察指标,设计

四因素三水平的响应面优化试验, 试验因素和水平设计如表 1 所示。

表 1 响应面因素与水平设计
Table 1 Response surface factors and level design

水平	因素			
	A 提取次数 (次)	B 料液比 (g/mL)	C 提取温度 (°C)	D 提取时间 (min)
-1	1	1:15	60	50
0	2	1:20	70	60
1	3	1:25	80	70

1.2.4 多糖含量的测定 用苯酚-浓硫酸法^[29]测定黑玉米粒多糖含量, 以葡萄糖标准品质量浓度为 x , 吸光度为 y , 绘制标准曲线方程为 $y=5.8155x+0.0798$, $R^2=0.9946$ 。配制 1 mg/mL 的黑玉米粒多糖溶液, 用去离子水稀释至 0.1 mg/mL, 准确吸取 40 μ L 待测液, 加入体积分数 6% 的苯酚溶液 40 μ L 及浓硫酸 200 μ L, 静置 30 min 后, 在波长 490 nm 处测定吸光度值, 按下式计算多糖得率:

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{C \times V \times N}{M} \times 100$$

式中: C 为样品溶液中黑玉米粒多糖质量浓度, mg/mL; V 为提取液总体积, mL; N 为提取液稀释倍数; M 为黑玉米粒原料粉末重量, mg。

1.2.5 黑玉米粒多糖抗氧化活性测定

1.2.5.1 DPPH·清除率测定 参考文献 [30-31] 操作方法并稍加修改: 配制 0.1 mmol/L DPPH 溶液, 取质量浓度分别为 1、2、4、6、8、10 mg/mL 的黑玉米粒多糖溶液 100 μ L, 加入 DPPH 溶液 100 μ L, 摇匀, 置暗处反应 30 min, 在波长 517 nm 处测其吸光度为 A_1 。取 100 μ L 样品溶液加入 100 μ L 无水乙醇, 在波长 517 nm 处测定吸光值为 A_2 。取 100 μ L 蒸馏水加入 100 μ L DPPH 溶液, 在波长 517 nm 处测定吸光值为 A_3 , 以抗坏血酸为阳性对照, 按下式计算自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100$$

1.2.5.2 ABTS⁺自由基清除率测定 参考文献 [32-33] 操作方法并稍加改动: 配制 7 mmol/L ABTS 溶液、2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液, 将两者等比例混匀, 室温避光反应 12 h 以上, 取适量混合液与无水乙醇混合稀释, 使其在波长 734 nm 时的吸光度值为 0.70 ± 0.02 , 即得到 ABTS 工作液。分别取 40 μ L 的浓度分别为 1、2、4、6、8、10 mg/mL 的黑玉米粒多糖溶液加入 4 mL ABTS, 均匀混合后, 30 °C 避光反应 20 min, 在 734 nm 处检测其吸光度为 A_1 。取 40 μ L 样品溶液加入 4 mL 蒸馏水, 在 734 nm 处测定吸光值为 A_2 , 取 40 μ L 蒸馏水加入 4 mL ABTS 工作液, 在 734 nm 处测定吸光值为 A_3 , 以抗坏血酸为阳性对照, 按下式计算自由基清除率:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100$$

1.2.5.3 ·OH 清除率测定 参考文献 [34] 的操作方法并略微修改: 取质量浓度分别为 1、2、4、6、8、10 mg/mL 的黑玉米粒多糖溶液 1 mL, 与 1 mL FeSO₄ 溶液 (6 mmol/L)、1 mL H₂O₂ 溶液 (6 mmol/L) 混匀, 反应 10 min, 再加入 1 mL 水杨酸溶液 (6 mmol/L), 37 °C 水浴 30 min, 测定 510 nm 下吸光度为 A_1 。用 1 mL 蒸馏水代替水杨酸溶液测得吸光度为 A_2 。用 1 mL 蒸馏水代替样品溶液测得吸光度为 A_3 , 以抗坏血酸为阳性对照, 按下式计算·OH 清除率:

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100$$

1.3 数据处理

所有实验至少重复 3 次, 数据以平均值 \pm 标准差表示, 采用 Design-Expert 12 软件完成响应面设计并进行数据分析, 并采用 Duncan 检验对各数据进行比较, $P < 0.01$ 为极显著差异, $P < 0.05$ 为显著差异; 采用 GraphPad prism 8 进行作图及差异性分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 超声功率对多糖得率的影响 从图 1 可以看出, 在一定的超声功率范围内, 随着超声功率的增大, 黑玉米粒多糖得率明显提高, 当超声功率为 100 W 时, 多糖得率为 39.21%, 合适的超声功率有助于多糖的释放。但当超声功率增加至 120 W 时, 黑玉米粒多糖得率与超声功率 100 W 时的得率相比没有明显差异, 继续增加超声功率至 140 W 时, 多糖得率反而显著降低 ($P < 0.05$)。研究发现适当功率的超声波有助于多糖的释放, 但过高功率的超声会导致提取溶液中的多糖浓度增加, 混合物黏度的增加会引起内聚力的增加, 空化作用减弱^[23], 并且多糖提取的同时伴随着多糖的降解, 过高的超声功率还可能增加机械断裂效应, 导致更多大分子多糖的降解^[35-36], 从而降低多糖得率。因此最终确定最佳超声功率为 100 W。

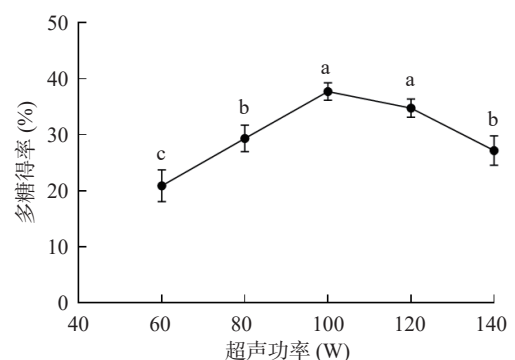


图 1 超声功率对多糖得率的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic power on the yield of polysaccharides

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 图 2~图 5 同。

2.1.2 提取时间对多糖得率的影响 由图2可知,当提取时间在20~60 min之间逐步延长,多糖得率也随之提高,当提取时间为60 min时,多糖得率达到39.23%。继续增加提取时间多糖得率却降低,原因是在合适的范围内延长超声时间,细胞受到超声波机械和空化作用增强,细胞壁破裂增多,多糖溶出增多,会导致多糖得率的升高^[24],但是提取时间过长会由于超声波空穴效应使多糖发生降解^[22],并易导致黑玉米粒中其他成分释放,从而影响多糖得率^[27,37]。考虑超声提取时间在50、60、70 min时所提取的多糖得率有明显差异,因此选取50、60、70 min来进行响应面试验。

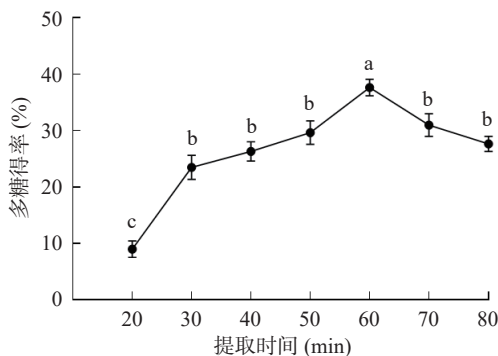


图2 提取时间对多糖得率的影响

Fig.2 Effect of extraction time on the yield of polysaccharides

2.1.3 提取温度对多糖得率的影响 温度通过影响多糖分子之间的热效应,进而改变细胞膜的通透性和溶液黏度^[38]。由图3可知,随着温度的升高,黑玉米粒多糖的得率也随之升高,当温度为70℃时,多糖得率达到39.35%。这是由于温度的上升增加了细胞膜的通透性和传热动力,使细胞内物质加快扩散利于物质浸出;当温度高于70℃,多糖得率却降低,因为温度过高易使多糖分解,破坏多糖结构从而影响提取效果^[37,39]。考虑超声提取温度在60、70、80℃时对多糖得率的影响有统计学差异,因此选取60、70、80℃为优化工艺的提取温度。

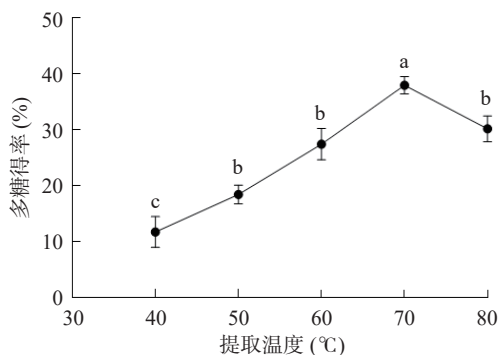


图3 提取温度对多糖得率的影响

Fig.3 Effect of extraction temperature on the yield of polysaccharides

2.1.4 料液比对多糖得率的影响 料液比可影响细胞内外渗透压,适当的料液比不但有利于多糖的溶

出,并且能节约浸提液^[40]。由图4可知,当料液比在1:20(g/mL)以下时,多糖得率随着溶剂用量的增加而提高,当液料比为1:20(g/mL)时,多糖得率达到38.21%。这是由于随着溶剂用量增加,多糖更易扩散,黑玉米粒粉末与溶剂的接触面积增大,反应更充分,利于多糖的析出,因此得率升高。继续增加溶剂用量,多糖得率反而下降,原因为达到一定比例后,溶剂用量的增加可能导致其他非多糖物质的析出,并影响多糖的醇沉,从而影响得率^[37]。考虑料液比在1:15、1:20、1:25(g/mL)时对多糖得率的影响有统计学差异,因此选择料液比1:15、1:20、1:25(g/mL)来进行响应面优化。

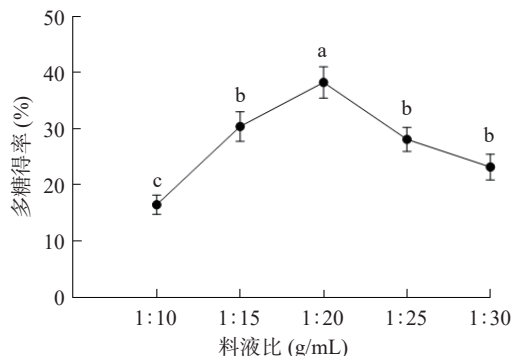


图4 料液比对多糖得率的影响

Fig.4 Effect of solid-liquid ratio on the yield of polysaccharides

2.1.5 提取次数对黑玉米粒多糖得率的影响 由图5可知,随着提取次数的增加,多糖得率先升高,后逐渐下降,在提取2次时,黑玉米粒多糖得率达到39.3%,后续增加提取次数,多糖得率反而下降。由于超声波与细胞壁共同产生“屏障效应”,因此单次超声辅助提取多糖类活性成分往往得率较低,需要多次提取来提高得率^[23],而提取次数过多易导致多糖结构破坏,使多糖得率反而下降^[37],因此选择提取次数为1、2、3次进行响应面试验。

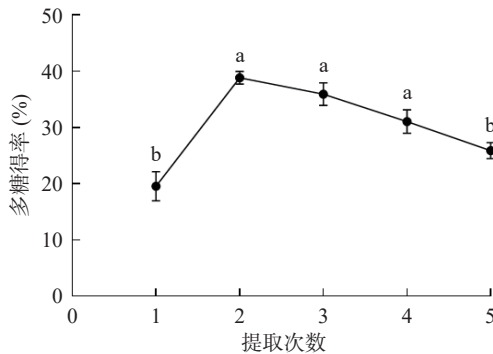


图5 提取次数对多糖得率的影响

Fig.5 Effect of extraction times on the yield of polysaccharides

2.2 响应面试验结果与分析

2.2.1 响应面试验结果 基于黑玉米粒多糖单因素实验结果,以多糖得率(Y)为考察指标,根据统计学分析结果选择对多糖得率影响有统计学差异的四个

因素(提取次数、料液比、提取温度与提取时间)进行四因素三水平响应面试验, 确定最佳提取工艺条件, 结果见表 2。

表 2 响应面试验设计及试验结果
Table 2 Experimental design and results of the response surface methodology

实验号	A提取次数	B料液比	C提取温度	D提取时间	多糖得率 Y(%)
1	-1	-1	0	0	14.58
2	1	-1	0	0	36.42
3	-1	1	0	0	26.57
4	1	1	0	0	33.61
5	0	0	-1	-1	18.34
6	0	0	1	-1	23.31
7	0	0	-1	1	21.52
8	0	0	1	1	37.75
9	-1	0	0	-1	18.07
10	1	0	0	-1	25.72
11	-1	0	0	1	18.16
12	1	0	0	1	37.98
13	0	-1	-1	0	16.74
14	0	1	-1	0	24.14
15	0	-1	1	0	34.01
16	0	1	1	0	26.77
17	-1	0	-1	0	14.38
18	1	0	-1	0	35.14
19	-1	0	1	0	20.57
20	1	0	1	0	38.14
21	0	-1	0	-1	18.24
22	0	1	0	-1	20.52
23	0	-1	0	1	22.21
24	0	1	0	1	36.09
25	0	0	0	0	37.77
26	0	0	0	0	38.02
27	0	0	0	0	40.67
28	0	0	0	0	39.91
29	0	0	0	0	39.78

利用表 2 实验数据进行回归拟合, 得黑玉米粒多糖得率 Y 对各因素回归方程的模型为: $Y=39.23+7.89A+2.12B+4.19C+4.13D-3.7AB-0.7975AC+3.04AD-3.66BC+2.9BD+2.81CD-5.49A^2-6.67B^2-6.55C^2-8.17D^2$ 。

回归模型方差分析结果见表 3。从表 3 得出, 此模型极显著($P<0.0001$); 失拟项不显著($P>0.05$), 说明此回归模型较为理想; $R^2=0.96$ 、 $R^2_{Adj}=0.9201$, 表明模型准确度高, 可用于优化多糖提取得率。根据模型中的 P 值可以得出, A、C、D、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 对黑玉米粒多糖得率的影响都为极显著($P<0.01$), 而一次项 B 和交互项 AB、AD、BC、BD、CD 均表现为差异显著($P<0.05$)。各因素对多糖得率的影响依次为 A(提取次数) $>$ C(提取温度) $>$ D(提取时间) $>$ B(料液比)。

2.2.2 响应面交互作用分析 各因素交互作用的响应面和等高线图见图 6~图 11。响应面曲面的陡峭程度反映了不同因素对黑玉米粒多糖得率的影响程度, 响应面越陡, 说明该因素对结果的影响越大, 反之

表 3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression equations

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	2205.98	14	157.57	24.03	<0.0001	**
A	747.03	1	747.03	113.93	<0.0001	**
B	54.19	1	54.19	8.26	0.0122	*
C	210.76	1	210.76	32.14	<0.0001	**
D	204.27	1	204.27	31.15	<0.0001	**
AB	54.76	1	54.76	8.35	0.0119	*
AC	2.54	1	2.54	0.388	0.5434	
AD	37.03	1	37.03	5.65	0.0323	*
BC	53.58	1	53.58	8.17	0.0126	*
BD	33.64	1	33.64	5.13	0.0399	*
CD	31.7	1	31.7	4.83	0.0452	*
A^2	195.38	1	195.38	29.8	<0.0001	**
B^2	288.43	1	288.43	43.99	<0.0001	**
C^2	278.68	1	278.68	42.5	<0.0001	**
D^2	432.66	1	432.66	65.98	<0.0001	**
残差	91.8	14	6.56			
失拟项	85.36	10	8.54	5.31	0.061	
纯误差	6.43	4	1.61			
总和	2297.77	28				

注: $P<0.01$, 极显著, 用**表示; $P<0.05$, 显著, 用*表示。

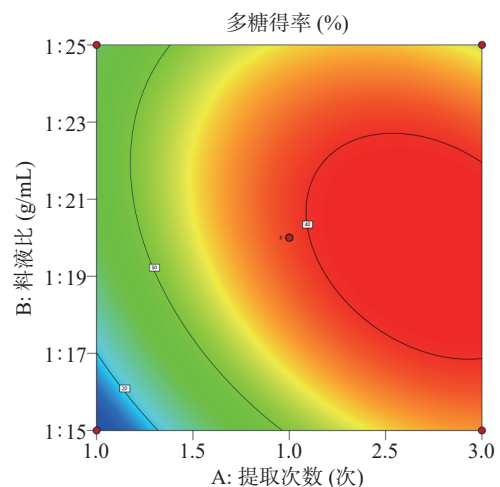
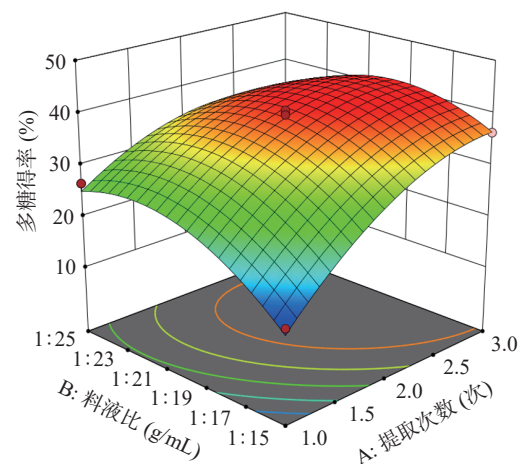


图 6 提取次数和料液比对多糖得率的影响

Fig.6 Influence of extraction times and solid-liquid ratio on the yield of polysaccharides

对试验结果影响越小^[41-42]。等高线呈椭圆形, 说明两个因素之间存在显著交互作用, 呈圆形则说明交互作

用对于响应值没有显著影响^[43]。由图6~图11可知, AB、AD、BC、BD、CD所形成的响应面曲面坡度较陡峭,其等高线呈椭圆形,表明AB、AD、BC、BD、CD各自交互作用明显,对多糖得率的影响显著。对比可知,与表3模型方差分析结果一致。

2.2.3 最佳条件确定与回归模型的验证 基于回归模型预测多糖提取的最佳条件为提取次数 2.56 次,料液比 1:20.491(g/mL),提取温度 73.921 °C,提取时间 59.333 min,在此条件下黑玉米粒多糖的理论得率为 41.672%。考虑到实际操作,调整最佳提取条件

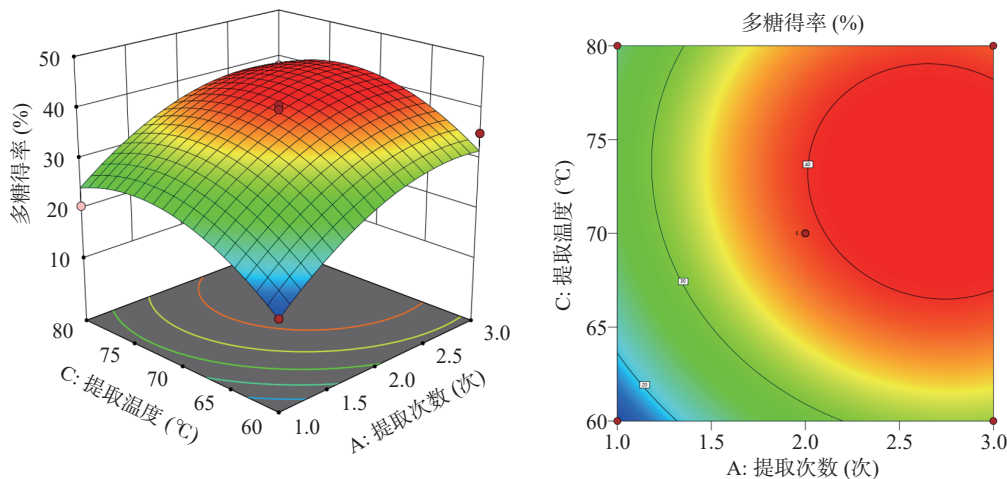


图7 提取次数和提取温度对多糖得率的影响

Fig.7 Influence of extraction times and extraction temperature on the yield of polysaccharides

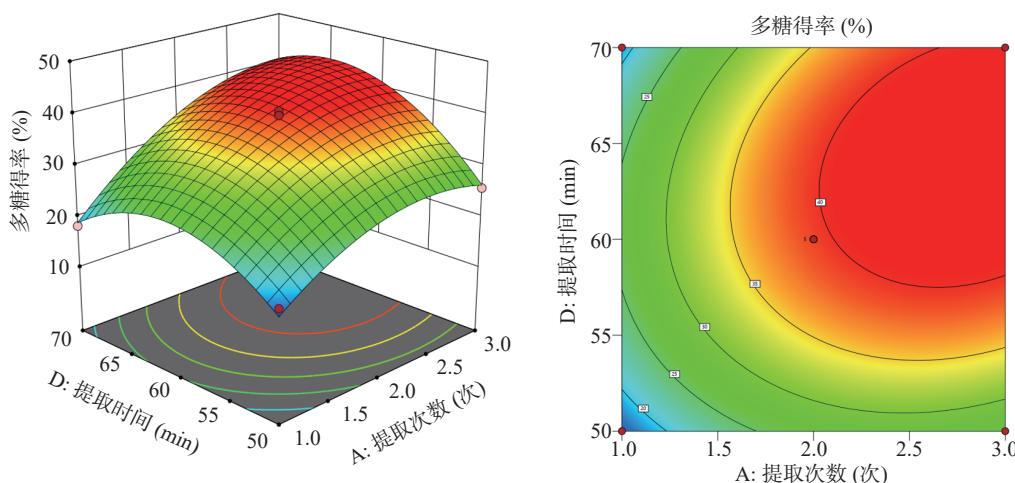


图8 提取次数和提取时间对多糖得率的影响

Fig.8 Influence of extraction times and extraction time on the yield of polysaccharides

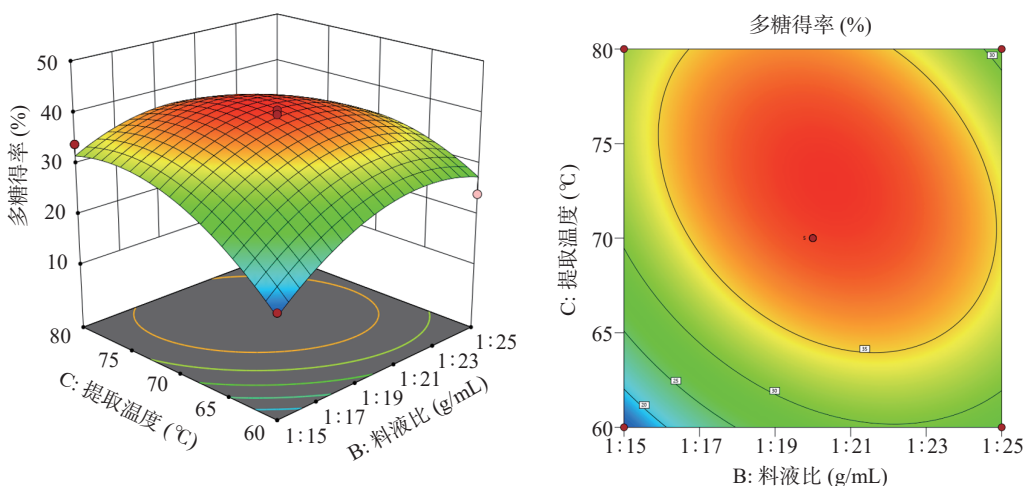


图9 料液比和提取温度对多糖得率的影响

Fig.9 Influence of solid-liquid ratio and extraction temperature on the yield of polysaccharides

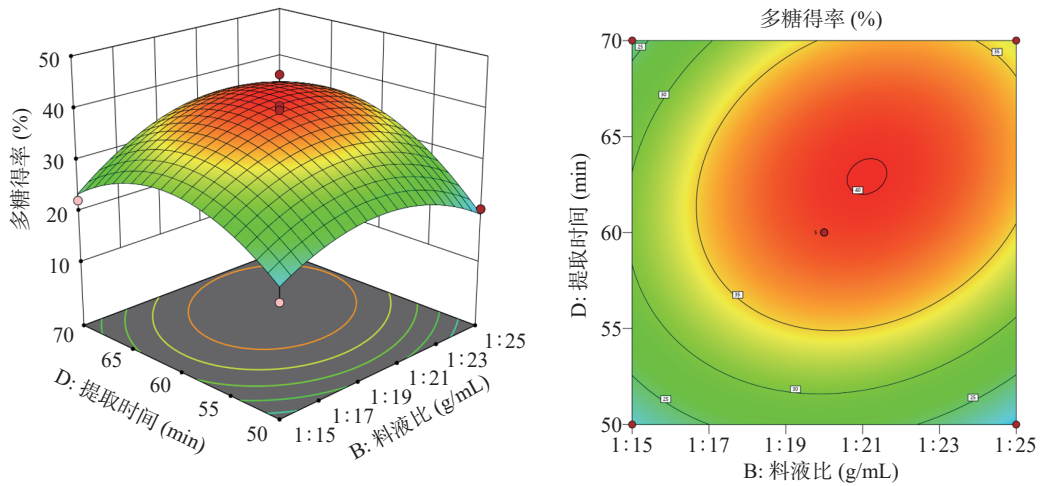


图 10 料液比和提取时间对多糖得率的影响

Fig.10 Influence of solid-liquid ratio and extraction time on the yield of polysaccharides

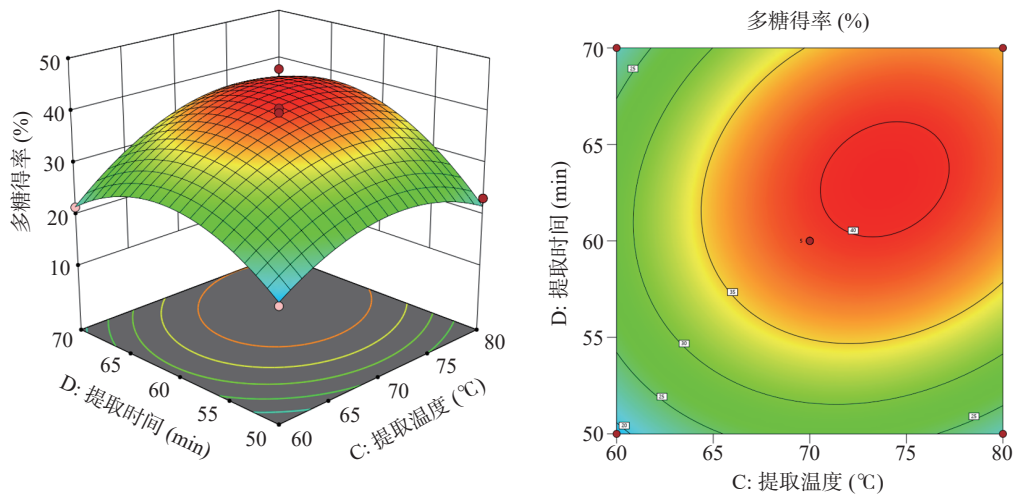


图 11 提取温度和提取时间对多糖得率的影响

Fig.11 Influence of extraction temperature and extraction time on the yield of polysaccharides

为提取次数 3 次、料液比 1:20(g/mL)、提取温度 74 °C、提取时间 60 min 时,在此工艺条件下进行 3 次重复验证实验,黑玉米粒多糖实际得率为 41.09%±0.59%,与模型预测值高度相符,验证了此模型的有效性。本文在预先浸泡处理的基础上,降低超声功率、延长提取时间、增加提取温度和提取次数,最终得出了高于文献 [21] 的黑玉米粒多糖提取得率,工艺简便,适用性强,对黑玉米粒多糖的开发有实用意义。

2.3 体外抗氧化活性分析

2.3.1 DPPH·清除率试验 黑玉米粒多糖的 DPPH·清除能力结果见图 12。DPPH·具有单一电子,其醇溶液呈紫色,在 517 nm 处具有最大吸收。有自由基清除剂存在时,DPPH·的单电子被捕捉而使其颜色变浅,在 517 nm 吸光值下降,从而可评价样品的抗氧化能力^[44]。由图 12 可知,当浓度为 1~10 mg/mL 时,黑玉米粒多糖对 DPPH·的清除能力随质量浓度的增大而增强,其 IC₅₀ 为 1.959 mg/mL,显著高于同为禾本科植物的玉米须多糖对 DPPH·的清除能力^[45]。

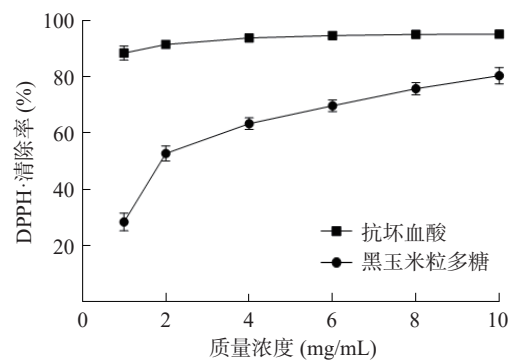
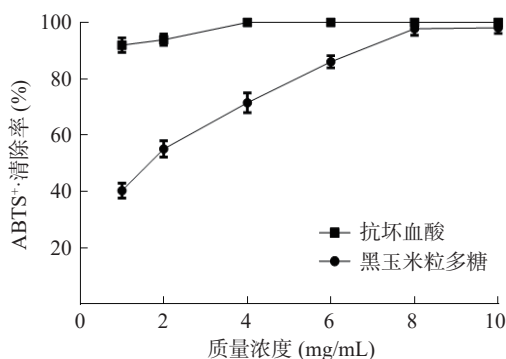


图 12 黑玉米粒多糖对 DPPH·的清除作用

Fig.12 Scavenging effect of polysaccharides from black corn kernel on DPPH·

结果表明,黑玉米粒多糖的 DPPH·清除率在一定的范围内与多糖浓度成正相关,黑玉米粒多糖对 DPPH·的清除能力较强,但其效果不如抗坏血酸明显。

2.3.2 ABTS⁺清除率试验 黑玉米粒多糖的 ABTS⁺清除能力结果见图 13。ABTS⁺被过二硫酸钾氧化生成绿色的 ABTS 溶液,在 734 nm 处有最大吸收,

图 13 黑玉米粒多糖对 ABTS^{·+} 的清除作用Fig.13 Scavenging effect of polysaccharides from black corn kernel on ABTS^{·+}

当一个物质加入到 ABTS 溶液后,溶液褪色,在 734 nm 吸光度值降低,说明该物质具有抗氧化能力^[46]。从图 13 中可以看出黑玉米粒多糖浓度增加时,清除 ABTS^{·+} 作用越强。当黑玉米粒多糖浓度为 1~6 mg/mL 时,黑玉米粒多糖对 ABTS^{·+} 的清除率由 40.34% 上升至 88.59%;当浓度为 8 mg/mL 时,其对 ABTS^{·+} 基的清除率达到 100%,与阳性药抗坏血酸的清除效果一样。经计算,黑玉米粒多糖清除 ABTS^{·+} 的 IC₅₀ 为 1.529 mg/mL,显著高于同为禾本科植物的玉米秸秆多糖对 ABTS^{·+} 的清除能力^[47],说明黑玉米粒多糖具有很强的 ABTS^{·+} 清除能力。

2.3.3 ·OH 清除率试验 黑玉米粒多糖的·OH 清除能力结果见图 14。H₂O₂ 和亚铁离子发生反应形成·OH,加入水杨酸后可生成紫色化合物(2,3-二羟基苯甲酸),在 510 nm 处具有最大吸收峰,当添加·OH 清除剂时,体系色泽变浅,吸光度降低^[48]。由图 14 可知,随着黑玉米粒多糖浓度的增大,黑玉米粒多糖对·OH 的清除效果也随之增加,当浓度为 1~10 mg/mL 时,黑玉米粒多糖对·OH 的清除率由 54% 上升至 81.54%,略低于阳性药抗坏血酸的清除率。其清除·OH 的 IC₅₀ 为 0.3554 mg/mL,显著高于同为禾本科植物的玉米芯多糖对·OH 的清除能力^[49]。结果表明黑玉米粒多糖清除·OH 活性与其浓度呈一定的线性关系,说明黑玉米粒多糖具有较好的·OH 清除能力。

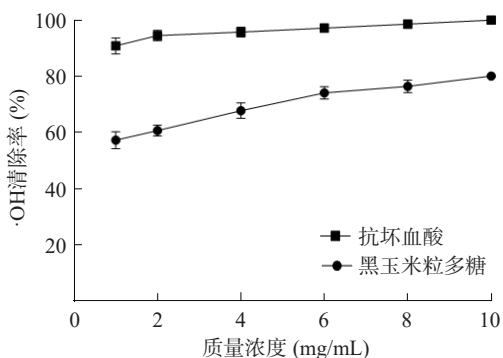


图 14 黑玉米粒多糖对·OH 的清除作用

Fig.14 Scavenging effect of polysaccharides from black corn kernel on ·OH

3 结论

本研究以黑玉米粒为原料,以多糖提取量为指标,通过响应面法优化获得黑玉米粒多糖提取的最优工艺条件:提取 3 次、料液比 1:20(g/mL)、提取温度 74 °C、提取时间 60 min,在此条件下测得的黑玉米粒多糖的得率为 41.09%±0.59%,对于今后实际生产具有指导意义。同时对黑玉米粒多糖体外抗氧化能力进行测定,其对 DPPH·、ABTS^{·+}、·OH 清除率的 IC₅₀ 分别为 1.959、1.529、0.3554 mg/mL,结果表明黑玉米粒多糖具有较高的体外抗氧化能力。因此,本研究为今后黑玉米的综合开发利用奠定了基础,也为开发天然抗氧化剂和功能食品提供了科学依据。

参考文献

- [1] 王晓婷,康明丽,宋丽君,等.大孔吸附树脂法纯化黑玉米花青素工艺[J].食品工业,2022,43(5):19-24. [WANG X T, KANG M L, SONG L J, et al. Purification of anthocyanin from black corn by macroporous adsorption resin[J]. The Food Industry, 2022, 43(5): 19-24.]
- [2] 路欣,梁霞,孟婷婷,等.山西主栽黑玉米营养成分及其抗氧化作用[J].现代食品科技,2021,37(1):73-83. [LU X, LIANG X, MENG T T, et al. Nutrient composition and antioxidant effect of main black corn in Shanxi[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 73-83.]
- [3] 魏俊青,刘晓娟,肖春玲.酶解法提取紫玉米多糖技术的研究[J].食品工业科技,2012,33(23):188-191. [WEI J Q, LIU X J, XIAO C L. Study on the extraction technology of polysaccharide from purple corn by enzyme method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(23): 188-191.]
- [4] 李靖元,柳青,王国良,等.黑玉米的营养优势及开发应用[J].食品研究与开发,2021,42(5):214-218. [LI J Y, LIU Q, WANG G L, et al. Nutritional advantage and development of black maize[J]. Food Research and Development, 2021, 42(5): 214-218.]
- [5] 杨斯惠,向月,曹亚楠,等.植物多糖的益生作用及其影响因素研究进展[J].食品科学,2022,43(11):301-310. [YANG S H, XIANG Y, CAO Y N, et al. Progress in research on the prebiotic effects of plant polysaccharides and the factors influencing them[J]. Food Science, 2022, 43(11): 301-310.]
- [6] WANG Q J, MENG X Y, ZHU L, et al. A polysaccharide found in *Paulownia fortunei* flowers can enhance cellular and humoral immunity in chickens[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 213-219.
- [7] SHEN W D, LI X Y, DENG Y Y, et al. *Polygonatum cyrtone-ma* Hua polysaccharide exhibits anti-fatigue activity via regulating osteocalcin signaling[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 175: 235-241.
- [8] MEI X Y, YANG W J, HUANG G L, et al. The antioxidant activities of balsam pear polysaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 142: 232-236.
- [9] LEE D Y, PARK C W, LEE S J, et al. Anti-cancer effects of *Panax ginseng* berry polysaccharides via activation of immune-related cells[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 1411.
- [10] GUAN Y, SUN H F, CHEN H Y, et al. Physicochemical characterization and the hypoglycemia effects of polysaccharide isolated from *Passiflora edulis* Sims peel[J]. Food & Function, 2021, 12(9): 4221-4230.
- [11] CHEN F J, XU Y L, DING N N, et al. Extraction of *Radix*

- trichosanthis* polysaccharides for potential antihyperlipidemic application[J]. *BioMed Research International*, 2022, 2022: 3811036.
- [12] KALININA T S, ZLENKO D V, KISELEV A V, et al. Antiviral activity of the high-molecular-weight plant polysaccharides (Panavir®)[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 161: 936–938.
- [13] 杨占群, 王星慧, 杨丽, 等. 黑糯玉米多糖对小鼠的抗疲劳作用及其机制的研究[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(2): 88–90. [YANG Z Q, WANG X H, YANG L, et al. Study on the anti-fatigue effect and mechanism of black glutinous maize polysaccharide on mice[J]. *Cereals & Oils*, 2020, 33(2): 88–90.]
- [14] 杨占群, 宋小幸, 周倩瑜, 等. 响应面法优化微波辅助提取黑糯玉米多糖的工艺及其对疲劳小鼠氧化损伤的影响[J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(6): 92–96. [YANG Z Q, SONG X X, ZHOU Q Y, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of polysaccharide from black glutinous maize by response surface method and its protection effect of oxidative damage on fatigue mice[J]. *Cereals & Oils*, 2020, 33(6): 92–96.]
- [15] ZHANG Z, ZHANG W S, DU X F. Hypoglycemic effects of black glutinous corn polysaccharides on alloxan-induced diabetic mice[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 230(3): 411–415.
- [16] 关海宁, 刁小琴, 王辉, 等. 小组设计优化超声辅助酶法提取黑玉米粗多糖[J]. *食品工业*, 2011, 32(1): 54–57. [GUAN H N, DIAO X Q, WANG H, et al. Small composite design for optimizing the extraction of polysaccharide from black corn by ultrasonic wave and enzyme[J]. *The Food Industry*, 2011, 32(1): 54–57.]
- [17] 高晗. 水提和碱提法制备黄秋葵多糖及其对肠道菌群的影响[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019. [GAO H. Preparation of okra polysaccharide fractions extracted by water and alkaline solution and modulation of gut microbiota in mice[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019.]
- [18] 张红运. 不同提取工艺对大豆种皮多糖结构的影响[D]. 锦州: 渤海大学, 2019. [ZHANG H Y. Effects of different extraction processes on the structure of soy hull polysaccharide[D]. Jinzhou: Bohai University, 2019.]
- [19] 高林晓, 田琴, 郭蒙, 等. 响应面法优化提取灵香草中绿原酸工艺研究[J]. *粮食与油脂*, 2022, 35(6): 106–109, 115. [GAO L X, TIAN Q, GUO M, et al. Optimization of chlorogenic acid extraction from *Lysimachia foenum-graecum* Hance by response surface methodology[J]. *Cereals & Oils*, 2022, 35(6): 106–109, 115.]
- [20] SINGLA M, SIT N. Application of ultrasound in combination with other technologies in food processing: A review[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 73: 105506.
- [21] 关海宁, 刁小琴, 唐华, 等. 响应面法优化超声波辅助提取黑玉米多糖工艺研究[J]. *农业机械*, 2011, 665(5): 135–138. [GUAN H N, DIAO X Q, TANG H, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of black corn polysaccharides by response surface methodology[J]. *Farm Machinery*, 2011, 665(5): 135–138.]
- [22] 郭佳. 超声波辅助提取对枸杞细胞壁多糖解聚规律的研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2022. [GUO J. Depolymerization of *Lycium barbarum* cell wall polysaccharides by ultrasonic assisted extraction[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2022.]
- [23] 王文骏. 柑橘果皮胶超声辅助提取的作用机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018. [WANG W J. The research on the mechanism of ultrasound-assisted extraction of pectin from citrus peel[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018.]
- [24] 马晓宁, 秦令祥, 丁昱婵, 等. 响应面优化超声波辅助提取杏鲍菇多糖的工艺及其抗疲劳活性测定研究[J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(3): 273–279. [MA X N, QIN L X, DING Y C, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of *Pleurotus eryngii* polysaccharide by response surface methodology and its antifatigue activity[J]. *China Food Additives*, 2023, 34(3): 273–279.]
- [25] WANG K J, GUO G T, CHENG J X, et al. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharide from spent *Lentinus edodes* substrate: Process optimization, precipitation, structural characterization and antioxidant activity[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 191: 1038–1045.
- [26] HU X T, XU F R, LI J L, et al. Ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from coix seeds: Optimization, purification, and *in vitro* digestibility[J]. *Food Chemistry*, 2022, 374: 131636.
- [27] 盛家荣, 张斌, 黄初升, 等. 不同预处理条件对扶芳藤多糖提取的影响[J]. *广西师范学院学报(自然科学版)*, 2011, 28(2): 38–42. [SHENG J R, ZHANG B, HUANG C S, et al. Effect of pre-conditioning with different conditions on the extraction of polysaccharides from *Euonymus fortunei*[J]. *Journal of Guangxi Teachers Education University: Natural Science Edition*, 2011, 28(2): 38–42.]
- [28] CHEN W W, JIA Z B, ZHU J J, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from thick-shell mussel (*Mytilus coruscus*) and their antioxidant activities[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 1116–1125.
- [29] CHEN F, HUANG G L, YANG Z Y, et al. Antioxidant activity of *Momordica charantia* polysaccharide and its derivatives[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138: 673–680.
- [30] 李欣欣, 李文香. 桦褐孔菌多糖的分离纯化及其抗氧化活性测定[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(11): 192–197. [LI X X, LI W X. Isolation, purification and antioxidant activity of *Inonotus obliquus* polysaccharide[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(11): 192–197.]
- [31] CHEUNG L M, CHEUNG P C K, OOI V E C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts[J]. *Food Chemistry*, 2003, 81(2): 249–255.
- [32] 高佳琦, 邹丹阳, 滕翔宇, 等. 5种食用菌多糖的结构特征及抗氧化活性对比[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(15): 77–83, 89. [SHANG J Q, ZOU D Y, TENG X Y, et al. Structural characterization and antioxidant activity of five kinds of edible fungus polysaccharides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(15): 77–83, 89.]
- [33] HUANG Q Q, XIAO B, CHEN S, et al. Effect of enzyme-assisted extraction on the chemical properties and antioxidant activities of polysaccharides obtained from the wood ear mushroom, *Auricularia auricula* (Agaricomycetes)[J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2022, 24(2): 49–62.
- [34] ZAN L X, SONG W T, WANG W W, et al. Purification, antioxidant activities, encapsulation, and release profile of total flavonoids in peony seed meal[J]. *Food Science & Nutrition*, 2022, 10(4): 1051–1057.
- [35] XIAO J R, CHEN X, ZHAN Q P, et al. Effects of ultrasound on the degradation kinetics, physicochemical properties and prebiotic activity of *Flammulina velutipes* polysaccharide[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 82: 105901.
- [36] 仇玉洁. 菱角多糖的超声提取、结构表征及其对巨噬细胞免疫激活效应的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022. [QIU Y J. Preparation, structure characterization and immunostimulatory activity of polysaccharide from *Trapa bispinosa* L.[D]. Zhenjiang: Jiang-

- su University, 2022.]
- [37] 王鑫, 韩焯, 马永强, 等. 超声辅助提取甜玉米芯多糖工艺优化及抗氧化性评价[J]. *粮食与油脂*, 2022, 35(7): 115-119. [WANG X, HAN Y, MA Y Q, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of polysaccharide from sweet corn cob and evaluation of its antioxidant activity[J]. *Cereals & Oils*, 2022, 35(7): 115-119.]
- [38] 张猛猛. 玛咖根部多糖的结构鉴定及免疫调节活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019. [ZHANG M M. Structural identification and the immunological activity of polysaccharides from maca root (*Lepidium meyenii* Walp.)[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.]
- [39] WANG Y P, LIU Y, HU Y H. Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 111: 324-332.
- [40] 姚佳, 黄希莲, 姚玉仙, 等. 响应面法优化多穗石柯粗多糖提取工艺及抗氧化活性分析[J]. *食品科技*, 2021, 46(9): 195-201. [YAO J, HUANG X L, YAO Y X, et al. Optimization of extraction and antioxidant activity of crude polysaccharides from *Lithocarpus polystachyus* (Wall.) Rehd. by response surface methodology[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(9): 195-201.]
- [41] 孙聪聪, 鹿道睿, 黎尔纳, 等. 响应面法优化 β -半乳糖苷酶法制备低聚半乳糖工艺[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(22): 246-255. [SUN C C, PANG D R, LI E N, et al. Optimization of preparation of galactooligosaccharides by β -galactosidase using response surface methodology[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(22): 246-255.]
- [42] 王晓雨, 任贵平, 程竹林, 等. 响应面法优化枸杞无硫促干护色工艺及其对品质的影响[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(19): 246-255. [WANG X Y, REN G P, CHENG Z L, et al. Optimization the sulfur-free drying and color protection process of *Lycium barbarum* by response surface methodology and its effect on quality[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(19): 246-255.]
- [43] 殷海洋, 刘振春, 张世康, 等. 响应面优化超声波辅助酶法提取油莎豆 ACE 抑制肽的工艺[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(14): 182-187. [YIN H Y, LIU Z C, ZHANG S K, et al. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of ACE inhibitory peptides from *Cyperus esculentus* by response surface method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(14): 182-187.]
- [44] 陈劲然. 超声波对黄大茶多糖的提取率、结构及生物活性的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2020. [CHEN J R. Effects of ultrasound on extraction rate, structure and biological activity of polysaccharide from large yellow tea[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2020.]
- [45] 胡楠楠, 元伟华, 尤丽新, 等. 玉米须多糖发酵工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. *中国酿造*, 2022, 41(10): 159-164. [HU N N, QI W H, YOU L X, et al. Optimization of fermentation technology and antioxidant activity of *Stigma maydis* polysaccharide[J]. *China Brewing*, 2022, 41(10): 159-164.]
- [46] 王杰. 槐角多糖分离纯化、结构分析及生理活性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2019. [WANG J. Isolation, purification, structure and physiological activity of polysaccharides from *Sophorae Fructus*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.]
- [47] 王雯雯. 微生物降解玉米秸秆多糖结构鉴定及其生物活性研究[D]. 天津: 天津理工大学, 2022. [WANG W W. Study on the structure identification and biological activity of microbial degradation of corn stalk polysaccharide[D]. Tianjin: Tianjin University of Technology, 2022.]
- [48] 刘羽婷, 官春宇, 廉雅雯, 等. 不同预处理方式对玉米须多糖提取及抗氧化活性的影响[J]. *食品科技*, 2022, 47(4): 209-215. [LIU Y T, GONG C Y, LIAN Y W, et al. Effects of different pretreatment methods on extraction and antioxidant activity of polysaccharides from corn silk[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(4): 209-215.]
- [49] 杜涓, 安晓萍, 刘娜, 等. 酶解对玉米芯多糖结构及体外抗氧化活性的影响[J]. *饲料工业*, 2021, 42(21): 45-50. [DU J, AN X P, LIU N, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on structure and *in vitro* antioxidant activity of corn cob polysaccharide[J]. *Beverage Industry*, 2021, 42(21): 45-50.]