

高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖工艺优化*

周亚军 贺琴 吴都峰 殷涌光 董周永

(吉林大学生物与农业工程学院, 长春 130022)

摘要: 利用高压脉冲电场从河蚌中辅助提取河蚌多糖来提高多糖得率。进行了单因素试验和 Box-Behnken 设计试验, 结果表明, 电场强度和脉冲数对河蚌多糖得率影响显著, 通过建立多糖得率与各影响因子之间关系的回归数学模型, 确定高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖的最佳工艺参数为电场强度 25 kV/cm、脉冲数 8、液料比 40 mL/g, 此时处理 2 g 样品所得多糖占样品湿质量的 4.99%。与超声波提取河蚌多糖对比试验表明, 高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖的得率较超声波提取提高了 11.9%, 且其处理时间较短。

关键词: 河蚌 多糖 高压脉冲电场 提取 工艺优化

中图分类号: TS254.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)S0-0236-05

引言

河蚌, 是一种贝壳类水生动物, 可产珍珠, 是高品质珍珠的来源, 在中国广泛分布^[1]。然而, 河蚌肉(生产淡水珍珠的废弃物)大部分都没有被充分利用, 甚至有相当一部分被直接丢弃, 造成了资源的浪费^[2]。河蚌早在医学记载就可用于清热消炎^[3], 现代科学研究也证实河蚌肉中含有丰富多糖, 具有良好的营养特性和药理功能^[4]。

高压脉冲电场(High intensity pulsed electric fields, PEF)是一种新的食品加工技术, 它是将液态的样品放置于容器中, 使其充当电解质, 电场中有两个与容器绝缘的电极, 它们可产生高压电流, 同时具有电脉冲作用, 由此对食品进行非热加工^[5-6]。PEF法处理样品过程中温度变化较小, 并且不会污染环境^[7], 操作安全、节约时间、消耗能量少, 主要应用于液体样品的低温杀菌^[8-9]、食品中的酶灭活、避免发生酶促反应^[10]和快速高效提取生物中大分子物质^[11-14]等, 但该技术河蚌多糖高效提取方面的研究与应用至今未见报道。本文将高压脉冲电场技术应用于河蚌多糖提取中, 为河蚌多糖的提取提供一种新的加工方法。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

材料: 河蚌(养殖)、葱酮(化学级)、浓硫酸(化学级)、冰醋酸(化学级)、氢氧化钾(化学级)、葡萄

糖(化学级)等。

设备: 高压脉冲电场系统(自制, 频率 10 ~ 5 000 Hz, 处理室体积 0.75 mm³)、TU-1810 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、JA3003A 型电子天平(上海精天电子仪器有限公司)、KQ-250DB 型数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司)、LD4-2A 型低速离心机(北京雷勃尔离心机有限公司)、FW177 型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)、SHA-C 型水浴恒温振荡器(金坛市恒丰仪器厂)等。

1.2 高压脉冲电场处理装置的结构

高压脉冲电场处理装置由脉冲电源、数字示波器和样品处理室 3 部分构成。脉冲电源产生的三角波形如图 1^[15]所示。高压脉冲电场实物如图 2 所示。高压脉冲电场装置工作流程^[8, 16]: 样品溶液经过蠕动泵被送进样品处理室, 经电场处理后收集到容器内, 由示波器指示样品处理过程中的波形、电流和电压。

1.3 试验方法

1.3.1 河蚌的预处理

新鲜的河蚌肉清洗干净, 用绞肉机绞碎, 置于干燥箱中干燥并用粉碎机粉碎, 过 200 目筛, 50℃干燥至质量恒定, 备用。

1.3.2 单因素试验设计

取 2 g 河蚌粉末, 按表 1 中因素及其对应水平采用高压脉冲电场进行提取, 提取液在 4 000 r/min 的条件下离心处理 10 min, 取上清液稀释从而测定多

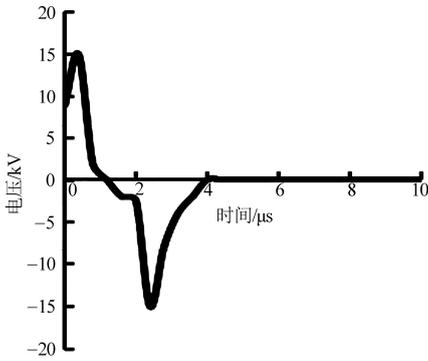


图1 脉冲的波形图

Fig.1 Oscillograph trace of pulse



图2 高压脉冲电场处理装置

Fig.2 High intensity pulsed electric field treatment device

表1 单因素试验因素水平

Tab.1 Single-factor experiments

水平	因素		
	电场强度/(kV·cm ⁻¹)	脉冲数	液料比/(mL·g ⁻¹)
1	15	6	20
2	20	8	30
3	25	10	40
4	30	12	50
5	35	14	60

糖得率^[17]。研究电场强度、脉冲数、液料比单因素对河蚌多糖得率的影响。

1.3.3 工艺优化试验设计

对电场强度、脉冲数、液料比这3个影响因素进行 Box-Behnken 设计^[18]的优化试验研究,其因素水平编码见表2,表中各因素水平真实值根据单因素试验结果得出。

表2 优化试验因素水平编码

Tab.2 Factors and levels of optimization experiments

编码	因素		
	电场强度 x_1 /(kV·cm ⁻¹)	脉冲数 x_2	液料比 x_3 /(mL·g ⁻¹)
-1	20	6	35
0	25	8	40
1	30	10	45

1.3.4 多糖得率的测定与计算

多糖得率采用硫酸蒽酮法^[19]进行测定。多糖

得率为

$$Y = \frac{m}{M} \times 100\%$$

式中 m ——提取物中多糖的质量

M ——样品湿质量

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 电场强度

电场强度对多糖得率的影响如图3所示。由图3可知,电场强度为25 kV/cm时,多糖得率最高;电场强度在15、20、25 kV/cm变化时,多糖得率逐渐提高,这是由于电场强度增大会破坏细胞膜,引起蛋白质变性^[20],在较高电场强度的作用下,由于细胞内外电场强度的差异使细胞膜损坏^[21],细胞内溶物更易溶出,较易提取细胞内物质;电场强度在25、30、35 kV/cm变化时,多糖得率逐渐降低,这可能是由于过高的电场强度会破坏多糖的糖苷键,使多糖发生降解^[17],从而降低多糖得率。因此,选电场强度25 kV/cm为合理值。

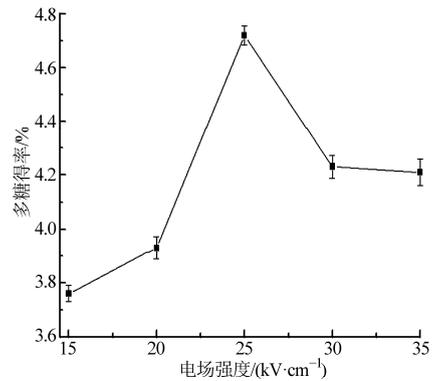


图3 电场强度对多糖得率的影响

Fig.3 Effect of electric-field strength on mussel polysaccharides extraction rate assisted by PEF

2.1.2 脉冲数

脉冲数对多糖得率的影响如图4所示。由图4可知,脉冲数为8时,多糖得率最高;脉冲数从6到8变化时,多糖得率逐渐提高;脉冲数在8、10、12、14变化时,多糖得率逐渐降低。这是由于增大脉冲数时,细胞破坏程度有所增加,但同时也引起了多糖降解^[17],使多糖得率先增加后降低。因此,选脉冲数8为合理值。

2.1.3 液料比

液料比对多糖得率的影响如图5所示。由图5可知,液料比为40 mL/g时,多糖得率最高;当液料比由20、30、40、50、60 mL/g逐渐增加时,多糖得率逐渐提高,并逐渐平缓趋于稳定。这是因为当增大溶剂用量时,样品与溶剂充分接触,有效成分溶出较

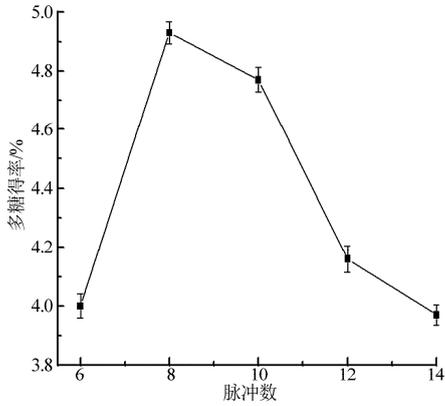


图4 脉冲数对多糖得率的影响

Fig. 4 Effect of pulses number on mussel polysaccharides extraction rate assisted by PEF

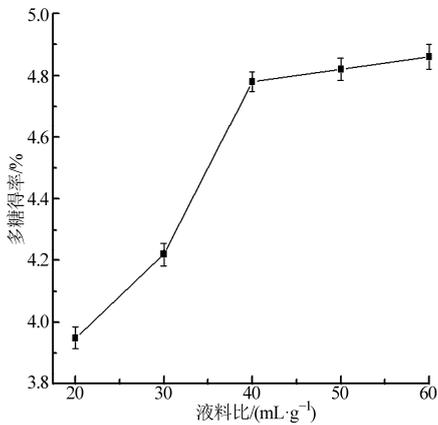


图5 液料比对多糖得率的影响

Fig. 5 Effect of water-powder ratio on mussel polysaccharides extraction rate assisted by PEF

多,使得率增加,溶剂用量增加到一定程度时,因样品与溶剂接触已足够充分,得率增加不明显,趋于稳定。因此,选择 40 mL/g 为合理配比。

2.2 基于 Box-Behnken 设计的高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖工艺优化试验

为了研究电场强度、脉冲数、液料比及其交互作用对河蚌多糖得率的影响,根据上述单因素试验结果,选定中心点值,进行电场强度、脉冲数、液料比的三因素三水平 Box-Behnken 优化试验,其试验方案设计及其结果见表 3。

利用 Design-Expert 软件拟合的多糖得率 Y 的二次多项回归方程为

$$Y = -22.00225 + 0.83075X_1 + 1.29113X_2 + 0.5724X_3 - 2.5 \times 10^{-3}X_1X_2 + 5 \times 10^{-4}X_1X_3 - 3.25 \times 10^{-3}X_2X_3 - 0.01718X_1^2 - 0.066125X_2^2 - 6.88 \times 10^{-3}X_3^2 \quad (2)$$

对该模型进行方差分析,结果见表 4。表 4 中 Design-Expert 软件分析结果显示,模型的 F 值为 31.96, $P < 0.0001$,说明该模型是极显著的,并且失拟性 P 值为 0.1367 (> 0.05),表明失拟不显著,回

归显著。模型的决定系数 $R^2 = 0.9762$,表明该模型拟合程度良好,可以用该模型优化河蚌多糖提取工艺参数。模型一次项中电场强度和脉冲数对多糖得率均有显著影响,其影响力电场强度要大于脉冲数;二次项中 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对多糖得率的影响均显著;交互项中 X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_1X_3 对多糖得率影响均不显著。

表3 Box-Behnken 设计试验方案及结果

Tab.3 Experimental design and results for mussel polysaccharides extraction assisted by PEF

试验序号	X_1	X_2	X_3	多糖得率/%
1	-1	-1	0	4.36
2	1	-1	0	4.02
3	-1	1	0	4.59
4	1	1	0	4.15
5	-1	0	-1	4.45
6	1	0	-1	4.25
7	-1	0	1	4.47
8	1	0	1	4.32
9	0	-1	-1	4.37
10	0	1	-1	4.58
11	0	-1	1	4.56
12	0	1	1	4.64
13	0	0	0	4.91
14	0	0	0	4.93
15	0	0	0	5.03
16	0	0	0	5.01
17	0	0	0	4.99

表4 回归模型方差分析

Tab.4 Variance analysis of experimental results

变异来源	平方和	自由度	均方差	F	P
模型	1.55	9	0.17	31.96	<0.0001
X_1	0.16	1	0.16	29.68	0.0010
X_2	0.053	1	0.053	9.82	0.0165
X_3	0.014	1	0.014	2.69	0.1452
X_1X_2	2.5×10^{-3}	1	2.5×10^{-3}	0.46	0.5173
X_1X_3	6.25×10^{-4}	1	6.25×10^{-4}	0.12	0.7432
X_2X_3	4.225×10^{-3}	1	4.225×10^{-3}	0.79	0.4048
X_1^2	0.78	1	0.78	144.43	<0.0001
X_2^2	0.29	1	0.29	54.77	0.0001
X_3^2	0.12	1	0.12	23.16	0.0019
残差	0.038	7	5.378×10^{-3}		
失拟性	0.027	3	8.975×10^{-3}	3.35	0.1367
纯误差	0.011	4	2.68×10^{-3}		
总变异	1.58	16			
$R^2 = 0.9762$		变异系数 1.61%		$R_{adj}^2 = 0.9457$	

在试验结果的基础上绘制 3D 效果图如图 6 所示。从图 6 中可以看出,电场强度对多糖得率的影响最为显著,脉冲数和液料比的影响次之,较高的得率出现在 3D 效果图中心值的区域部分。

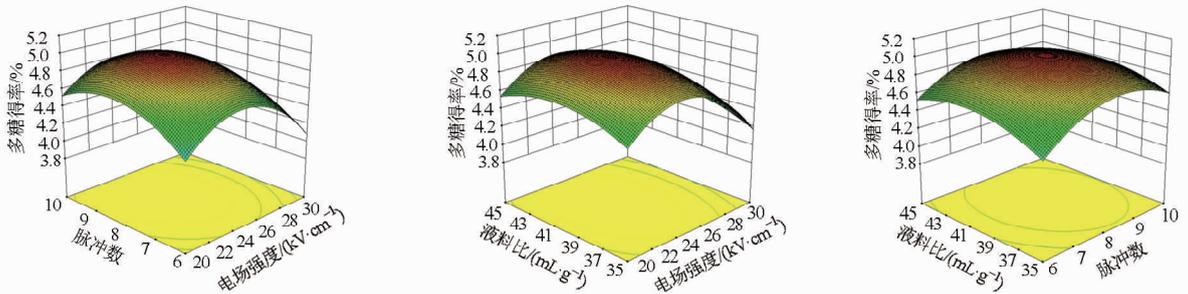


图6 各因素交互影响的响应曲面

Fig. 6 Response surface of interaction of various factors

通过 Design-Expert 软件对回归方程的求解,在试验的因素水平范围内预测的高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖的最佳工艺条件为:电场强度 24.16 kV/cm,脉冲数 8.31,液料比 40.52 mL/g,在此条件下预测的多糖得率可达到 4.994 32%。为了进一步验证这一结果的准确性,根据实际试验条件,在电场强度为 25 kV/cm,脉冲数为 8,液料比为 40 mL/g 的条件下进行了 3 次验证试验,用硫酸蒽酮法测得多糖得率为 4.99%,与预测值非常接近,其微小差距本研究认为是操作和测定过程中所存在的正常误差,因此认为响应曲面法得到的结果具备可靠性。

2.3 超声波与高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖的对比试验

超声波提取法也是首次应用于提取河蚌多糖。取相同的河蚌粉 2 g,经单因素和正交试验得出,超声波辅助提取河蚌多糖的最优条件为液料比 30 mL/g、提取时间 30 min、超声功率 175 W、提取温度 30℃,此时河蚌多糖得率最高为 4.46%。高压脉冲电场和超声波最佳工艺参数辅助提取河蚌多糖对比试验结果如表 5 所示。由表 5 可知,高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖得率高于超声波辅助提取法,且得率较超声波辅助法提高了 11.9%,比碱法提高了 2 倍还要多。超声波处理时间 30 min 远超过高压脉冲电场 4.5 μs 的处理时间。因此,高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖处理时间短,提取效果较佳。

表 5 3 种提取方法的对比

Tab. 5 Comparison of three experimental methods

提取方法	液料比 /(mL·g ⁻¹)	电场强度 /(kV·cm ⁻¹)或 超声功率/W	处理 时间	多糖 得率/%
PEF	40	25	4.5 μs	4.99
超声波 ^[22]	30	175	30 min	4.46
碱法 ^[17]	50	—	2 h	2.14

河蚌来源广泛,易于获取,价格低廉,利用高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖方便快捷,能耗较低,且河蚌多糖可进一步加工运用于功能性食品或医药行业中。因此,高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖具有良好的应用前景,具备实现规模化生产的条件。

3 结论

(1) 通过单因素试验和 Box-Behnken 试验设计优化出高压脉冲电场法提取河蚌多糖的最佳条件为电场强度 25 kV/cm,脉冲数 8,液料比 40 mL/g,此时多糖得率高达 4.99%。

(2) 超声波与高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖的对比试验结果表明,高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖得率(4.99%)高于超声波辅助提取法(4.46%),得率提高了 11.9%,比碱法提高了 2 倍多,高压脉冲电场处理时间 4.5 μs 远低于超声波 30 min 的处理时间。

参 考 文 献

- 1 Qiao Deliang, Hu Bing, Gan Dan, et al. Extraction optimized by using response surface methodology, purification and preliminary characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 76(3): 422 - 429.
- 2 乔德亮. 三角帆蚌多糖提取、纯化、生物活性及其结构[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
Qiao Deliang. Extraction, purification, bioactivity and structure of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009. (in Chinese)
- 3 沈鸿, 窦昌贵. 河蚌多糖提取工艺的优化[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 380 - 381.
Shen Hong, Dou Changgui. Optimum extraction process of mussel polysaccharide [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2006, 17(3): 380 - 381. (in Chinese)
- 4 湛孝东, 王克霞, 李朝品. 贝类多糖生物学活性研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(17): 1285 - 1286.
Zhan Xiaodong, Wang Kexia, Li Zhaopin. Shellfish polysaccharide biological activity research progress [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2006, 17(17): 1285 - 1286. (in Chinese)

- 5 Donsi F, Ferrari G, Pataro G. Applications of pulsed electric field treatments for the enhancement of mass transfer from vegetable tissue[J]. *Food Engineering Reviews*, 2010, 2(2):109 – 130.
- 6 李迎秋,陈正行. 高压脉冲电场对大豆分离蛋白功能性质的影响[J]. *农业工程学报*, 2006, 22(8):194 – 198.
Li Yingqiu, Chen Zhengxing. Effect of high intensity pulsed electric field on the functional properties of protein isolated from soybean[J]. *Transactions of the CSAE*, 2006, 22(8):194 – 198. (in Chinese)
- 7 李静,廖小军,钟葵,等. 高压脉冲电场对酿酒酵母钝化机理研究[J]. *农业工程学报*, 2011, 27(4):355 – 360.
Li Jing, Liao Xiaojun, Zhong Kui, et al. Inactivation mechanism of pulsed electric fields on *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Transactions of the CSAE*, 2011, 27(4):355 – 360. (in Chinese)
- 8 赵武奇,殷涌光,关伟,等. 高压脉冲电场杀菌系统设计及试验[J]. *农业机械学报*, 2002, 33(3):67 – 69.
Zhao Wuqi, Yin Yongguang, Guan Wei, et al. Experimental study on a food pasteurization system by using a high voltage pulsed field[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2002, 33(3):67 – 69. (in Chinese)
- 9 Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering [J]. *Biopolymers*, 2008, 89(5):338 – 344.
- 10 钟葵,胡小松,陈芳,等. 脉冲电场对果胶酯酶的活性及构象的影响[J]. *农业工程学报*, 2005, 21(2):149 – 152.
Zhong Kui, Hu Xiaosong, Chen Fang, et al. Affect of pulsed electric field on the pectin esterase activity and conformation[J]. *Transactions of the CSAE*, 2005, 21(2):149 – 152. (in Chinese)
- 11 张铁华,殷涌光. 高压脉冲电场对食品中生物大分子的影响[J]. *食品科技*, 2007(7):16 – 20.
Zhang Tiehua, Yin Yongguang. Effect of high-intensity pulsed electric fields (PEF) on food biomacromolecule[J]. *Food Science and Technology*, 2007(7):16 – 20. (in Chinese)
- 12 金声琅,殷涌光,王莹. 脉冲电场协同加热对乳清蛋白凝胶质构特性的影响[J]. *农业机械学报*, 2013, 44(1):142 – 146.
Jin Shenglang, Yin Yongguang, Wang Ying. Effects of combined pulsed electric field and heat treatment on texture characteristics of whey protein gels[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2013, 44(1):142 – 146. (in Chinese)
- 13 赫桂丹,殷涌光,闫琳娜,等. 应用高压脉冲电场辅助快速提取虾壳壳聚糖[J]. *农业工程学报*, 2011, 27(6):344 – 348.
He Guidan, Yin Yongguang, Yan Linna, et al. Fast extraction of chitosan from shrimp shell by high intensity pulsed electric fields[J]. *Transactions of the CSAE*, 2011, 27(6):344 – 348. (in Chinese)
- 14 殷涌光,樊向东,刘凤霞,等. 用高压脉冲电场技术快速提取苹果渣果胶[J]. *吉林大学学报:工学版*, 2009, 39(5):1224 – 1228.
Yin Yongguang, Fan Xiangdong, Liu Fengxia, et al. Fast extraction of pectin from apple pomace by high intensity pulsed electric field[J]. *Journal of Jilin University: Engineering and Technology Edition*, 2009, 39(5):1224 – 1228. (in Chinese)
- 15 周亚军,隋思瑶,黄卉,等. 高压脉冲电场提取鱼骨钙工艺优化[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(23):265 – 270.
Zhou Yajun, Sui Siyao, Huang Hui, et al. Process optimization for extraction of fishbone calcium assisted by high intensity pulsed electric fields[J]. *Transactions of the CSAE*, 2012, 28(23):265 – 270. (in Chinese)
- 16 Asavasanti S, Ersus S, Ristenpart W, et al. Critical electric field strengths of onion tissues treated by pulsed electric fields[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(7):E433 – E443.
- 17 韩玉珠. 高压脉冲电场常温快速提取中国林蛙多糖工艺及机理研究[D]. 长春:吉林大学, 2006.
Han Yuzhu. Study on process and mechanism of rana temporaria chensinensis david polysaccharide rapid extraction by pulsed electric field under room temperature [D]. Changchun: Jilin University, 2006. (in Chinese)
- 18 苏丹. 老龄梅花鹿肉嫩化方法研究[D]. 长春:吉林大学, 2012.
Su Dan. Research on tenderizing methods of aging sika meat [D]. Changchun: Jilin University, 2012. (in Chinese)
- 19 张国伟,李彩霞,王艳峰,等. 高效液相法与硫酸-萘酚法测定猪苓多糖含量比较[J]. *天然产物研究与开发*, 2011(23):1099 – 1102.
Zhang Guowei, Li Caixia, Wang Yanfeng, et al. Determination and comparison of polyporus polysaccharide by HPLC and Anthrone-Sulfuric acid method[J]. *Natural Product Research and Development*, 2011(23):1099 – 1102. (in Chinese)
- 20 曾新安,陈勇. 脉冲电场非热灭菌技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2005.
- 21 张晓辉,张志霞,李艳贞,等. 基于细胞多层介电模型的脉冲电场生物学效应研究[J]. *农业机械学报*, 2014, 45(4):253 – 258.
Zhang Xiaohui, Zhang Zhixia, Li Yanzhen, et al. Biological effects of pulsed electric field based on multi-shelled dielectric model of spherical cell[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2014, 45(4):253 – 258. (in Chinese)
- 22 姜晓东. 青蒿多糖的超声提取及其免疫活性的研究[D]. 长春:吉林大学, 2010.
Jiang Xiaodong. Study on the ultrasonic-assisted extraction and immune activity of polysaccharide from sweet wormwood herb[D]. Changchun: Jilin University, 2010. (in Chinese)

calorimeter. The result showed that three gum all could significantly enhance the tensile resistance of the dough (both fresh and frozen dough), and X caused most obvious increase by 76% and 58%, which made the maximum tensile resistance of fresh and frozen dough. For yeast fermenting power, dough with X or A both showed a higher yeast power of gas, which improved the gas production of fresh and frozen dough by 119% and 208%, 83% and 113%, respectively, while SC had no effect. For freezable water, the three kinds of gum reduced freezable water content in frozen dough, which played a role in protection of yeast during freezing, and the effect from large to small was A, X and SC. To realize the influence of hydrocolloids on bread quality, the bread made of fresh and frozen dough added X, SC or A with the indicators of bread specific volume and textural properties of crumb were evaluated by texture analyzer. The results showed that A improved either fresh or frozen dough bread quality, which increased the specific volume of bread made with fresh and frozen dough by 9% and 16%, respectively. X and SC had no positive effects on overall bread quality, but X had a positive effect on improving the resilience of frozen dough bread crumb.

Key words: Frozen dough Hydrocolloids Dough fermentation Bread quality

(上接第 240 页)

Process Optimization for Extraction of Mussel Polysaccharides Assisted by High Intensity Pulsed Electric Fields

Zhou Yajun He Qin Wu Dufeng Yin Yongguang Dong Zhouyong

(College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China)

Abstract: The high intensity pulsed electric fields (PEF) technique was applied for assisted extraction of mussel polysaccharides to improve the efficiency of mussel polysaccharides extraction. The single factor test and Box-Behnken design results showed that electrical field strength and pulse number were the significant affecting factors on the extraction efficiency of mussel polysaccharides. With mathematical regression model analysis of extraction efficiency and the impact factor, the optimal combination of parameters was found that electrical field strength was 25 kV/cm, pulse number was 8, water-powder ratio was 40 mL/g. Under the optimized condition, the extraction rate of 2 g mussel was up to 4.99% (polysaccharides-wet weight sample ratio). Compared with ultrasonic technique, high intensity pulse electric fields is less time-consuming with higher extraction efficiency. The study can provide a reference for further studies of extraction of mussel polysaccharides.

Key words: Mussel Polysaccharides High intensity pulsed electric fields Extraction Processing optimization