

甜高粱秆发酵渣中可溶性糖和乙醇的快速浸提

齐立松¹, 仇磊², 毛月英³, 李佩佩¹, 范桂芳^{1*}, 李十中¹

(1. 清华大学核能与新能源技术研究院, 北京市生物燃料工程技术研究中心, 北京 100084;

2. 中粮营养健康研究院, 北京 102209; 3. 北京农业职业学院基础部, 北京 102442)

摘要: **目的** 建立一种甜高粱秆发酵渣中可溶性糖和乙醇的快速浸提方法。**方法** 考察高速匀浆时间和后续是否超声振荡对甜高粱渣中可溶性糖和乙醇浸提效率的影响; 采用扫描电镜观察甜高粱渣的形态, 从细胞层面解释颗粒尺寸对浸提速度的影响; 对浸提方法进行加标回收验证。**结果** 浸提方法以高速匀浆 3 min 为宜, 在这个条件下, 蔗糖和乙醇在低、中、高 3 个水平的加标回收率在 90.17%~92.80%之间。**结论** 该浸提方法可靠, 操作简单, 浸提时间短, 可用于甜高粱秆发酵渣中可溶性糖和乙醇的快速浸提。

关键词: 甜高粱秆发酵渣; 可溶性糖; 乙醇; 浸提; 匀浆

Rapid solid-liquid extraction of soluble sugars and ethanol from sweet sorghum stalk bagasse

QI Li-Song¹, ZHANG Lei², MAO Yue-Ying³, LI Pei-Pei¹, FAN Gui-Fang^{1*}, LI Shi-Zhong¹

(1. Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing Engineering Research Center of Biofuels, Beijing 100084, China; 2. Nutrition and Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing 102209, China; 3. Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid extraction method of soluble sugar and ethanol from sweet sorghum stalk bagasses. **Methods** The effects of high-speed homogenization time and subsequent ultrasonic on the extraction efficiency were investigated. The morphology of sweet sorghum stalk bagasses was observed by scanning electron microscopy, and the effect of particle size on the extraction efficiency was illustrated in the cellular level. The extraction method was verified by experiment of recovery. **Results** The results showed that the optimum extraction method was high speed homogenization for 3 min. Under this condition, the recoveries of sucrose and ethanol at low, medium and high spiked levels were ranged from 90.17% to 92.80%. **Conclusion** The method is reliable, simple and short in extraction time, which can be used for rapid extraction of soluble sugar and ethanol from sweet sorghum stalk bagasses.

KEY WORDS: sweet sorghum stalk bagasses; soluble sugar; ethanol; solid-liquid extraction; homogenation

1 引言

甜高粱因为耐干旱、耐盐碱、不威胁粮食安全, 是极

具潜力的能源作物^[1,2]。Wang 等^[3]对固体发酵和液体发酵的经济分析表明固体发酵有更高的净现值。为了检测固体发酵物料中可溶性糖和乙醇的含量, 判断发酵进程, 需要

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFE0108500)、国家自然科学基金项目(31600067)

Fund: Supported by National Key R&D Program of China (2016YFE0108500) and National Natural Science Foundation of China (31600067)

*通讯作者: 范桂芳, 工程师, 主要研究方向为生物质发酵过程分析。E-mail: fanguifang@mail.tsinghua.edu.cn

*Corresponding author: FAN Gui-Fang, Engineer, Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China. E-mail: fanguifang@mail.tsinghua.edu.cn

先将物料中的可溶性物质转移到液相。固液萃取速率受溶质从胞内到胞外的传输速率以及胞外溶质扩散速率的影响。胞内到胞外的传输主要是顺浓度梯度的被动转运^[4], 珠磨法、渗透冲击法、微波、超声波和高速匀浆等能不同程度上破坏植物细胞, 从而使胞内物质释放出来^[5-7]。

国家标准 GB/T 10499-2014^[8]规定蔗渣的糖分提取方法为蒸煮 90 min。GB/T 10496-2002^[9]规定甜菜的糖分提取方法是先用锯糊机将甜菜细胞全部破碎, 然后匀浆 3 min。范桂芳等^[10]对糖料作物中可溶性糖的固液萃取条件进行了综述, 萃取过程中温度、搅拌速度、渗透压、固液比和颗粒尺寸均影响糖传质, 微波和超声波可以促进细胞破碎和有效成分转移, 微波辅助使蔗渣糖提取时间缩短至 15 min。不同物料萃取时间差异很大, 可能是因为物料的颗粒尺寸与预处理对细胞的破坏程度不同。在细胞的观察方面, Zhang 等^[11]利用荧光成像显示了微波辅助对烟叶细胞的破坏作用, 微波辅助法将烟叶和茶叶中的单糖提取时间缩短至 17 min。章莹颖等^[12]利用扫描电镜考察了酸热法、超声法、反复冻融法、高速匀浆法和生物法对微藻细胞的破碎度, 结果表明同一种处理方法对不同的微藻细胞破碎作用有差异, 不同处理方法对同一种细胞破碎作用也有差异。

多篇文献报道了甜高粱渣中糖的提取与检测^[13-19]。Crepeau 等^[13]和 Aragon 等^[14]采用压榨的方法获取含糖汁液。Mao 等^[15]、Jia 等^[16]和丛靖宇等^[17]考察了多种因素如液固比、颗粒尺寸、浸提温度等对糖浸出率的影响。Saied 等^[18]将材料干燥, 并粉碎至 1 mm 以下, 采用的浸提条件为温度 80 °C、液固比 20:1 和提取时间 20 min。截至目前最快的方法由 Gaines 等^[19]报道, 即: 高速匀浆 2 min 后 80 °C 提取 10 min, 但是该文没有对提取方法进行加标回收率考察。本文考察高速匀浆时间以及后续是否超声对甜高粱秆发酵渣中可溶性糖和乙醇的萃取效率的影响, 并采用加标回收实验对浸提方法进行评价, 以期建立一种甜高粱秆发酵渣中可溶性糖和乙醇的快速浸提方法, 实现对固体发酵工艺的良好控制。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪(配示差折光检测器, 岛津化学工作站); Legend Mach1. 6R 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); WBL25B26 匀浆机(美的集团); KQ2200E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SU1510 型扫描电镜(日本日立公司)。

果糖(纯度 99.0%)、葡萄糖(纯度 99.5%)、蔗糖(纯度 99.5%)、乙醇(纯度 99.8%)(美国 Sigma 公司)。

色谱条件: 色谱柱: Bio-Rad Aminex HPX-87P(300 mm × 7.8 mm, 9 μm); 流动相: 超纯水; 流速: 0.5 mL/min; 柱温:

60 °C; 检测器: 示差折光检测器; 进样量: 20 μL; 采用外标法定量。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

用超纯水配制了葡萄糖、果糖、蔗糖和乙醇的混合标准溶液, 标准溶液的浓度水平为 0.2000、0.4000、0.8000、1.0000、1.5000、2.0000 g/L。

2.2.2 甜高粱秆发酵渣中可溶性糖和乙醇的提取与检测

准确称取甜高粱秆发酵渣 30.00 g 置于匀浆粉碎机中, 加入 300.0 g 蒸馏水, 匀浆浸提 3 min, 取 2.0 mL 溶液用转速 10000 r/min 离心 5 min, 上清液稀释 6 倍后进高效液相色谱检测。以蔗糖为例阐明物料中分析物质量分数与液相色谱检测浓度的关系, 见式(1)。因为一分子蔗糖分解能得到一分子葡萄糖和一分子果糖, 所以计算总可溶性糖质量分数时将蔗糖按分解后的分子量计算, 总可溶性糖的质量分数计算方法见式(2)。

$$\omega_{\text{蔗糖}} = \frac{C_{\text{蔗糖}} \times (V_{\text{水}} + m_{\text{秆}} \times \omega_{\text{水}} \div d_{\text{水}}) \times \text{稀释倍数} \times 10^{-3}}{m_{\text{秆}}} \times 100\% \quad (1)$$

$\omega_{\text{蔗糖}}$: 蔗糖的质量分数, %; $C_{\text{蔗糖}}$: 液相色谱检测得到的蔗糖浓度, g/L; $V_{\text{水}}$: 水的体积, mL; $\omega_{\text{水}}$: 甜高粱渣中水的质量分数, 按 75% 计算; $d_{\text{水}}$: 水的密度, 采用 1.000 g/mL; $m_{\text{秆}}$: 甜高粱秆发酵渣的质量, g。

$$\omega_{\text{总可溶性糖}} = \omega_{\text{蔗糖}} \times \frac{360}{324} + \omega_{\text{葡萄糖}} + \omega_{\text{果糖}} \quad (2)$$

2.2.3 不同匀浆时间对提取效率的影响

按 2.2.2 所述步骤, 匀浆粉碎时间分别为 1、2、3、4 min, 每一匀浆粉碎时间重复检测 3 次。

2.2.4 匀浆后超声对提取效率的影响

按 2.2.2 所述步骤, 匀浆时间采用 3 min, 然后超声波振荡 5 min, 再离心检测。以 1 组样品不超声为对照组, 超声和不超声的实验各重复 6 次。

2.2.5 发酵过程中样品的检测

取发酵前期、发酵中期和发酵后期 3 组样品, 每组样品重复测量 6 次。

2.2.6 匀浆粉碎过程加标回收率实验

准确称取蒸馏后的甜高粱秆发酵渣 30.00 g 置于匀浆粉碎机中, 按照实际样品的低、中和高水平添加蔗糖和乙醇, 蔗糖添加量为质量分数 1.600%、8.000% 和 14.40% 添加, 乙醇添加量为质量分数 0.800%、4.000% 和 7.200% 添加, 再加入 300.0 g 蒸馏水, 后续操作按 2.2.2 步骤进行。计算平均回收率, 每一加标水平重复测定 6 次。

2.2.7 扫描电镜测试样品制备

将样品依次浸泡在浓度 25%、50%、75% 和 100% 的乙醇溶液里, 施行梯度脱除样品中的水分, 样品在每个浓度梯度溶液内浸泡 30 min, 其中样品在 100% 浓度的乙醇

溶液进行两次浸泡操作。倒出乙醇, 取出样品并放置在 40 °C 普通烘箱内过夜干燥。

3 结果与分析

3.1 液相色谱标准曲线与检出限

以峰面积 X 对质量浓度 $Y(\text{g/L})$ 进行线性回归, 各分析物的回归方程、线性范围、线性相关系数见表 1。由表 1 可知, 标准曲线过原点, 标准曲线的相关系数在 0.99988~0.99992 之间。对标准溶液进行稀释, 取信噪为 3 处分析物浓度为仪器检出限; 实际样品重复检测 6 次, 取标准偏差的 3 倍为方法检出限, 仪器检出限为 1.1~3.3 mg/L, 方法检出限为 0.12%~0.63%。

3.2 不同匀浆浸提时间对固液萃取效率的影响

表 2 显示了高速匀浆时间为 1.0、2.0、3.0、4.0 min 时检测到的总可溶性糖的质量分数, 分别为 17.32%、17.56%、17.76%和 17.73%。匀浆 4 min 时, 总可溶性糖的质量分数比匀浆 3 min 时略小, 差异小于测量标准偏差, 认为 3 min 时糖浸出质量分数已经稳定, 采用匀浆时间 3 min 作为后续实验条件。Mao 等^[15]采用切块的方式制备了不同尺寸的甜高粱秆材料, 并研究了糖的传质。结果表

明, 当颗粒尺寸由 16 mm 逐渐降至 2 mm 时, 葡萄糖平衡时间从 900 min 降至 200 min。丛靖宇等^[17]研究表明颗粒尺寸大于 2 mm 时, 颗粒尺寸对糖传质的影响显著, 当颗粒是粉末状时, 温度 50~90 °C、提取时间 20~60 min、料液比 1:10~1:30 对总可溶性糖分提取率的影响不显著。粉碎后的甜高粱秆渣包含粉末状和丝状 2 种形态, 其 SEM 图分别见图 1 和图 2, 粉末状对应于甜高粱秆中的薄壁细胞, 细胞尺寸为 30~40 μm , 颗粒直径约 800 μm ; 丝状物料来自皮部或维管束, 主要成分是纤维, 颗粒直径约为 100 μm , 对应 1 个维管束的尺寸, 长度为 10~15 mm。粉状和丝状粉粹料的糖平衡时间为 3 min, 比颗粒为 2 mm 时大幅缩短, 推测此状态下, 大部分植物细胞已破坏或在匀浆搅拌作用下破坏, 固液萃取速度受溶质在溶液中的扩散速度控制。

3.3 高速匀浆后超声预处理对浸提效率的影响

按 2.2.4 所述步骤进行实验, 超声与未超声条件下测得甜高粱秆渣的质量分数见表 3, 未超声和超声时总可溶性糖的质量分数分别为 12.55%和 12.65%, 这个差异小于检测时的标准偏差, 可以认为后续超声对糖提取率没有显著影响, 进一步说明该尺寸甜高粱渣在高速匀浆作用下细胞已经破碎。

表 1 分析物的保留时间、线性关系和检出限
Table 1 Retention time, linear relationship and limit of detection of analyte

分析物	保留时间/min	回归方程	线性范围/(g/L)	相关系数	仪器检出限/(mg/L)	方法检出限/%
蔗糖	12.241	$Y=2.4483\times10^{-6}X$	0.2000~2.0000	0.99992	1.1	0.63
葡萄糖	14.821	$Y=2.5459\times10^{-6}X$	0.2000~2.0000	0.99991	1.2	0.12
乙醇	20.172	$Y=6.4201\times10^{-6}X$	0.2000~2.0000	0.99992	3.3	0.24
果糖	22.076	$Y=2.6764\times10^{-6}X$	0.2000~2.0000	0.99988	1.2	0.12

表 2 不同高速搅拌时间下化合物的质量分数($n=3$, %)
Table 2 Mass fraction of the compound at different mixing speeds ($n=3$, %)

化合物	1.0 min 质量分数		2.0 min 质量分数		3.0 min 质量分数		4.0 min 质量分数	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
总可溶性糖	17.32	0.18	17.56	0.06	17.76	0.06	17.73	0.07

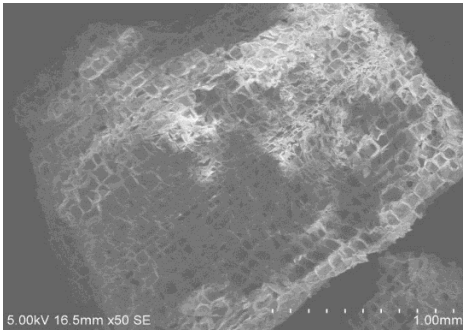


图 1 粉状物料 SEM 图(放大倍数: 50×)
Fig.1 SEM diagram of powdery material (magnification: 50×)

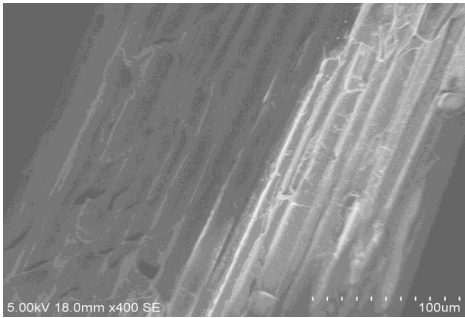


图 2 丝状物料 SEM 图(放大倍数: 400×)
Fig.2 SEM diagram of filamentous material (magnification: 400×)

表 3 超声与未超声条件下分析物的质量分数($n=6$, %)
Table 3 Mass fraction of analytes under ultrasonic and non-ultrasonic conditions ($n=6$, %)

化合物	未超声时质量分数		超声时质量分数	
	平均值	标准偏差	平均值	标准偏差
总可溶性糖	12.55	0.22	12.65	0.19

3.4 样品的检测以及加标回收率

按 2.2.5 所述步骤进行实验, 表 4 显示了发酵前期、发酵中期和发酵后期总可溶性糖和乙醇的质量分数平均值

表 4 发酵前期、中期、后期的样品质量分数($n=6$, %)
Table 4 Mass fraction of samples before, during and after fermentation ($n=6$, %)

化合物	发酵前质量分数			发酵中质量分数			发酵后质量分数		
	平均值	标准偏差	RSD	平均值	标准偏差	RSD	平均值	标准偏差	RSD
总可溶性糖	12.73	0.17	1.4	10.53	0.29	2.77	—	—	—
乙醇	—	—	—	0.66	0.04	4.7	5.89	0.08	1.3

注: “—”表示未检出。

表 5 浸提过程中蔗糖和乙醇的加标回收实验($n=6$, %)
Table 5 Spiked recovery of sucrose and ethanol during extraction ($n=6$, %)

化合物	质量分数				
	初始值	加标水平	检出值	回收率	RSD
蔗糖	0.065	1.600	1.550	92.80	1.14
		8.000	7.362	91.21	0.37
		14.40	13.049	90.17	0.24
		0.800	2.914	91.94	1.79
乙醇	2.178	4.000	5.858	92.01	0.59
		7.200	8.710	90.73	0.54

4 结 论

本文考察了高速匀浆时间和后续是否超声振荡对甜高粱秆渣中可溶性糖和乙醇浸提效率的影响, 确定浸提方法为高速匀浆 3 min。在该条件下, 蔗糖和乙醇在低、中、高 3 个水平的加标回收率在 90.17%~92.80%之间, 在可接受的范围内。该浸提方法可靠, 浸提时间短。采用扫描电镜观察了甜高粱渣的形态, 从细胞层面解释了颗粒尺寸对浸提速度的影响。

参考文献

[1] Dar RA, Dar EA, Kaur A, *et al.* Sweet sorghum-a promising alternative feedstock for biofuel production[J]. *Renew Sust Energ Rev*, 2018, 82: 4070–4090.

和标准偏差。随着发酵进行, 物料中总可溶性糖的质量分数从 12.73%降至不能检出, 乙醇的质量分数从不能检出升至 5.89%。6 次浸提操作下, 总可溶性糖和乙醇的检测相对标准偏差(relative standard derivation, RSD)小于 5.0%。按 2.2.6 所述步骤进行加标回收实验。表 5 显示了蒸馏后的甜高粱秆发酵渣在不同蔗糖和乙醇加标水平下的平均回收率和 RSD。由表中数据可知, 低、中和高 3 个水平的加标回收率在 90.17%~92.80%之间, 在可接受的范围内, 比 100%略低, 可能是忽略了溶质引起的体积效应等原因引起。RSD 在 0.24%~1.79%之间。样品检测和加标回收实验均表明该浸提和检测方法可靠。

[2] Li SZ, Li GM, Zhang L, *et al.* A demonstration study of ethanol production from sweet sorghum stems with advanced solid state fermentation technology [J]. *Appl Energy*, 2013, 102: 260–265.

[3] Wang F, Liu CZ. Development of an economic refining strategy of sweet sorghum in the inner Mongolia region of China [J]. *Energ Fuels*, 2009, 23(8): 4137–4142.

[4] 张继澍. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.

Zhang JS. *Plant physiology* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006.

[5] 田瑞华. 生物分离工程[M]. 北京: 科学出版社, 2008.

Tian RH. *Bioseparation engineering* [M]. Beijing: Science Press, 2008.

[6] 欧阳平凯, 胡永红, 姚忠. 生物分离原理及技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010.

Ouyang PK, Hu YH, Yao Z. *Bioseparation principle and technology* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010.

[7] 谭天伟. 生物分离技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.

Tan TW. *Bioseparation technology* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.

[8] GB/T 10499-2014 糖料甘蔗试验方法[S].

GB/T 10499-2014 Test methods of sugarcane [S].

[9] GB/T 10496-2002 糖料甜菜[S].

GB/T 10496-2002 Sugar beet [S].

[10] 范桂芳, 李佩佩, 齐立松, 等. 固体发酵物料可溶性糖和乙醇检测方法研究进展[J]. *生物产业技术*, 2018, 3: 50–54.

Fan GF, Li PP, Qi LS, *et al.* Progress on soluble sugars and ethanol determination in solid state fermentation material [J]. *Biotechnol Business*, 2018, 3: 50–54.

[11] Zhang Y, Li HF, Ma Y, *et al.* Microwave assisted extraction-solid phase extraction for high-efficient and rapid analysis of monosaccharides in plants [J]. *Talanta*, 2014, 129: 404–410.

[12] 章莹颖, 邓春芳, 崔岩, 等. 不同方法对微藻细胞破碎及油脂提取效果

- 的影响[J]. 中国油脂, 2016, 41(3): 61–65.
- Zhang YY, Deng CF, Cui Y, *et al.* Effect of different methods on cell disruption and oil extraction of microalgae [J]. China Oils Fats, 2016, 41(3): 61–65.
- [13] Crepeau M, Khelifi M, Vanasse A, *et al.* Extraction of the sugary juice from sweet pearl millet and sweet sorghum using a hydraulic press and a four-roller press [J]. Trans ASABE, 2016, 59(5): 1127–1135.
- [14] Aragon D, Viator HP, Ehrenhauser FS. Assessment of sugarcane billet harvester on recovery of sweet sorghum biomass for ethanol production [J]. Bio Energ Res, 2017, 10(3): 783–791.
- [15] Mao YY, Li JH, Li SZ, *et al.* The mass transfer of sugar in sweet sorghum stalks for solid-state fermentation process [J]. Fuel, 2015, 144: 90–95.
- [16] Jia F, Chawhuaymak J, Riley MR, *et al.* Efficient extraction method to collect sugar from sweet sorghum [J]. J Biol Eng, 2013, 7(1): 1.
- [17] 丛靖宇, 刘伟, 张新, 等. 利用高效液相色谱法检定甜高粱茎秆糖分的方法研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2013, 34(4): 80–85.
- Cong JY, Liu W, Zhang X. Study on extracting sugar of sweet sorghum stalk with HPLC [J]. J Inner Mongolia Agric Univ, 2013, 34(4): 80–85.
- [18] Saied N, Khelifi M, Aider M, *et al.* Water-soluble carbohydrate extraction from sweet pearl millet and sweet sorghum biomass as affected by bagasse impregnation [J]. Trans ASABE, 2017, 60(2): 253–261.
- [19] Gaines TP, Gascho GJ. Automated-determination of total sugars in sugar crops grown for energy [J]. J Sci Food Agric, 1985, 36(3): 157–161.

(责任编辑: 武英华)

作者简介

齐立松, 硕士, 助理工程师。主要研究方向为生物质能源。

E-mail: qilisong1986@163.com

范桂芳, 工程师, 主要研究方向为生物质发酵过程分析。

E-mail: fanguifang@mail.tsinghua.edu.cn