

苏东海,魏玉西,陈应运,等. 复合菌发酵海藻渣降解甲醛残留工艺研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):495-497.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.138

复合菌发酵海藻渣降解甲醛残留工艺研究

苏东海,魏玉西,陈应运,陈婷婷

(青岛大学生命科学学院,山东青岛 266071)

摘要:以海藻渣为研究对象,使用自制复合菌剂进行发酵,以甲醛含量作为主要评价指标,在单因素试验基础上,采用正交试验优化发酵工艺条件。结果表明,复合菌剂发酵海藻渣最佳工艺条件为培养基组成为海藻渣 100 g、麸皮 20 g、豆粕 25 g,发酵温度为 45 ℃,发酵时间为 10 d,复合菌剂接菌量为 5%,海藻渣采用优化工艺经复合菌发酵后甲醛含量可由 367.88 mg/kg 降至 57.14 mg/kg。

关键词:海藻渣;复合菌;发酵;甲醛

中图分类号: S188⁺.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0495-03

我国海藻养殖量居世界首位。海藻工业产值在海洋经济中占有重要地位。海藻营养丰富,具有药用、食用等多种用途^[1]。海藻渣是褐藻(海带、巨藻等)经过一系列工序提取海藻胶、碘、甘露醇等产品后所剩余的废弃物^[2]。研究发现,海藻渣内仍有大量的营养物质(如蛋白质)和粗纤维,且其蛋白质组成中精氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸含量较高,因而有可能成为食品原料或动物饲料的组成成分^[3]。尽管如此,由于海藻加工过程中浸泡工序使用甲醛作为固色剂^[4],致使海藻因甲醛残留高,加之海藻渣粗纤维含量高达 35% 以上,海藻渣不宜直接用于动物饲料。目前,我国海藻加工企业将大部分海藻渣经简单沤制后用作肥料,对农作物具有一定的营养、抗病、增产的功效^[5-6]。但是,现有海藻渣的利用效率不高,亟待进行高值化利用研究。

利用微生物发酵,改善食物的口感、风味,甚至生产出高值化功能性产品,已经深入人类生活的诸多方面^[7-12]。微生物发酵饲料早在 20 世纪 90 年代就在我国被广泛应用,分别经历了糖化饲料、酵母饲料以及如今的微生物发酵饲料发展阶段^[13]。由于海藻渣组成的特殊性,将其作为饲料的研究备受关注。韩玲证实了海藻粉作为饲料添加剂的可行性^[14]。然而,采用海藻渣作为饲料添加剂,尚面临海藻生产过程中因使用甲醛造成的蛋白质结构改变(交联)问题,从而影响其作为动物饲料蛋白质的吸收利用。本研究利用自制复合菌剂,以甲醛含量为评价指标,对海藻渣发酵工艺进行探索,以期将为海藻渣作为动物饲料添加剂利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

海藻渣、麸皮、红糖、豆粕均为市售。复合菌剂由青岛大

学生命科学学院自制。甲醛标准溶液从中国计量科学研究院购置。

1.2 仪器与设备

电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司];电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);721G 型可见分光光度计(上海精密仪器有限公司);101-3A 型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 原料处理 海藻渣为烘干的颗粒状固体,过 20 目筛,放置阴凉干燥处备用。

自制复合菌剂配制:将无菌水、红糖、菌粉按质量比 15:1:0.1 比例配制,30~40 ℃ 活化 5~7 d 后,经 pH 试纸测试显酸性则为活化成功,密封备用。

1.3.2 复合菌剂发酵海藻渣的工艺 参照文献[15-16]中复合菌剂发酵海藻渣的工艺,并加以改进。取 100 g 海藻渣,分别添加一定量的麸皮、豆粕作为碳源、氮源,混匀后加入稀释后的菌液,添加量以握手成团,松开即散的程度为准。在一定温度下厌氧培养、固态发酵,直至发酵品发出浓郁酒曲香味为发酵终点。

1.3.3 甲醛含量测定 采用乙酰丙酮分光光度法对甲醛含量进行检测^[17-18]。

乙酰丙酮溶液制备:将乙酸铵 25 g、冰乙酸 3 mL、乙酰丙酮溶液 0.25 mL 试剂定容至 100 mL 水中。

标准曲线制作:配制 10.4 μg/mL 甲醛标准溶液,分别吸取 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 甲醛标准溶液,加入到 25 mL 具塞比色管中,加水至 10 mL,分别加入 2 mL 乙酰丙酮溶液,混匀后于 100 ℃ 水浴中加热 15 min。取出冷却后,于波长 412 nm 处测定吸光度。每个处理重复 3 次。以甲醛浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,得出回归方程。

样品处理:称取样品 15 g,用 100 mL 50 ℃ 蒸馏水洗入 250 mL 容量瓶中,加入 10 mL 冰醋酸,85 ℃ 水浴 1 h,取出冷却至室温,加入亚铁氰化钾溶液 2.5 mL、乙酸锌溶液 2.5 mL 以除去蛋白质,以蒸馏水定容,摇匀静置,去除上层脂肪。经过滤,舍弃 30 mL 初滤液,再过滤得待测滤液。

显色反应:取样品滤液 2 mL 于比色管中,定容至 10 mL,

收稿日期:2016-03-16

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2012DM014)。

作者简介:苏东海(1989—),男,福建泉州人,硕士研究生,主要从事微生物发酵技术研究。E-mail:sudonghai@qq.com。

通信作者:魏玉西,教授,主要从事海洋生物资源高值化利用研究。

E-mail:yuxiw729@163.com。

加入乙酰丙酮溶液 2 mL 于 100 ℃ 水浴中反应 15 min,取出冷却,于波长 412 nm 处测吸光度,根据标准曲线计算甲醛含量:样品中甲醛含量(mg/kg) = 标准曲线算得甲醛含量(μg/mL) × 125/15。

1.3.4 复合菌剂发酵海藻渣的单因素试验 以乙酰丙酮法测定发酵样品甲醛含量,以此评价发酵效果并确定单因素数值范围。

1.3.4.1 麸皮添加量的选择 取海藻渣 100 g,分别添加 5、10、15、20、25 g 麸皮,20 g 豆粕,接入质量分数 3% 的菌液,调节湿度后放入 37 ℃ 恒温培养箱发酵 6 d。

1.3.4.2 豆粕添加量的选择 取海藻渣 100 g,添加 20 g 麸皮,分别添加 10、15、20、25、30 g 豆粕,接入质量分数 3% 的菌液,调节湿度后放入 37 ℃ 恒温培养箱发酵 6 d。

1.3.4.3 接种量的选择 取海藻渣 100 g,添加 20 g 麸皮,25 g 豆粕,分别接入质量分数 1、2、3、4、5、6% 的菌液,调节湿度后放入 37 ℃ 恒温培养箱发酵 6 d。

1.3.4.4 发酵温度的选择 取海藻渣 100 g,添加 20 g 麸皮,25 g 豆粕,接入质量分数 5% 的菌液,调节湿度后分别放入 29、33、37、41、45 ℃ 恒温培养箱发酵 6 d。

1.3.4.5 发酵时间的选择 取海藻渣 100 g,添加 20 g 麸皮,25 g 豆粕,接入质量分数 5% 的菌液,调节湿度后放入 41 ℃ 恒温培养箱分别发酵 4、6、8、10、12 d。

1.3.5 正交试验方案设计 根据单因素试验结果,在复合菌接种量为 5% 条件下,选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表,综合考察麸皮添加量、豆粕添加量、发酵温度、时间对复合菌剂发酵海藻渣的影响。正交试验因素与水平见表 1。

水平	因素			
	A:麸皮添加量(%)	B:豆粕添加量(%)	C:发酵温度(℃)	D:发酵时间(d)
1	10	15	37	8
2	15	20	41	10
3	20	25	45	12

1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS 19.0 软件分析。

2 结果与分析

2.1 海藻渣中甲醛含量的测定结果

按照“1.3.3”节中的方法制作甲醛标准曲线,得出回归方程: $y = 0.021x + 0.006 (r^2 = 0.9993)$ 。测得原海藻渣中甲醛含量为 367.875 mg/kg。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 麸皮添加量对甲醛含量的影响 由图 1 可知,在一定范围内,海藻渣发酵品发酵前后甲醛含量的差值随麸皮添加量增加而增加,当麸皮添加量为 15% 时,经复合菌发酵的海藻渣中甲醛含量下降最多,随后下降量减少。这可能是因为麸皮添加量过多时,复合菌过多地利用麸皮,而减少了对海藻渣的降解。

2.2.2 豆粕添加量对甲醛含量的影响 由图 2 可知,在一定范围内,海藻渣发酵品发酵前后甲醛含量差值随豆粕添加量增加而增加,当豆粕添加量为 20% 时,经复合菌发酵的海藻

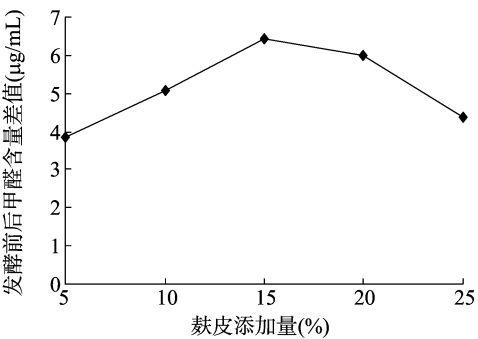


图1 麸皮添加量对甲醛含量的影响

渣中甲醛含量下降最多,随后下降量减少。这可能是因为豆粕添加量过多时,复合菌更多地分解豆粕,减少了对海藻渣的降解。

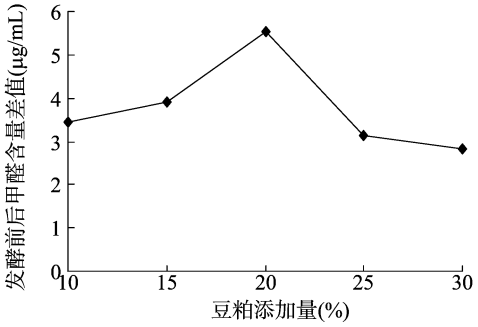


图2 豆粕添加量对甲醛含量的影响

2.2.3 复合菌剂接种量对甲醛含量的影响 由图 3 可知,海藻渣发酵品甲醛含量随着复合菌剂接种量的增加而逐渐降低,当复合菌剂接种量超过 5% 后,发酵品中甲醛含量不再有明显降低,这可能是因为复合菌剂达到了最大发酵接种量。

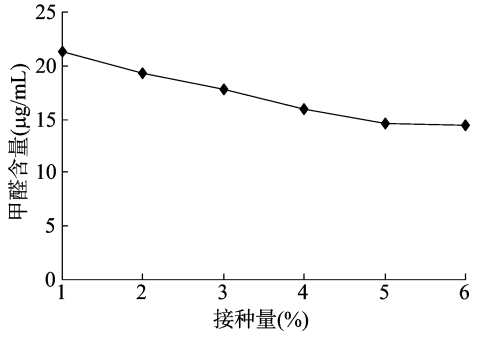


图3 接种量对甲醛含量的影响

2.2.4 发酵温度对甲醛含量的影响 由图 4 可知,在一定范围内,海藻渣发酵品甲醛含量随发酵温度的升高而降低,当发酵温度达 41 ℃ 时,发酵品中甲醛含量最低;当发酵温度继续升高,发酵品中甲醛含量随之增多。说明 41 ℃ 为复合菌降解甲醛的最佳温度,这可能是因为温度过高抑制了复合菌生长及分解作用,不利于海藻渣降解。

2.2.5 发酵时间对甲醛含量的影响 由图 5 可知,海藻渣发酵品中甲醛含量随发酵时间延长而降低,当发酵时间超过 10 d 时,发酵品中甲醛含量随发酵时间延长不再明显降低,这可能因为发酵产物抑制了复合菌生长,降低了其分解海藻渣的能力。

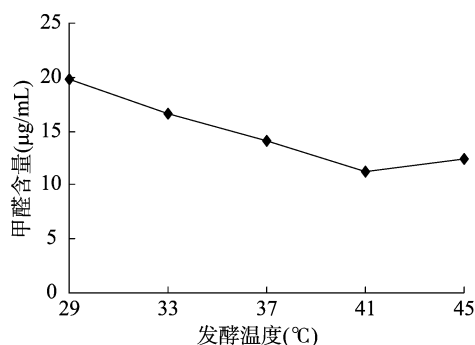


图4 发酵温度对甲醛含量的影响

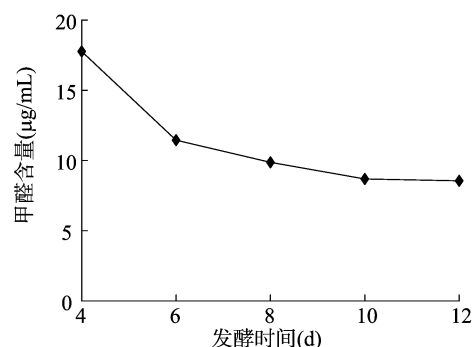


图5 发酵时间对甲醛含量的影响

2.3 正交试验结果

由表2中的极差(R)值可知,各因素对甲醛含量影响的大小顺序依次为发酵温度>发酵时间>豆粕添加量>麸皮添加量。通过分析 k_1 、 k_2 、 k_3 可知,最优工艺组合为 $A_3B_3C_3D_2$,在该条件下,发酵的海藻渣样品,甲醛含量由未经发酵的367.88 mg/kg降至发酵后的57.14 mg/kg,该结果均小于9组正交试验结果,证明该工艺所得最优组合的可靠性。

表2 复合菌剂发酵海藻渣工艺正交试验结果

处理	A:麸皮添加量	B:豆粕添加量	C:发酵温度	D:发酵时间	甲醛含量(mg/kg)
1	1	1	1	1	110.30
2	1	2	2	2	71.03
3	1	3	3	3	59.52
4	2	1	2	3	74.60
5	2	2	3	1	73.81
6	2	3	1	2	80.56
7	3	1	3	2	60.32
8	3	2	1	3	81.35
9	3	3	2	1	82.14
k_1	80.283	81.740	90.737	88.750	
k_2	76.323	75.397	75.923	70.637	
k_3	74.603	74.073	64.550	71.823	
R	5.680	7.667	26.187	18.113	

3 结论与讨论

以海藻加工废渣为原料,辅以麸皮、豆粕为碳源、氮源,以

复合菌为发酵菌剂进行发酵,开展单因素试验及正交试验。结果表明:在海藻渣中添加20%麸皮和25%豆粕,在45℃下发酵10 d,发酵产物中甲醛含量最低,甲醛含量可由367.88 mg/kg降至57.14 mg/kg。

本研究通过复合菌发酵海藻渣,降解其生产加工过程中变性的纤维素及蛋白质,释放并利用海藻加工时大量残留的甲醛,该工艺方法具有可行性。本研究为海藻渣应用于牲畜、鱼类饲料或其他高值化应用奠定了基础。

参考文献:

- [1]王文亮,王守经,宋康,等.海带的功能及其开发利用研究[J].中国食物与营养,2008,14(8):26-27.
- [2]米玲菲.海带胶提纯及纯化技术研究[D].福州:福建农林大学,2011.
- [3]甘纯玢,谢苗.褐藻渣的开发利用[J].中国食物与营养,2001,7(3):18-19.
- [4]张俊杰,段蕊,许可,等.海带工业中海藻渣应用的研究及展望[J].水产科学,2010,29(10):620-623.
- [5]肖伟,闫培生.海带渣菌肥作为土壤添加剂对土壤抑制病原真菌活性影响的研究[J].植物营养与肥料学报,2014,20(3):778-782.
- [6]青岛明月海藻集团有限公司.一种海藻有机肥的制备方法:中国,01439997.2[P].2009-05-27.
- [7]马文强,冯杰,刘欣.微生物发酵豆粕营养特性研究[J].中国粮油学报,2008,23(1):121-124.
- [8]李响,刘畅,吴非.微生物发酵法制备大豆ACE抑制肽菌种的筛选[J].食品科学,2013,34(1):185-188.
- [9]樊利青.微生物发酵制取功能食品的研究现状[J].食品科学,2000,21(12):182-184.
- [10]明红梅,陈蒙恩,周健,等.啤酒酿造新工艺[J].江苏农业科学,2015,43(8):260-264.
- [11]张宏志,马艳弘,李亚辉,等.乳酸菌发酵菊芋马齿苋复合饮料及其抑菌活性[J].江苏农业科学,2015,43(11):362-365.
- [12]刘俊红,杨红霞,李子健,等.嗜鞣管囊酵母发酵条件对纤维素制备乙醇的影响[J].江苏农业科学,2015,43(8):384-385,413.
- [13]陆熹,李霞,仲小兰,等.微生物发酵在我国饲料工业中的应用及发展探讨[J].现代农业科技,2008,37(1):156-157,162.
- [14]韩玲.海藻发酵饲料的制备工艺及优化研究[D].上海:上海理工大学,2012.
- [15]孙林,李吕木,张邦辉,等.多菌种固态发酵菜籽粕的研究[J].中国粮油学报,2009,24(1):85-89.
- [16]俞志敏,吴克,金杰,等.农用废弃物固态发酵生产衣康酸工艺研究[J].食品与发酵工业,2009,35(1):99-102.
- [17]赖海涛,苏国成,林加富.乙酰丙酮分光光度法测定啤酒中甲醛含量[J].酿酒科技,2012,32(6):102-105.
- [18]刘细祥,兰翠玲.乙酰丙酮法测定水发食品中甲醛含量的研究[J].广州化工,2011,39(23):92-94.