

响应曲面法优化葛根保健酒发酵工艺

张丽杰, 赵天涛, 全学军, 陆天健

(重庆工学院生物工程学院,重庆 400050)

摘 要:以葛根为原料,液化后采用糖化酶进行糖化,并应用活性干酵母为发酵剂生产葛根保健酒。利用响应曲面法对有交互作用的三个因素糖化酶、 α -淀粉酶和酵母菌进行了优化。研究表明,当糖化酶的量 $164.8\mu\text{g}$ /原料, α -淀粉酶的量 $90.08\mu\text{g}$ 原料,酵母菌为 1.041g ,可得最大酒精度 6.37% ,最大总黄酮溶出量 28.66mg/ml 。

关键词:葛根;响应曲面法;总黄酮

关键词: 葛根; 响应曲面法; 总黄酮

Fermentation Optimization of *Pueraria lobata* Health Wine by Response Surface Methodology

ZHANG Li-jie, ZHAO Tian-tao, QUAN Xue-jun, LU Tian-jian

(College of Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China)

Abstract: The *Pueraria lobata* was used as the raw material, and glucoamylase used for saccharification after the liquefaction, and active dry yeast used as ferment. Using response surface methodology (RSM), by which the interaction between the three factors: glucoamylase, α -amylase and active dry yeast, and their optimum levels were studied. The results showed that the highest alcohol concentration is 6.42% and the highest flavone concentration is 28.69 mg/ml when the fermentation is carried out with glucoamylase concentration of 164.8U/g raw material, α -Amylase concentration of 90.08U/g raw material and active dry yeast concentration of 1.041 g.

Key words *Pueraria lobata* response surface methodology; flavone

中图分类号 TS262.91

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0200-03

葛根富含淀粉、葛根素、大豆黄酮、大豆黄酮甙、葛根素木糖甙、花生酸等多种药效成份。现代医学研究发现葛根素和总黄酮能扩张冠状动脉和脑血管改善心、脑的血液循环,减慢心率、降低心肌的好氧量;葛根素能抑制二磷酸腺苷诱导的血小板凝聚以及凝血酶诱导血小板中五羟色胺的释放,因而对阻止血栓形成和治疗偏心痛很有意义,被现代医学界誉为“人体心、脑、血管微循环系统的调整专家”,并享有“亚洲人参”之美誉^[1-2]。因此,开发葛根的药用、食用价值更为重要^[1]。本实验以葛根粉为原料采用双酶法酿造保健酒,并用响应曲面法对糖化酶、 α -淀粉酶和酵母菌有交互作用的三个因素进行优化设计,主要目的是通过酿造工艺的优化减少酶的用量,降低生产成本,同时使酒的质量稳定,保证酒中总黄酮的含量能够满足人体的保健需求,使此酒具有食用、保健双功效。

1 材料与方法

1.1 材料

安琪牌酒精活性干酵母^[3] 安琪酵母股份有限公司。

酶制剂 糖化酶(50000U/g) 无锡博立生物制品有

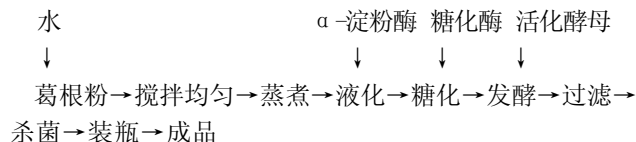
限公司, 实测41000U/g α-淀粉酶(40000U/g) 连云港
港华瑞化工有限责任公司, 实测28000U/g; 野生葛根
重庆。

1.2 仪器与设备

全玻蒸馏器、电炉、紫外分光光度计UV2000、酒精比重计、糖度计、手提式不锈钢灭菌锅、恒温摇床、粉碎机、pH计等。

1.3 方法

1.3.1 葛根保健酒的生产工艺流程



1.3.2 葛根的预处理

葛根洗净晾干后切成一立方厘米的小块，用植物粉碎机粉碎后过 60 目筛，分别得 60 目以上的粉料(以下简称粗料)和 60 目以下的粉料(以下简称细料)。

1.3.3 干酵母的活化

取适量干酵母加入到 2% 的葡萄糖溶液中，放到 35℃

收稿日期: 2007-05-04

作者简介: 张丽杰(1975-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为生物发酵与分离。E-mail: zhljtt@cqit.edu.cn

的摇床上水浴加热 2 h。

1.3.4 加水量的确定

先确定原料的加入量。水量过少,料液粘稠,且糊化阶段易形成疙瘩,不利于液化;水量过大,固形物含量不足,导致发酵后酒度过低,不符合产品要求。本实验选用的料液比为 1:6。水分四次加入,对于本实验中 50 g 原料,糊化阶段加入 35 ml 水,剩下的水分别在液化、糖化和酵母菌接种时加入,总水量为 300 ml。

1.3.5 液化的温度、pH 值和时间的确定

α -淀粉酶在 60℃ 以下较为稳定,最适作用温度 60~70℃;在 70~90℃ 之间,随着温度升高,其反应速度加快,但失活也加快。pH 6.0~7.0 较为稳定;最适作用 pH 6.0~6.5, pH 5.0 以下失活严重。本实验选用温度 60℃、pH 6.0~6.5、液化时间为 28 h。

1.3.6 糖化的温度、pH 值和时间的确定

糖化酶在室温至 65℃ 内起糖化作用,最适温度 58~62℃;超过 65℃ 酶活力失活严重。pH 3.0~5.5 较为稳定;最适作用 pH 4.0~4.5, pH 3.0 以下失活严重。本实验选用温度 60℃、pH 4.0~4.5、糖化时间为 28 h。

1.3.7 接种量及发酵时间的确定

接种量过少,发酵就会不完全,残糖剩余量多,酒精度小;接种量过大,微生物繁殖过快,会在发酵旺盛期产生大量气泡,容易出现逃液和染菌现象,本实验用响应曲面法对接种量进行设计。发酵时间为 7 d、发酵温度为 35℃。

1.3.8 分析测定方法^[4]

酒精体积分数、总黄酮、残糖测定分别采用蒸馏-比重法、紫外分光光度计法^[6]、折光糖度计直接测定法。

2 结果与分析

2.1 葛根粉料的确定

取粗细不同的葛根粉各两份,每份料为 50 g,其中两份不做任何处理为粗生料和细生料,另两份蒸煮,蒸料前加入 35 ml 水,在 0.05 MPa 下蒸 15 min;两份生料各加 35 ml 水浸泡 2 h,使粉料充分溶胀。然后按照上述实验条件和工艺进行发酵,发酵结束后测残糖、酒精度和总黄酮含量,结果如表 1。

由表 1 可以看出,熟料的酒精度远远大于生料,这说明蒸煮工艺有利于发酵,因为葛根中的淀粉经过蒸煮后,原料内部的淀粉膜破裂,内容物流出,变成可溶性淀粉,有利于后序的液化、糖化及酵母菌发酵,所以酒精度高;同时由表 1 还可以看出细料的总黄酮量又高于粗料,细料有利于总黄酮的溶出,因此本实验采用细熟料作为发酵原料。

2.2 糖化酶、 α -淀粉酶及酵母菌的量对发酵的影响及其交互作用

表 1 葛根粉料粗细及蒸煮与否对发酵的影响

Table 1 Effects of diameter of pueraria lobata power and cooking or not on fermentation

指标	粗生料	粗熟料	细生料	细熟料
酒精度(%)	1.4	6.1	1.1	6.0
残糖量(%)	1.1	1.0	2.1	1.5
总黄酮含量(mg/ml)	11.36	13.71	16.83	24.14

实验发现,糖化酶、 α -淀粉酶及酵母菌的量对酒精度的影响存在交互作用。液化程度低,糖化酶的用量少,最终导致可发酵用的葡萄糖含量少,酵母菌利用率低,酒精度小;而液化程度高,也不利于糖化酶生成络合结构^[7],影响催化效率,糖化液最终产葡萄糖含量少,影响发酵。因此利用 Box-Behnken 三因素三水平的响应曲面法进行试验设计^[8],在选定的水平下考察三种物质的相互影响,具体试验设计见表 2。发酵条件为:原料重量 50 g,加水量 300 ml,发酵温度 35℃,发酵时间 7 d。

表 2 Box-Behnken 试验设计因素水平及编码

Table 2 Levels and codes of Box-Behnken experimental design

变量	-1	0	1
糖化酶(X_1) (U/g原料)	120	160	200
淀粉酶(X_2) (U/g原料)	80	110	140
酵母菌(X_3) (g)	0.75	1.00	1.25

2.2.1 不同因素的水平选取

Box-Behnken 的三因素三水平试验的取值见表 3,共需要 15 组试验数据,数据处理使用 SAS 统计软件。表 3 中试验值为实际的反应结果,预计值是数据经 SAS 软件拟合出方程后,计算出的酒精度。

表 3 Box-Behnken 设计试验值及预测值

Table 3 Experimental values and predicted values of Box-Behnken design

试验次数	糖化酶 (U/g原料)	α -淀粉酶 (U/g原料)	酵母 菌(g)	酒精度(%)		总黄酮(mg/ml)
				预计值	试验值	试验值
1	200	140	1	5.04	5.05	19.46
2	200	80	1	5.82	5.66	24.82
3	120	140	1	4.97	5.12	20.88
4	120	80	1	5.43	5.41	21.16
5	200	110	1.25	5.57	5.75	27.49
6	200	110	0.75	5.24	5.17	24.83
7	120	110	1.25	5.14	5.2	24.76
8	120	110	0.75	5.21	5.02	18.50
9	160	140	1.25	5.53	5.31	24.59
10	160	140	0.75	5.43	5.47	23.99
11	160	80	1.25	6.18	6.14	25.42
12	160	80	0.75	6.02	6.23	24.35
13	160	110	1	6.30	6.32	28.21
14	160	110	1	6.30	6.28	27.98
15	160	110	1	6.30	6.30	28.12

表4 酒精度系数值表

Table 4 Regressive coefficient from regression equation of alcohol concentration

参数	INTERCEPT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₁	X ₂ X ₁	X ₂ X ₂	X ₃ X ₁	X ₃ X ₂	X ₃ X ₃
参数估计	-12.600833	0.149333	0.062208	7.511667	-0.000466	-0.000066667	-0.000271	0.01	-0.002333	-4.3

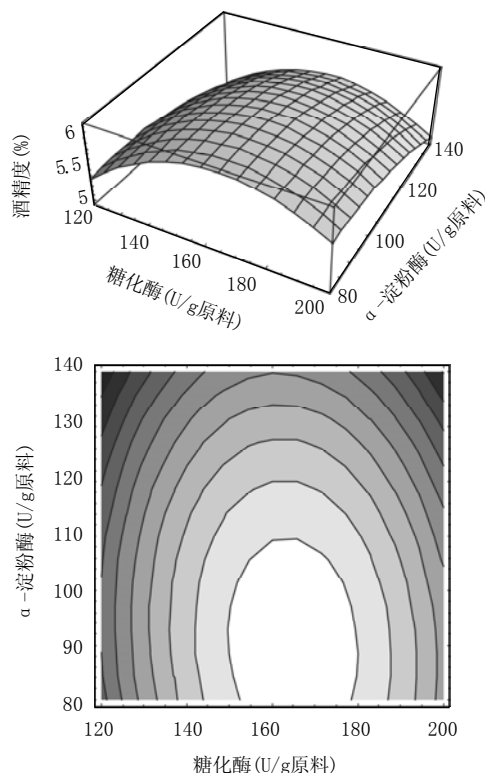


图1 酒精度曲面图及等高线图

Fig.1 Surface layer and contour of alcohol concentration

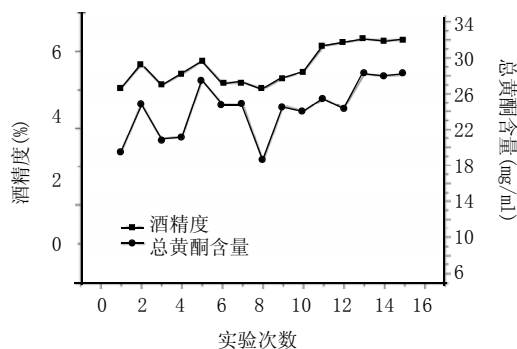


图2 酒精度和总黄酮含量的关系图

Fig.2 Relation between alcohol concentration and flavone concentration

2.2.2 Box-Behnken 试验设计结果与分析

通过 SAS 软件的数据处理, 建立响应曲面回归模型, 并进而寻求最优化响应因子水平。经整理, 所得分析结果如表 4。其中 INTERCEPT 为常数项; X_1 、 X_2 和 X_3 为一次项; X_1X_1 、 X_2X_2 和 X_3X_3 为平方项; X_3X_1 、 X_3X_2 和 X_2X_1 为交叉项。其参数估计值即为每一项的系

数。

由表 4 可知, 拟合的二次回归方程式为:

$$Y = -12.60 + 0.1493X_1 + 6.221 \times 10^{-2}X_2 + 7.512X_3 - 4.66 \times 10^{-4}X_1X_1 - 6.67 \times 10^{-5}X_1X_2 - 2.71 \times 10^{-4}X_2X_2 + 0.01X_1X_3 - 2.333 \times 10^{-3}X_2X_3 - 4.3X_3X_3 \quad (1)$$

方程的相关系数 R_2 为 0.9371, 说明方程的相关性较好。经 SAS 软件分析, 当 $X_1=164.8$; $X_2=90.08$; $X_3=1.041$ 时, 可得到酒精度的最大值 6.42%。图 1 为固定酵母菌量由方程 1 所得的曲面图和等高线图。

根据拟合出的最大值中三个因素的不同取值进行实验, 得出酒精度为 6.37%, 说明拟合的结果是可信的。

2.3 酒精度和总黄酮的关系

考查了相应曲面优化实验中每组实验酒精度和总黄酮含量的变化关系, 从图 2 中可以看出, 总黄酮的变化趋势和酒精度基本上是一致的。与水溶液相比, 黄酮类物质在乙醇中有更高的溶解度, 在发酵的过程中, 较高浓度的乙醇对总黄酮的浸提溶解起到了积极的作用。

3 结 论

3.1 蒸煮工艺对酒精度的提高起决定作用, 而粉料的粗细对总黄酮的浸出含量影响较大。因此采用葛根粉的细熟料为发酵原料。

3.2 通过响应曲面试验, 考察了在糖化酶、 α -淀粉酶和活性干酵母的交互作用下, 酒精发酵的最优值, 即糖化酶的量 164.8U/g 原料, α -淀粉酶的量 90.08U/g 原料和酵母菌 1.041g 时, 可得最大酒精度 6.37%。

3.3 高浓度的乙醇对总黄酮的浸提溶解起到了积极的作用, 在得到最高酒精度的同时可以得到最大总黄酮溶出量 28.66mg/ml。

参考文献:

- [1] 王克明, 王雪筠. 葛根保健酒的研究[J]. 酿酒科技, 1996(1): 55-55.
- [2] CORLEY R N, WOLDEGHEBRIEL A, MURPHY M R. Evaluation of the nutritive value of kudzu (*Pueraria lobata*) as a feed for ruminants[J]. Animal Feed Science and Technology, 1997, 68(1): 183-188.
- [3] 傅金泉, 黄建平. 安琪耐高温活性干酵母在夏酿黄酒生产上的应用[J]. 酿酒科技, 1998(2): 39-40.
- [4] 王卫国, 刘志林. 黄酒高产优质技术初探[J]. 周口师范高等专科学校学报, 2001, 18(2): 41-43.
- [5] 钟秋平, 周文化, 左美雨, 等. 芦荟糯米黄酒的研制[J]. 食品工业, 2003(4): 30-31.
- [6] 王万能, 全学军, 陆天健. 均匀设计超声循环提取豆粕异黄酮的研究[J]. 大豆科学, 2005, 24(1): 75-77.
- [7] 张力田. 淀粉糖 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 144.
- [8] DOUGLAS C, MINTGOMERY. Design and analysis of experiments [M]. 3rd edition, 1991: 591.