

## 正交设计碱提小米多糖

诸爱士,沈晓强

(浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023)

**摘要:**研究了小米多糖的碱提工艺,考察了碱液浓度、提取温度、液固比、提取时间4个因素对小米多糖收率的影响,并用正交设计进行了4因素3水平优化,得到最优组合。结果表明,影响多糖收率的强弱顺序依次是:液固比>提取温度>碱浓度>提取时间;碱提小米多糖的最佳条件组合为碱浓度0.8 mol/L、提取温度80.0℃、液料比20.0:1、提取时间1.0 h,多糖收率为47.27 mg/g。

**关键词:**小米;多糖;碱提;正交设计

中图分类号: TS209

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2013)03-0205-05

## Alkali extraction polysaccharides from millet by orthogonal design

ZHU Aishi, SHEN Xiaoqiang

(School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of  
Science and Technology, Hangzhou 310023, China)

**Abstract:** The alkali extraction process of polysaccharides from millet was investigated. The effects of alkali concentration, extraction temperature, liquid to solid ratio and extraction time on the extraction rate were studied with single-factor experiments. Then the optimization experiments of orthogonal design with four factors and three levels were carried out and the optimal conditions combination was obtained. The results showed that the order of factor influencing on polysaccharides yield is successively liquid to solid ratio, extraction temperature, alkali concentration and extraction time. The established optimum alkali extraction technical combination conditions are alkali concentration 0.8 mol/L, extraction temperature 80.0℃, liquid to solid ratio 20.0:1 and extraction time 1.0 h. Under these conditions, the yield of polysaccharides is 47.27 mg/g.

**Key words:** millet; polysaccharide; alkali extraction; orthogonal design

小米是一种一年生的谷类植物,作为主要的粮食作物在非洲与亚洲的许多国家特别是干旱地区广泛被种植<sup>[1]</sup>。小米富含钙、膳食纤维和多酚,有益健康<sup>[2]</sup>。多糖具有独特的生物、化学和物理性质<sup>[3-7]</sup>,并能

收稿日期: 2013-04-08

作者简介: 诸爱士(1966—),男,浙江省湖州人,副教授,主要从事化工传递与农产品加工的教学与研究。

在生物体的生长和发育中起到重要作用<sup>[8]</sup>,所以越来越多的研究者研究从生物质中提取多糖并加以应用。目前多糖的提取有水提<sup>[9]</sup>、酶辅助<sup>[10]</sup>、微波辅助<sup>[11]</sup>、超声辅助<sup>[12]</sup>、酸提<sup>[13]</sup>、碱提<sup>[14]</sup>等方法。常规采用水提法,文献[15]报道了采用水提法较全面地研究了小米多糖的提取影响因素,并用均匀设计对提取条件进行了优化。水提法虽成本低,但其提取率也低,文献[15]研究得到在最佳条件下的多糖收率为 7.90 mg/g。因此,笔者研究了在碱溶液中的小米多糖提取。为避免物料糊化及基于文献[15]研究得到的结果,采用小米的原始颗粒(直径约为 1 mm)、在 150 r/min 搅拌下提取 1 次,先单因素考察了碱液浓度(NaOH 水溶液浓度, mol/L,全文同)、提取温度、液固比(去离子水体积与小米质量比, mL/g,全文同)和提取时间 4 个因素的影响,而后用 4 因素 3 水平的正交设计实验对条件进行了优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

小米:购于杭州华商超市,内蒙古赤峰产;在 60 ℃ 的干燥箱中干燥 4 h,包装储藏;取样使用前再次在 60 ℃ 下恒重。

葡萄糖(分析纯,天津市巴斯夫化工有限公司),苯酚(分析纯,杭州双林化工试剂厂),硫酸(分析纯,浙江中星化工试剂有限公司),氢氧化钠(分析纯,杭州萧山化学试剂厂)。

DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精密实验设备有限公司),BS124S 型电子天平(北京塞多利斯仪器系统有限公司),DK-S24 电热恒温水浴锅(上海精宏试验设备有限公司),S212-40 型恒速搅拌器(上海申胜生物技术有限公司),800B 离心机(上海安亭科学仪器厂),SHZ-Ⅲ B 型循环水真空泵(浙江临海市精工真空设备厂),722E 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 多糖质量浓度的测定

采用硫酸-苯酚法测定多糖质量浓度<sup>[15]</sup>。多糖的收率计算公式见式(1):

$$\eta = \frac{X \times V}{M} \times 1000 \quad (1)$$

式(1)中: $\eta$ —小米多糖的收率, mg/g;  $X$ —测试液中多糖质量浓度, g/L,按式(2)计算<sup>[9,15]</sup>;  $V$ —粗多糖溶解定容后的溶液总体积, L;  $M$ —颗粒小米取样质量, g。

$$X = 0.0255Y - 0.00006 \quad (2)$$

式(2)中: $Y$ —485 nm 处的吸光度。试验中未发现碱液对多糖吸光度测定的影响。

#### 1.2.2 试验方法与单因素研究

取 5 g 于 60 ℃ 下恒重过的小米放入三口烧瓶,按比例加入一定体积某个浓度的 NaOH 水溶液,迅速将烧瓶固定在设定为某个温度的恒温水浴槽中,安装好搅拌桨和回流冷凝管,搅拌下提取一定时间;到规定时间后取出混合料液用离心机在 4 000 r/min 下离心沉淀 15 min,取上清液,加 3 倍于所得液体体积的 95%乙醇进行醇析,再将经醇析后的料液在 4 000 r/min 下离心 15 min,然后迅速将料液抽滤,取滤饼即得小米粗多糖;将粗多糖溶解并定容,测定溶液中的多糖含量,计算小米多糖的提取收率。

研究不同碱液浓度、提取温度、液固比和提取时间 4 个因素对多糖提取收率的影响。

#### 1.2.3 正交设计试验

在单因素试验基础上,选择适当的水平,进行 4 因素 3 水平的  $L_9(3^4)$  正交试验<sup>[16]</sup>,通过极差分析筛选出最佳的工艺条件组合。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单因素研究

#### 2.1.1 碱浓度对收率的影响

研究了不同 NaOH 溶液浓度对多糖提取效果的影响,碱浓度分别为 0.0、0.4、0.6、0.8、1.0、

1.2 mol/L,其他条件设定如下:颗粒、150 r/min 搅拌、液固比 20.0 : 1 mL/g、提取时间 1.0 h、提取温度 60.0 °C、提取次数 1 次。得到的结果见图 1。

碱浓度为 0.0 mol/L 时相当于是水提。由图 1 可见,碱提取较之水提多糖收率明显增大。随碱浓度升高,多糖收率显著增加,浓度到 0.6 mol/L 后收率增加趋于平缓,到 0.8 mol/L 时达到最大值,而后碱浓度大于 0.8 mol/L 后多糖收率明显下降。这是因为碱的存在有助于解除细胞壁聚合物分子间的物理和化学作用,促进多糖从细胞中溶出,从而提高了多糖收率,但过高的碱浓度会发生碱催化下的多糖水解,使多糖收率明显下降,据此 0.8 mol/L 的碱浓度较合适。

#### 2.1.2 提取温度对收率的影响

在溶液碱浓度 0.8 mol/L、液固比 20.0 : 1、150 r/min 搅拌下,对颗粒小米 1 次提取 1.0 h,考察了提取温度分别为 50.0、60.0、70.0、80.0 和 90.0 °C 时小米多糖的收率,结果见图 2。

从图 2 可以看到,在 50.0~80.0 °C 范围内,多糖收率随温度的升高有明显增大,最大值出现在 80.0 °C,而后收率随温度进一步增高出现下降。这是由于在较高的温度下多糖的扩散系数得到增大,在提取剂中的溶解性能即溶解度得到提高;同时降低了溶液的黏度,使传递阻力减小,这就加快了多糖从颗粒向溶液传递的速度,表现出多糖收率的提高;但温度太高,多糖降解和变性的量也会随之增大,从而会降低多糖的收率,同时能耗也增大,所以 80.0 °C 比较适宜。

#### 2.1.3 液固比对收率的影响

不同液固比对多糖收率的影响见图 3,液固比分别为 10.0 : 1、15.0 : 1、20.0 : 1、25.0 : 1 和 30.0 : 1 mL/g,其他条件为:颗粒、150 r/min 搅拌、碱浓度 0.8 mol/L、提取时间 1.0 h、提取温度 80.0 °C、提取次数 1 次。

液固比过小,多糖不能被有效提取,液固比过大又会增加成本。图 3 显示先随液固比的增加多糖收率增大,这是由于液固比小时,溶液中多糖质量浓度过高,减小了固体物料与液相溶液间的多糖质量浓度差,从而使固相中的多糖不能全部溶出;液固比增大后,降低了液相的多糖质量浓度,加大了两相间多糖的质量浓度差,促进了固相中多糖的溶出,提高了收率。液固比到 20.0 : 1 时收率出现了最大值,然而液固比超过

20.0 : 1 后收率反而随液固比的增大有明显减小,这一方面是因为在碱浓度相同的情况下,液固比越大溶液中的碱含量就越大,多糖在碱催化下发生的水解也就越多;另一方面随液固比增大,提取液体积增多,而醇析时加入的乙醇体积又是提取液体积的固定倍数,致使溶液中多糖质量浓度被大大稀释,导致在醇析过程中多糖不能被完全沉淀出,故收率出现下降,所以 20.0 : 1 是提取多糖适宜的液固比。

#### 2.1.4 提取时间对收率的影响

用颗粒小米,控制碱浓度 0.8 mol/L、液固比 20.0 : 1、提取温度 80.0 °C,在 150 r/min 搅拌下 1 次提

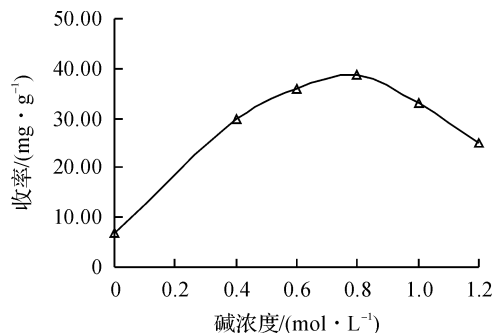


图 1 碱浓度对收率的影响

Fig. 1 Effects of falkali concentration on extraction yield

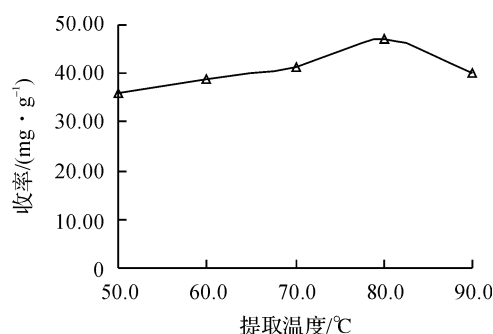


图 2 提取温度对收率的影响

Fig. 2 Effects of extraction temperature on extraction yield

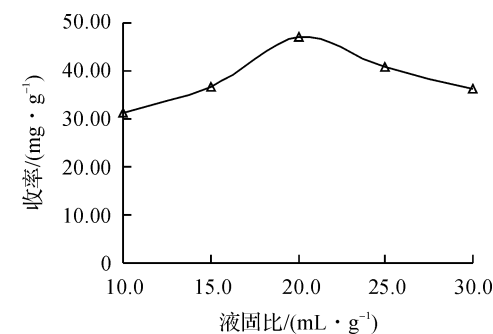


图 3 液固比对收率的影响

Fig. 3 Effects of liquid-solid ratio on extraction yield

取,分别考察提取时间 0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 h 时多糖的收率,结果见图 4。

从图 4 得到,提取时间从 0.5 h 到 1.0 h,多糖收率随提取时间的延长而快速增高,到 1.0 h 出现最大值,随后收率出现缓慢降低。这说明提取时间也是影响多糖提取收率的一个重要因素,这是由于提取剂渗入小米颗粒、多糖从固体颗粒中释放出溶解于提取剂并传递到溶液中需要一定的时间,但时间过长会使溶液中的多糖在高温、碱性的条件下发生碱催化降解,使提取的多糖量抵不上降解的量,降低了整个收率。所以提取时间 1.0 h 比较合适。

文献[15]报道了水提时单因素考察得到的最佳时间是 2.0 h,均匀设计优化是 2.19 h,而现在碱提仅需 1.0 h,明显少于水提时间,这有利于生产效率的提高。

## 2.2 正交设计试验

根据上述试验结果,对碱液浓度、液固比、提取时间及提取温度 4 个因素进行 3 水平的正交设计试验,其他条件仍然是 150 r/min 搅拌下对颗粒小米提取 1 次。表 1 给出了正交设计试验的因素和水平,各条件组合下的试验多糖收率及极差分析见表 2,趋势图见图 5。

表 1 提取试验因素和水平

Table 1 Levels and factors for extraction experiment

水平	碱浓度 $A/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	提取温度 $B/^\circ\text{C}$	液固比 $C/(\text{mL} \cdot \text{g}^{-1})$	提取时间 $D/\text{h}$
1	0.6	70.0	15.0 : 1	0.5
2	0.8	80.0	20.0 : 1	1.0
3	1.2	90.0	25.0 : 1	1.5

表 2 正交设计结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	$\eta/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
1	1(0.6)	1(70.0)	1(15.0)	1(0.5)	18.38
2	1(0.6)	2(80.0)	2(20.0)	2(1.0)	44.03
3	1(0.6)	3(90.0)	3(25.0)	3(1.5)	31.92
4	2(0.8)	1(70.0)	2(20.0)	3(1.5)	39.59
5	2(0.8)	2(80.0)	3(25.0)	1(0.5)	41.04
6	2(0.8)	3(90.0)	1(15.0)	2(1.0)	42.28
7	3(1.0)	1(70.0)	3(25.0)	2(1.0)	30.24
8	3(1.0)	2(80.0)	1(15.0)	3(1.5)	32.10
9	3(1.0)	3(90.0)	2(20.0)	1(0.5)	38.33
$K_1$	94.33	88.21	92.76	97.75	
$K_2$	122.91	117.17	121.95	116.55	
$K_3$	100.67	112.53	103.20	103.61	
$k_1$	31.44	29.40	30.92	32.58	
$k_2$	40.97	39.06	40.65	38.85	
$k_3$	33.56	37.51	34.40	34.54	
R	28.58	28.96	29.19	18.80	

通过比较表 2 中各个因素极差 R 值的大小及图 5 的形状可以得知,在考察范围内,影响多糖提取因素的强弱顺序为:液固比(C)>提取温度(B)>碱浓度(A)>提取时间(D)。

综上分析可得小米多糖碱提最佳条件组合为  $A_2B_2C_2D_2$ ,即碱浓度 0.8 mol/L、提取温度 80.0  $^\circ\text{C}$ 、液固比 20 : 1 和提取时间 1.0 h,结果与单因素考察完全吻合。在此条件下重复 3 次试验,多糖收率分别为

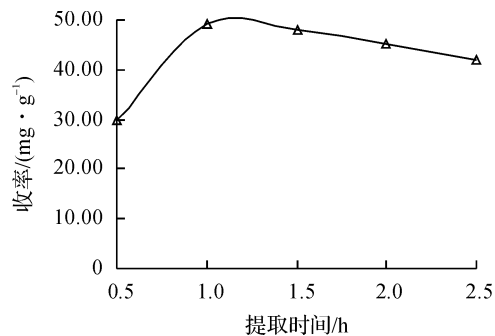


图 4 提取时间对收率的影响

Fig. 4 Effects of extraction time on extraction yield

47.24、47.39、47.18 mg/g,多糖平均收率为 47.27 mg/g,相对标准偏差  $RSD=2.3\%$  ( $n=3$ ),说明提取工艺稳定,且收率明显高于水提的 7.90 mg/g,碱提效果好。

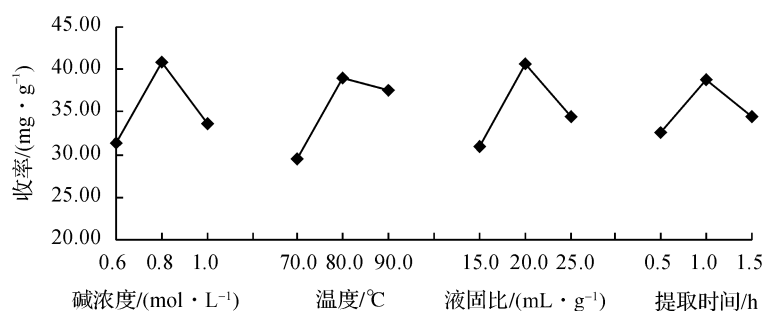


图5 趋势图

Fig.5 Tendency chart

### 3 结 语

研究发现,采用碱溶液提取小米多糖比水提多糖效率高,不仅提高了多糖收率,而且可以缩短提取时间;液固比、温度和碱浓度相比于提取时间,对多糖收率影响的程度更大;碱提小米多糖工艺的较佳条件是:碱浓度 0.8 mol/L、提取温度 80.0 ℃、液固比 20:1 和提取时间 1.0 h,此条件下小米多糖的收率可达 47.27 mg/g。

### 参考文献:

- [1] Radhika G B, Satyanarayana S V, Rao D G. Mathematical model on thin layer drying of finger millet (*Eleusine coracana*) [J]. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2011, 3(2): 127-131.
- [2] Subba-Rao M V S S T, Sai-Manohar R, Muralikrishna G. Functional characteristics of non-starch polysaccharides (NSP) obtained from native (n) and malted (m) finger millet (*ragi*, *Eleusine coracana*, indaf-15) [J]. *Food Chemistry*, 2004, 88(3): 453-460.
- [3] Li S P, Zhao K J, Ji Z N, et al. A polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis*, a traditional Chinese medicine, protects PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury [J]. *Life Science*, 2003, 73(19): 2503-2513.
- [4] Chen R Z, Li Y, Dong H, et al. Optimization of ultrasonic extraction process of polysaccharides from *Ornithogalum Caudatum* Ait and evaluation of its biological activities [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2012, 19(6): 1160-1168.
- [5] 程仕伟, 陈超男, 冯志彬, 等. 海带岩藻多糖的水提制备及其抗氧化活性研究 [J]. *食品科学*, 2010, 31(6): 101-104.
- [6] 梁亦龙, 阎光凡, 舒坤贤, 等. 山药水溶性多糖的提取及抗氧化性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(11): 1-3.
- [7] Schepetkin I A, Quinn M T. Botanical polysaccharide: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential [J]. *International Immunopharmacology*, 2006, 6(3): 317-333.
- [8] Yang B, Jiang Y M, Wang R, et al. Ultra-high pressure treatment effects on polysaccharides and lignins of longan fruit pericarp [J]. *Food Chemistry*, 2008, 112(2): 428-431.
- [9] 诸爱士, 成忠. 山药多糖提取工艺响应面法优化 [J]. *浙江科技学院学报*, 2011, 23(1): 15-19.
- [10] 张元, 林强, 魏静娜, 等. 酶法提取山药中多糖的工艺研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(4): 374-377.
- [11] Zhang X Z, Yin F P, Liu C H, et al. Effect of process parameters of microwave assisted extraction (MAE) on polysaccharides yield from pumpkin [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 18(2): 79-86.
- [12] Ying Z, Han X X, Li J R. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(3): 1273-1279.
- [13] Gan C Y, Abdul Manaf N, Latiff A A. Optimization of alcohol insoluble polysaccharides (AIPS) extraction from the *Parkia speciosa* pod using response surface methodology (RSM) [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79(4): 825-831.
- [14] 任初杰, 高丽, 王承明, 等. 碱提花生粕水溶性多糖工艺研究 [J]. *农业工程学报*, 2008, 24(7): 251-254.
- [15] 诸爱士, 叶金娜, 严飞娜. 均匀设计优化小米多糖提取工艺 [J]. *浙江科技学院学报*, 2013, 25(1): 27-32.
- [16] 李云雁, 胡传荣. 试验设计与数据处理 [M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2008: 128-145, 226.