

汽爆葛根直接固态发酵乙醇联产葛根黄酮

付小果¹, 陈洪章¹, 汪卫东²

1 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190

2 湖南省强生药业有限公司, 长沙 410005

摘要: 针对葛根原料富含纤维和黄酮等特点, 选用低压汽爆处理代替糊化直接固态同步糖化发酵乙醇, 而后提取发酵剩余物的葛根黄酮。实验结果表明鲜葛根在 0.8 MPa 压力下维持 3.5 min 汽爆处理后, 直接加入糖化酶(65 u/g)、纤维素酶(1.5 u/g)、0.1%(NH₄)₂SO₄、0.1%KH₂PO₄ 和活化后的酵母, 35~37°C 下, 固态同步糖化发酵 60 h, 100 g 干葛根可生产的乙醇与葛根黄酮分别为 27.47 g、4.43 g, 淀粉利用率达到 95%。该方法实现了葛根分层多级转化清洁利用, 为非粮食类淀粉资源发酵乙醇提供了一条新途径。

关键词: 葛根, 汽爆, 乙醇, 黄酮

Production of Ethanol and Isoflavones from Steam-pretreated Radix Puerariae by Solid State Fermentation

Xiaoguo Fu¹, Hongzhang Chen¹, and Weidong Wang²

1 Key State Laboratory of Biochemical Engineering Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

2 Hunan Qiangsheng Medicine Co. Ltd., Changsha 410005, China

Abstract: The gelatinization process of the starch is replaced by unpolluted steam-pretreatment on the base of the Radix Puerariae rich in fiber and isoflavones. The production of ethanol and isoflavones by simultaneous saccharification and solid state fermentation (SSF) of steam-pretreatment Radix Puerariae is presented. The optimal technological conditions were obtained: Radix Puerariae being steam-pretreated at a saturated vapor pressure of 0.8 MPa for 3.5 min, glucoamylase(65 u/g), cellulase(1.5 u/g), 0.1%(NH₄)₂SO₄, 0.1%KH₂PO₄ and activated yeasts being added in, and fermentation at 35~37°C for 60 h. Under these conditions, the yield of ethanol and isoflavones from 100 g Radix Puerariae (dry basis) were 27.47 g and 4.43 g, respectively, the starch utilization rate was 95%. In comparison with the traditional fermentation technology, the simultaneous saccharification and SSF of steam-pretreatment Radix Puerariae is clean and energy-saving. It provides new way of the production of ethanol from the non-food starch material, and worthwhile to be explored and implemented in industry.

Keywords: radix puerariae, steam-pretreatment, ethanol, isoflavones

当前淀粉质原料生产乙醇普遍采用原料粉碎-蒸煮糊化-糖化-液体发酵-初级蒸馏的工艺^[1], 生产中原料的糊化是一个高耗能过程, 所耗能量占乙醇

生产能耗的 30%~40%。针对葛根原料富含淀粉、纤维及其黄酮的特点^[2,3], 若按此工艺生产乙醇, 一方面, 由于葛根中含有大量的纤维(9%~15%), 将大大

Received: March 11, 2008; Accepted: March 17, 2008

Supported by: the National Basic Research Program of China (973 Program)(No. 2004CB719700).

Corresponding author: Hongzhang Chen. Tel: +86-10-82627067; E-mail: hzchen@home.ipe.ac.cn

国家重点基础研究发展规划(973)项目(No. 2004CB719700)资助。

提高原料粉碎的机械能耗,也将成为淀粉高效溶出的阻碍;另一方面,液态发酵易产生大量高浓度有机废水,不仅容易造成环境污染,而且难以提取葛根黄酮,造成资源的浪费。

针对上述问题,在多年研究蒸汽爆破^[4]与固态发酵^[5]基础上,引入低压汽爆对淀粉质原料葛根进行预处理,并探索汽爆葛根直接固态同步糖化发酵乙醇,而后提取发酵剩余物中葛根黄酮的可行性。汽爆处理破坏固体物料结构,削弱其纤维组织对淀粉、黄酮溶出的阻碍作用,同时代替淀粉的糊化过程,降低能耗。采用固态发酵方式发酵,减少后续废水的处理过程,也为葛根黄酮的提取创造了条件。以下将探讨其工艺条件,并与传统的发酵工艺进行比较,为葛根资源的高效清洁综合利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲜葛根来源于中国湖南,检测其淀粉含量为17.15%,水分66.5%,折合干葛根淀粉含量51.2%。实验用 α -淀粉酶和糖化酶的酶活力均为20000 u/g(北京东华强盛生物技术有限公司生产),活性干酵母(湖北宜昌安琪酵母股份有限公司生产)。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵工艺流程^[6]



1.2.2 葛根的汽爆预处理

约0.5 kg新鲜葛根切碎至10~15 cm小段,加入到实验室自行设计的5 L批式汽爆罐中,在蒸汽压力0.5~1.0 Mpa的条件下蒸汽爆破处理2~4 min。

1.2.3 汽爆葛根同步糖化固态发酵生产乙醇

在无菌条件下,汽爆预处理后的葛根加入糖化酶,纤维素酶, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 和活化后的酵母,在30°C~35°C条件下进行厌氧发酵48~72 h,蒸馏收集发酵产生的乙醇。

1.2.4 发酵剩余物提取葛根黄酮^[7]

称取蒸馏乙醇后的发酵渣10 g,按照发酵渣与提取溶剂体积比为1:6加入浓度为80%的乙醇,在80°C加热回流提取2 h,过滤,测定滤液中葛根黄酮的含量,计算葛根黄酮的得率。

1.2.5 实验分析方法

乙醇含量采用HPLC(Agilent 1200)法测定[: 条件为: Aminex HPX-87H柱,流动相为5 mmol/L硫酸,流速为0.6 mL/min,进样量为20 μL ,柱温35°C,示差折光检测器(G1362A RID)检测。

葛根黄酮含量采用HPLC(Agilent 1200)法测定: 条件为C18反向柱,流动相为甲醇:水(25:75),流速为1.000 mL/min,柱温30°C,以葛根素为标样,在紫外检测器波长250 nm下检测。

还原糖的检测采用DNS法^[8],总糖的测定采用苯酚-硫酸法^[9]。

2 结果

2.1 汽爆预处理条件对葛根可溶性糖含量及黄酮提取率的影响

将葛根在蒸汽压力0.5~1.0 MPa的条件下蒸汽爆破处理2.5 min,然后分别称取约5 g的干汽爆料,加入50 mL蒸馏水在室温下浸泡15 min,过滤,测定滤液中的水溶性还原糖与水溶性总糖含量;分别称取约10 g的干汽爆料按照1.2.4的方法提取葛根黄酮,测定葛根黄酮的含量,计算黄酮的得率,结果见表1。

表1 汽爆压力对葛根中可溶性糖含量以及黄酮提取率的影响

Table 1 Effect of saturated vapor pressure on the content of sugars and the yield of isoflavones

Pressure (Mpa)	Reduced sugar (g/L)	Total sugar (g/L)	Isoflavones (%)
0	12.67	17.43	1.433
0.5	15.44	23.14	2.748
0.6	16.15	24.53	0.902
0.7	17.44	24.73	0.838
0.8	25.02	31.91	1.164
0.9	19.71	19.89	1.322
1.0	22.55	23.74	1.603

由表1看出,不同的蒸汽压力条件下汽爆处理,对物料的预处理效果不同。随汽爆压力的增大,物料中水溶性还原糖、水溶性总糖的含量先增大后降低。蒸汽爆破的热机械化学作用,使植物组织的细胞壁破裂,破坏了固体物料葛根的结构,使葛根淀粉水解产生的糖浓度升高,但是进一步增大汽爆压力,物料中的可溶性糖可能反应而被损失。葛根总

黄酮的提取量与物料的性质有很大关系,不同的汽爆压力处理后,葛根淀粉的糊化程度不一,从而直接影响葛根黄酮的析出,因此汽爆处理后的物料中,葛根黄酮的提取量随汽爆压力的变化而变化,选取合适的汽爆压力将有助于葛根黄酮提取量的提高,初步考虑葛根的汽爆效果,选取 0.8 MPa 作为下一步实验的汽爆压力。

将新鲜葛根在 0.8 MPa 下分别维压处理 2~4 min,测定不同汽爆维压时间处理后物料的水分、水溶性还原糖、水溶性总糖以及黄酮的含量,实验结果见表 2。

表 2 汽爆维压时间对葛根中可溶性糖及其黄酮提取率的影响

Time (min)	Reduced sugar (g/L)	Total sugar (g/L)	Isoflavones (%)
0	12.67	17.43	1.433
2.0	19.73	23.13	0.838
2.5	25.02	27.53	1.164
3.0	18.35	24.73	1.693
3.5	20.02	27.91	1.731
4.0	17.06	19.89	1.627

由表 2 看出,在 0.8 MPa 维压处理 3.5 min,物料中水溶性的还原糖含量、水溶性总糖含量以及葛根黄酮的提取量都有一个较好的水平。

2.2 发酵时间对汽爆葛根发酵乙醇的影响

从图 1 看出,发酵的初期,淀粉的利用率上升较快,但是在发酵 48 h 后,乙醇的得率上升缓慢,且 60 h 基本达到发酵的终点。在后续的发酵中,以 60 h 为发酵的周期。

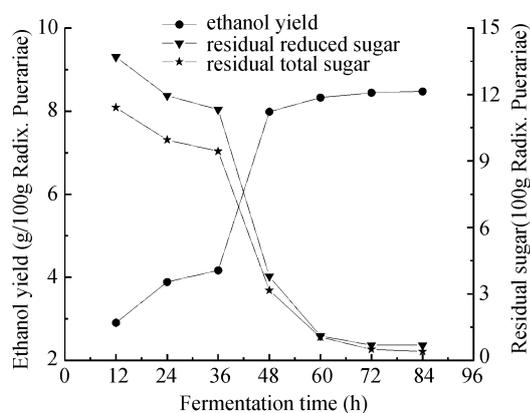


图 1 发酵时间对乙醇发酵的影响

Fig. 1 Effect of fermentation time on the ethanol yield and residual sugar

2.3 糖化酶添加量对汽爆葛根发酵乙醇的影响

糖化酶将葛根中的淀粉分解成可发酵性糖,以利于酵母发酵生产乙醇。糖化酶的用量对乙醇发酵有很大的影响,糖化酶的用量太少,会造成发酵不彻底;糖化酶太多,则增加了生产成本。糖化酶的添加量对汽爆葛根发酵的影响结果见图 2。

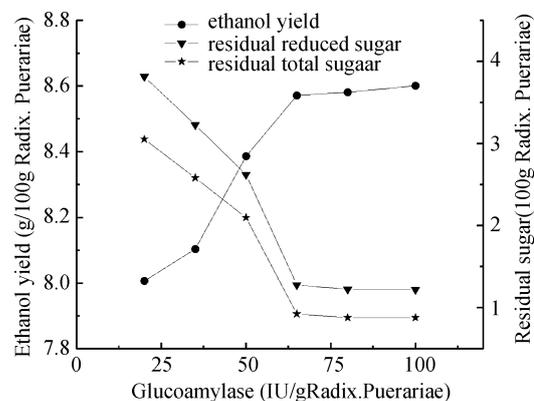


图 2 糖化酶加入量对发酵的影响

Fig. 2 Effect of glucoamylase on the ethanol yield and residual sugar

从图 2 看到,葛根发酵乙醇的得率基本上随着糖化酶添加量的增加而升高。在添加量达到 65 u/g 物料时,基本达到最大。从残余总糖也可以看出,糖化酶添加量较少,残糖较多,发酵不彻底。但是在糖化酶的添加量超过 65 u/g 物料时,乙醇的得率增加缓慢,因此,为节省成本,糖化酶的添加量以 65 u/g 物料为准。

2.4 纤维素酶加入量对汽爆葛根发酵乙醇的影响

葛根中约含有 5%~10%(干重)的粗纤维,葛根原料经低压蒸汽爆破预处理后,其中的半纤维素降解为可溶性糖,同时复合胞间层的木质素软化和部分降解,从而消弱了纤维间的粘结。在此基础上,如果再加入一定量的纤维素酶,破坏其纤维素结构,将对汽爆葛根发酵燃料乙醇产生影响。

从图 3 看出,加入少量的纤维素酶,有利于乙醇发酵,但随着物料中纤维素酶量的增加,葛根发酵乙醇的产率反而降低,可能由于纤维素酶的加入,使发酵醪的粘度增加,不利于发酵的进行。因此纤维素酶的适宜加入量为 1.5 u/g 物料。

2.5 营养盐对汽爆葛根发酵乙醇的影响

无机盐类是微生物生命活动不可缺少的物质,其主要功能是参与构成菌体成分,作为酶的组成部

分或维持酶的活性、调节渗透压等。乙醇发酵过程中，酵母细胞的生长同样需要营养盐的参与，本实验综合考虑 4 种营养盐在不同浓度组合下对乙醇发酵的影响。

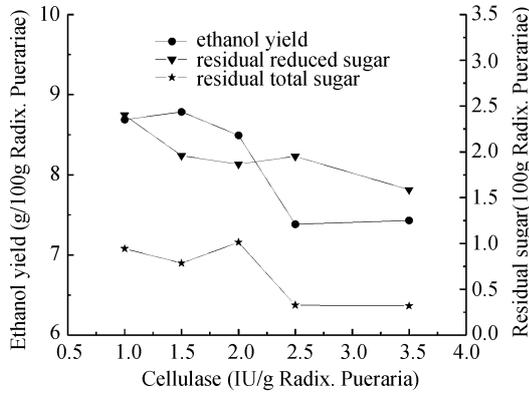


图 3 纤维素酶加入量对发酵的影响

Fig. 3 Effect of cellulase on the ethanol yield and residual sugar

从表 3 中，对平行试验结果的直观分析可知，4 因素的 K 值的最大值分别为：KA=1.37, KB=0.44, KC=0.95, KD=0.76，即各因素的最优水平分别是：(NH₄)₂SO₄ 取水平 2、KH₂PO₄ 取水平 2、MgSO₄ 和 CaCl₂ 都取水平 1，即 A₂B₂C₁D₁ 组合为最优。(NH₄)₂SO₄、KH₂PO₄、MgSO₄、和 CaCl₂ 的最优添加量分别为 0.1%、0.1%、0%和 0%。

表 3 不同营养盐对发酵的影响

Table 3 Effect on the ethanol yield and residual sugar of the content of nutrition salt

	A%	B%	C%	D%	Yield(%)
1	0.05	0	0	0	7.93
2	0.05	0.1	0.1	0.1	5.97
3	0.05	0.2	0.2	0.2	6.35
4	0.1	0	0.1	0.2	7.59
5	0.1	0.1	0.2	0	8.5
6	0.1	0.2	0	0.1	8.27
7	0.2	0	0.2	0.1	5.89
8	0.2	0.1	0	0.2	8.27
9	0.2	0.2	0.1	0	8.07
k1	20.25	21.41	24.47	24.50	
k2	24.36	22.74	21.63	20.13	
k3	22.23	22.69	20.74	22.21	
K1	6.75	7.14	8.16	8.17	
K2	8.12	7.58	7.21	6.71	
K3	7.41	7.56	6.91	7.40	
R	1.37	0.44	0.95	0.76	
Q	2	2	1	1	

2.6 葛根发酵生产乙醇的不同工艺

根据上述优化的葛根汽爆预处理以及汽爆葛根同步糖化固态发酵工艺参数，将葛根分别按照以下四种工艺路线发酵乙醇。A)葛根固态发酵乙醇：加淀粉酶后 85°C~95°C 蒸煮、加糖化酶糖化、接种酵母发酵固态发酵；B)葛根同步糖化固态发酵乙醇：加淀粉酶后 85°C~95°C 蒸煮、加入糖化酶同时接种酵母同步糖化固态发酵；C)葛根无蒸煮无糖化发酵：即生料发酵，加料的同时加入糖化酶并接种酵母发酵；D)葛根低压汽爆-同步糖化固态发酵乙醇：葛根低压(0.5~1.0 MPa)短时间(2~4 min)汽爆预处理后，加入糖化酶同时接种酵母同步糖化固态发酵。测定发酵料中的乙醇得率，残余还原糖与残余总糖以及从发酵料中葛根总黄酮的提取量。实验结果见表 4。从表 4 看出，葛根采用同步糖化固态发酵生产乙醇，

表 4 不同工艺技术方案对葛根发酵乙醇的影响

Table 4 Effect of different fermentation technics on the ethanol fermentation of Radix Puerariae

	A	B	C	D
Moisture (%)		66.5		
Content of dry starch (%)		51.2		
Pressure (Mpa)				0.8
Maintained time (min)				3.5
Radix.Puerariae to water	3:1	3:1	3:1	
Cellulase (u/g)	1.5	1.5	1.5	1.5
α-amylase (u/g)	5.0	5.0	5.0	
Temperature (°C)	90	90		
Liquefaction time (min)	40	40		
Glucosylase (u/g)	50	65	65	65
Saccharification temperature (°C)	60			
Saccharification time (min)	60			
Nutrition salt(%)	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1	0.1	0.1
	KH ₂ PO ₄	0.1	0.1	0.1
Yield of ethanol (%)	7.40	9.05	4.65	9.20
Starch utilization rate (%)	76	93	47.8	95
Residual reduced sugar (%)	0.914	0.49	3.34	0.644
Residual total sugar (%)	3.217	0.69	4.82	0.912
Isoflavones (%)	0.7943	0.9021	0.5431	1.4834

在发酵过程中省略了糖化工段, 能耗降低; 糖化和发酵同时进行, 糖化生产的葡萄糖一经生产就被酵母利用, 可保持较低的水平, 有利于防止染菌。发酵前添加纤维素酶, 降解葛根外表皮的纤维素组分, 有利于葛根淀粉的糊化, 淀粉利用率较一般的固态发酵工艺的 76% 提高到 93%, 100 g 鲜葛根发酵酒精得率由 7.4% 提高到 9.05%, 提高了 18.23%。汽爆处理葛根同步糖化固态发酵生产乙醇工艺采用短时间 (2~4 min) 的蒸汽爆破技术对葛根进行预处理后, 可直接进行发酵, 但淀粉利用率达到了 95%, 酒精得率为 9.2%, 黄酮提取率也达到了 1.4834%, 折合 100 g 干葛根计算酒精与黄酮得率分别为 27.47 g 与 4.43 g, 实现了乙醇与葛根黄酮的联产。

3 结论

新鲜葛根, 不用添加任何水分进行汽爆处理, 蒸汽爆破的热机械化学作用等, 使植物组织的细胞壁破裂, 破坏了固体物料葛根的结构, 削弱了纤维组织对淀粉、黄酮溶出的阻碍作用。汽爆处理后的葛根可直接固态同步糖化发酵乙醇, 省去了淀粉质原料的长时间蒸煮糊化过程 (30~120 min), 降低了发酵生产乙醇的能耗, 减少了后续废水的处理过程。

同步糖化发酵生产乙醇, 省略了糖化工段, 能耗降低。糖化和发酵在同一个反应器中进行, 设备投资省; 另外糖化和发酵同时进行, 糖化生产的葡萄糖一经产生就被酵母利用, 可保持较低的水平, 有利于防止染菌。而发酵剩余物如果忽略葛根总黄酮的提取, 不但造成资源的浪费, 更可能造成生态环境问题。从发酵剩余物提取葛根总黄酮, 综合利用葛根, 提高了经济效应, 有利于葛根的工业化生产。

针对葛根原料富含纤维和黄酮等特点, 选用低压汽爆处理代替糊化直接固态同步糖化发酵乙醇, 而后提取发酵剩余物的葛根黄酮, 实现了葛根分层多级转化清洁利用, 为非粮食类淀粉资源发酵乙醇提供了一条新途径。

REFERENCES

- [1] Zhou JY. Answer and Question on the Technical of Ethanol. Cheng Dou: Sichuan of Science and technology Press, 1987.
周敬宜. 乙醇生产技术问答. 成都: 四川科学技术出版社. 1987.
- [2] Zheng H. Advances of research and development of *Pueraria Radices*. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2006, **28**(2): 24–26.
郑皓. 葛根的研究与开发现状. 氨基酸和生物资源, 2006, **28**(2): 24–26.
- [3] Zheng H, Zhao L. Analysis and study on chemical constitutes and origin of different kinds of *Pueraria Radices*. *Chinese Journal of Management in Chinese Medicine*. 2006, **14**(4): 51–53.
郑皓, 赵冉. 不同品种葛根产地及化学成分分析研究, 中医药管理杂志, 2006, **14**(4): 51–53.
- [4] Chen HZ, Liu LY. Steam Explosion Technology Principle and Application. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.
陈洪章, 刘丽英著. 蒸汽爆破技术原理及其应用. 化学工业出版社, 2007.
- [5] Chen HZ, Xu J. Modern Times Solid State Fermentation Principle and Application. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.
陈洪章, 徐建著. 现代固态发酵原理与应用. 化学工业出版社, 2004.
- [6] Chen HZ, Fu XG, Wang WD. The utilization technical and reactor of Steam-pretreated Radix *Puerariae*. PCT/CN2007/ 002268, 2007.
陈洪章, 付小果, 汪卫东. 一种对汽爆葛根进行综合利用的工艺及其使用设备. PCT 专利申请号 PCT/CN2007/ 002268, 申请日期 2007.7.27
- [7] Wichai C, Subongkoj S, Winai D. Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, **43**: 428–434.
- [8] Zhang WJ. Research Methods of Glycoconjugates Biochemistry, Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999: 10–11.
张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 杭州: 浙江大学出版社, 1999. 10–11.
- [9] Food Analysis. Beijing: China Light Industry Press, 1994.
食品分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.