

# 浒苔发酵工艺优化及青蛤喂养效果评价

夏青<sup>1,2</sup>, 孙泽鹏<sup>1,2</sup>, 柳梅梅<sup>1,2</sup>, 廖晓婷<sup>1,2</sup>, 董志国<sup>1,2,3</sup>

(1. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与生态环境重点实验, 江苏 连云港 222006; 2. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222006; 3. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏 连云港 222006)

**摘要:** 本试验以自然海区打捞上岸的浒苔(*Enteromorpha prolifera*)为原料, 以植物乳酸杆菌为发酵菌种, 发酵浒苔喂养青蛤(*Cyclina sinensis*)的特定生长率为响应值, 确定浒苔发酵的最佳工艺。在单因素试验的基础上, 以发酵时间、发酵温度、料液比为响应因素, 以青蛤特定生长率为响应值, 利用 Box-Behnken 中心组合方法进行三因素三水平试验设计, 进行响应面分析。结果表明: 影响浒苔发酵工艺的因素主次顺序为发酵温度、料液比和发酵时间, 最佳发酵工艺条件为: 发酵温度 35 °C, 料液比 (1:1.5) g·mL<sup>-1</sup>, 发酵时间 84 h。通过测定发酵前后浒苔的常规营养成分, 发现浒苔发酵产物的粗蛋白含量显著高于未发酵浒苔( $P<0.05$ ); 使用工艺优化后的浒苔发酵产物所喂养的青蛤与投喂小球藻的青蛤在特定生长率与存活率方面无显著差异。本试验证明优化后的浒苔发酵工艺具有可靠性, 其发酵产物具备成为青蛤养殖饲料的条件, 为浒苔发酵饲料的开发利用提供理论依据的同时, 也为贝类配合饲料的开发及应用提供极大参考价值。

**关键词:** 浒苔; 青蛤; 发酵工艺; 响应面法; 工艺优化

中图分类号: S963.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2022)10-0068-10

DOI: 10.11759/hyxx20210929008

浒苔(*Enteromorpha prolifera*)属绿藻门石莼科浒苔属植物, 是一种适应能力强、繁殖快速的天然野生绿藻<sup>[1]</sup>, 在我国沿海均有分布。近年来, 全球变暖、海水温度升高、污水排放入海给浒苔提供了有利生长条件, 世界各海域均出现不同程度的浒苔爆发现象<sup>[2]</sup>。在我国黄海海域, 浒苔也连年呈暴发式生长, 对当地海洋生态环境造成极大威胁的同时, 使得该地区遭受严重的经济损失<sup>[3]</sup>。据统计, 超过 60%打捞上岸的浒苔被直接进行掩埋处理, 其生物价值难以发挥, 因此造成浒苔这一有效资源得不到充分利用<sup>[4]</sup>。如何有效预防及应对浒苔的爆发, 以及灾情出现后应该如何将打捞上岸的浒苔加以利用等问题, 一直是众人关注的焦点。

我国一直存在饲料蛋白原料短缺问题, 而利用微生物发酵技术能够开发出高效且安全的新型饲料资源<sup>[5]</sup>, 目前国内投入研究的发酵饲料蛋白原料包括豆粕<sup>[6]</sup>、菜籽粕<sup>[7]</sup>、棉粕<sup>[8]</sup>、血粉<sup>[9]</sup>等。浒苔是一种高蛋白、低脂肪的天然海藻食品原料, 富含浒苔多糖、粗纤维、粗脂肪、多重氨基酸及多种微量元素, 具有成为优质原料的特质。眼下, 国内学者已对浒苔的

发酵利用展开诸多研究, 其中包括利用浒苔发酵生产有机肥<sup>[10-11]</sup>, 开发海藻饮料<sup>[12]</sup>, 通过发酵浒苔制备生物乙醇等<sup>[13]</sup>。发酵饲料主要是通过微生物的分解作用, 将饲料原料中的大分子植物蛋白或部分难以被利用的动物蛋白转换为小分子的微生物蛋白、短链多肽等<sup>[14]</sup>。在微生物发酵作用下, 能够实现浒苔的快速液态发酵, 促使浒苔的大量蛋白质被释放到发酵液中, 并通过水解得到浒苔多糖。浒苔多糖具有提

收稿日期: 2021-09-29; 修回日期: 2021-12-21

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-49); 江苏省自然资源发展专项海洋科技创新项目(JSZRHYKJ202008); 江苏省现代农业自主创新项目 CX(20)3150; 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(JBGS [2021] 141); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX20\_1274)

[Foundation: Project Supported by China Agriculture Research System of MOF and ARA (CARS-49); Marine Science and Technology Innovation Project of Jiangsu Province Natural Resources Development Special Fund, No. JSZRHYKJ202008; The independent Agricultural Innovation Project of Jiangsu Province, No. CX(20)3150; The Project for Seed Industry Vitalization of Jiangsu Province, No. JBGS [2021] 141; The Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province, No. SJCX20\_1274]

作者简介: 夏青(1995—), 女, 江苏省连云港人, 硕士研究生, 研究方向为水产养殖, E-mail: summer\_mu@126.com; 董志国(1977—), 通信作者, 教授, 研究方向: 水产种质资源与养殖生态学, E-mail: dzg7712@163.com

高动物免疫能力、抗病毒等作用<sup>[15]</sup>，将浒苔作为添加剂加入水产动物饲料中的相关研究表明，饲料中添加浒苔对提升饲喂动物的免疫能力作用显著，如珍珠龙胆石斑鱼(*Pearl gentiana grouper*)<sup>[16]</sup>、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)<sup>[17]</sup>等。固态发酵是指在没有或几乎没有自由水存在的条件下，使用一种或多种微生物协同作用对底物进行发酵<sup>[18]</sup>。相较于液态发酵，固态发酵更具优势，包括用水量少、排污少、发酵条件容易控制等，且微生物在固态基质中易生长，酶活力更高<sup>[19]</sup>。另有研究发现固态发酵受物料碳氮比、营养成分、含水量、pH 和发酵温度等多种因素的影响，因此，发酵参数应根据菌种、工艺及发酵目标而确定<sup>[20]</sup>。

酸溶蛋白是低分子量蛋白质的水解物，其含量高低是评价饲料蛋白质标准的指标之一，饲料中酸溶蛋白比例较高可明显提高畜禽对蛋白质消化吸收的能力<sup>[21]</sup>。在浒苔发酵过程中，酸溶蛋白的含量对浒苔发酵饲料品质有着重要影响。因此，本试验以酸溶蛋白为发酵检测指标，以期能够较为准确地反映出浒苔在不同发酵条件下经微生物降解后的实际情况。

综上所述，本文拟通过对浒苔发酵工艺过程中的料液比、发酵时间、发酵温度进行优化，测定不同工艺条件下发酵产物对青蛤(*Cyclina sinensis*)的特定生长率的影响，并使用工艺优化后浒苔发酵产物和活体小球藻(*Chlorella*)喂养青蛤，并对喂养效果进行评价，以此来评估发酵浒苔作为青蛤配合饲料的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验所用浒苔打捞自连云港高公岛近海海域，低温烘干后经超微粉碎机研磨至 300 目备用。试验所用发酵菌株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)，以及养殖试验中所用活体小球藻，均由江苏海洋大学海洋生物技术重点实验室提供。

### 1.2 单因素试验设计

以相同的培养方法为前提，改变不同的发酵条件，包括发酵温度、料液比及发酵时间，测定不同条件下浒苔发酵产物中酸溶蛋白含量和 pH 变化，其中主要以酸溶蛋白含量为最终检测指标，pH 变化作为辅助参考。

发酵温度的确定：以料液比(1 : 1.2) g·mL<sup>-1</sup>向浒

苔干粉中加入纯水，按 3% 的接种量将浒苔干粉接入固体发酵培养基中，混匀后放入密封发酵袋，分别置于温度为 25、30、35、40、45 °C 的生化培养箱进行发酵，发酵时间为 72 h。

料液比的确定：向浒苔干粉中加入纯水，按 3% 的接种量将浒苔干粉接入固体发酵培养基中，混匀后放入密封发酵袋，在温度为 35 °C 的生化培养箱内进行发酵，发酵时间为 72 h，设置 5 个梯度的料液比，分别为 (1 : 0.6)、(1 : 0.9)、(1 : 1.2)、(1 : 1.5)、(1 : 1.8) g·mL<sup>-1</sup>。

发酵时间的确定：以料液比(1 : 1.2) g·mL<sup>-1</sup>向浒苔干粉中加入纯水，按 3% 的接种量将浒苔干粉接入固体发酵培养基中，混匀后放入密封发酵袋，置于发酵温度为 35 °C 的生化培养箱中，分别发酵 48、60、72、84 和 96 h。

### 1.3 响应面分析试验

在单因素试验基础上，利用正交试验得到浒苔发酵的最适条件，使用 Design-Expert 10.0.3 软件设定不同的发酵温度、发酵时间及料液比，以青蛤特定生长率( $R_{SG}$ )为响应值，利用 Box-Behnken 中心组合方法进行三因素三水平的响应面分析试验，试验因素与水平设计见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平设计

Tab. 1 Factors and levels of the response surface design

水平	A 发酵温度/°C	B 料液比/(g·mL <sup>-1</sup> )	C 发酵时间/h
-1	30	1 : 1.2	72
0	35	1 : 1.5	84
1	40	1 : 1.8	96

### 1.4 养殖试验

试验所用青蛤均购自连云港市赣榆区海头镇苏鲁渔业批发市场。试验在国家贝类体系连云港综合试验站进行，养殖设施为容积 300 L 的圆柱形帆布养殖池。首先挑选规格相近、表面无损伤的 1 龄青蛤(初始体质量(6.90±0.33) g，初始壳长(2.74±0.07) cm，在实验室暂养 1 周后，选取健康个体进行养殖试验，试验组与对照组分别设置 3 组重复，每组青蛤数量为 200 只。本试验养殖周期为 90 d，试验组投喂饵料选用工艺优化后的浒苔发酵产物(具体发酵条件：发酵温度 35 °C，料液比(1 : 1.5) g·mL<sup>-1</sup>，发酵时间 84 h，对照组投喂饵料选用活体小球藻，试验组与对照组的每日投饵量为组内喂养青蛤总质量的 2%，于每日 14 时进行投喂。试验期间，水质指标维持在：海水盐

度 20~30; pH 7.0~9.0; 平均溶氧量>4 mg/L; 氨氮浓度<0.4 mg/L; 亚硝酸盐<0.15 mg/L。

### 1.5 指标测定

酸溶蛋白含量的测定参照肖志明等<sup>[22]</sup>, 称取 1.0 g 发酵样品, 溶解到 50 mL 15% 三氯乙酸溶液中, 磁力搅拌 30 min, 取 10 mL 滤液进行消化, 其余步骤参考国标凯氏定氮法(GB/T 6432—2018); pH 测定使用梅特勒 S20K 台式 pH 计, 将发酵海藻粉配置成 3% 的溶液, 振荡 5 min 后读数测定。灰分利用马弗炉在 550 °C 下灼烧至恒重进行测定; 粗蛋白的测定参照 GB/T 5009.5—2010, 酸消化后于 FOSS KjeltecTM8400 凯氏定氮仪进行测定; 粗脂肪的测定参照: GB/T 14772—2008, 采用石油醚萃取后, 于 FOSS soxtec 2050 全自动索氏抽提仪提取粗脂肪。

$$\text{存活率} = (\text{存活个体数} / \text{总个体数}) \times 100\%, \quad (1)$$

$$\text{青蛤特定生长率}(R_{SG}) = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%, \quad (2)$$

式中,  $W_t$  为青蛤终末体质量(g);  $W_0$  为青蛤初始体质量(g),  $t$  为养殖天数(d)。

### 1.6 数据统计与分析

本试验数据采用 SPSS20.0 软件进行分析, 采用 Duncan 进行多重比较分析, 使用 ANOVA 进行方差分析, 使用 LSD 进行差异性检验, 利用 Design Expert 10.0.3 进行正交试验设计与分析, 本试验数据结果以“平均值±标准误”表示,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 不同发酵温度对发酵浒苔酸溶蛋白含量和 pH 的影响

本试验共设置 5 个发酵温度梯度, 分别为 25、30、35、40 及 45 °C。根据图 1 可知, 当发酵温度处于 25~30 °C、35~45 °C 区间时, 发酵浒苔的酸溶蛋白含量呈下降趋势; 当发酵温度为 35 °C 时, 发酵浒苔的酸溶蛋白含量最高, 且与其他试验组存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。5 个试验组 pH 测定结果在 4.4~5.83 之间, 其中 35 °C 组 pH 为 4.4, 属于发酵饲料的正常范围。因此, 认为浒苔的植物乳杆菌最适发酵温度为 35 °C。

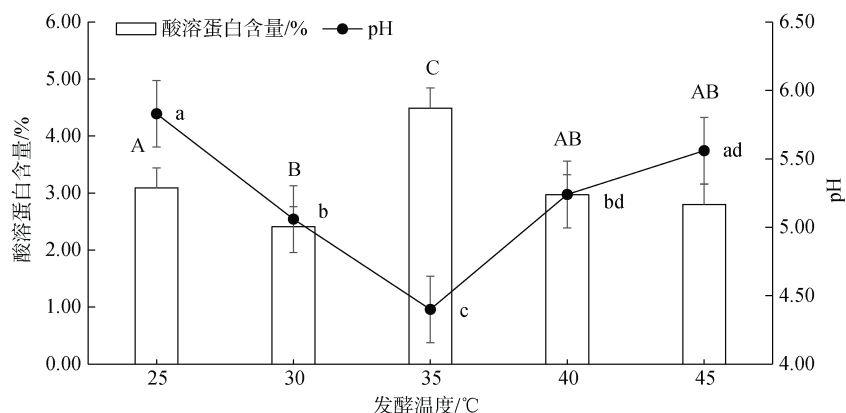


图 1 不同发酵温度对发酵浒苔酸溶蛋白含量和 pH 的影响

Fig. 1 Effect of different fermentation temperatures on the acid soluble protein content and pH of *E. prolifera*

注: 不同字母表示存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其中, 以不同大写字母表示酸溶蛋白含量的差异, 以不同小写字母表示 pH 的差异, 下同

### 2.2 不同料液比对发酵浒苔酸溶蛋白含量和 pH 的影响

由图 2 可知, 料液比从 (1 : 1.5)  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  上升至 (1 : 0.6)  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 发酵浒苔的酸溶蛋白含量显著性提升 ( $P < 0.05$ ), 当料液比小于 (1 : 1.5)  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时, 发酵后浒苔的酸溶蛋白含量呈现较高水平且增长不显著 ( $P > 0.05$ ); pH 从料液比为 (1 : 0.6)  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  至 (1 : 1.2)  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  间呈显著降低 ( $P < 0.05$ ), 当料液比在 (1 : 1.2)  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  至 (1 : 1.8)  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  之间时, 发酵后浒苔的 pH 随着提取溶剂体积的提高未表现出显著变化 ( $P > 0.05$ )。考虑到物

料成本, 选择最适料液比 (1 : 1.5)  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.3 不同发酵时间对发酵浒苔酸溶蛋白含量和 pH 的影响

不同的发酵时间对浒苔酸溶蛋白含量有着较大影响。由图 3 可知, 当发酵时间在 60~96 h 区间时, 各区间 pH 的差异不具有显著性 ( $P > 0.05$ )。发酵时间为 84 h 酸溶蛋白含量最高, 并显著高于其他试验组 ( $P < 0.05$ ), 应在 pH 降低不显著的情况下, 选择酸溶蛋白含量较高的发酵时间。因此, 认为浒苔的植物乳杆菌优化发酵时间为 84 h。

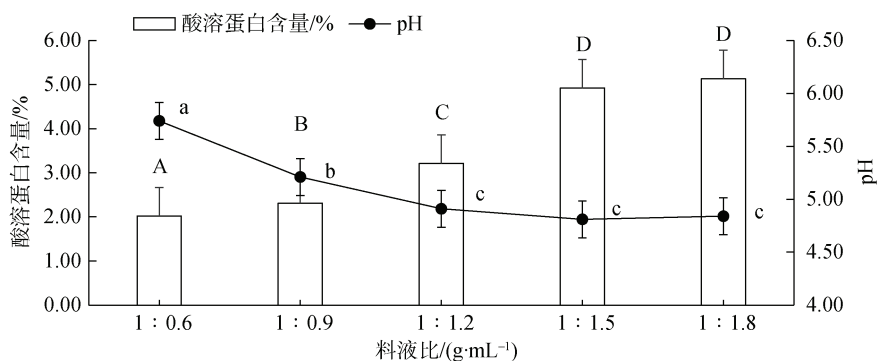


图 2 不同料液比对发酵浒苔酸溶蛋白含量和 pH 的影响

Fig. 2 Effect of different material-liquid ratios on the acid-soluble protein content and pH of *E. prolifera*

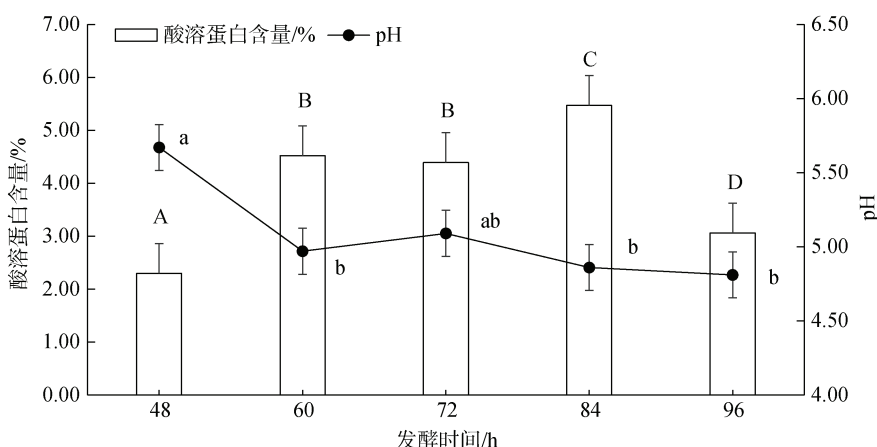


图 3 不同发酵时间对发酵浒苔酸溶蛋白含量和 pH 的影响

Fig. 3 Effect of different fermentation times on the acid-soluble protein content and pH of *E. prolifera*

## 2.4 响应面试验结果及方差分析

在单因素试验的基础上, 利用 Design-Expert 10.0.3 软件, 选择发酵温度(A)30、35、40 °C, 料液比(B)(1:1.2)、(1:1.5)、(1:1.8) g·mL<sup>-1</sup>, 发酵时间(C)72、84、96 h, 以青蛤特定生长率( $R_{SG}$ )为响应值, 用 Design-Expert 设计三因素三水平的 Box-Behnken 试验, Box-Behnken 试验设计及结果见表 2, 回归模型方差分析结果见表 3。

将各因素使用 Design-Expert 10.0.3 软件进行二次多项式回归拟合后, 得到青蛤特定生长率响应面回归模拟方程:

$$R_{SG} = -1.820 + 0.038 2A + 1.123 3B + 0.009 7C - 0.002 3AB - 0.000 1AC - 0.003 7BC - 0.000 4A^2 - 0.213 1B^2 + 0.000 02C^2. \quad (3)$$

通过表 3 可以看出, 该方程决定系数  $R^2=0.908 0$ ,  $P=0.000 4 < 0.01$ , 说明该模型极显著; 且失拟项  $P=0.265 9 > 0.05$ , 表明失拟不显著, 该方程拟合度较好, 可信度较大, 证明该模型具有稳定性, 即发酵温

度、料液比和发酵时间 3 个因素对浒苔发酵工艺影响可使用该模型来描述。根据结果显示, 最佳发酵工艺条件为: 发酵温度 35°C, 料液比(1:1.5) g/mL, 发酵时间 84 h。一次项 A、B、C 均对结果影响极显著( $P < 0.01$ ), 交互项 AB 对结果存在显著影响( $P < 0.05$ ), 其余各因素之间交互作用不明显。3 个因素对青蛤特定生长率的影响主次顺序为  $A > B > C$ , 即: 发酵温度 > 料液比 > 发酵时间。

## 2.5 响应面交互分析

响应面曲面坡度和等高线形状能够直观反映出各试验因素及两两因素的交互作用对响应值青蛤特定生长率的影响。发酵时间、发酵温度、料液比的交互作用对青蛤特定生长率影响的响应面结果见图 4。料液比与发酵温度的交互作用对青蛤特定生长率的影响见图 4(a)。由图可知, 当发酵时间为中心水平时, 发酵温度的等高线密度大于向料液比移动的等高线密度, 说明发酵温度对青蛤特定生长率的影响大于

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of the Box-Behnken experiment

试验号	A 发酵温度/°C	B 料液比/(g·mL <sup>-1</sup> )	C 发酵时间/h	Y 特定增长率/(%·d <sup>-1</sup> )
1	40	1 : 1.2	84	0.117
2	35	1 : 1.2	96	0.169
3	35	1 : 1.5	72	0.172
4	35	1 : 1.5	84	0.179
5	35	1 : 1.2	96	0.091
6	35	1 : 1.8	84	0.184
7	40	1 : 1.5	72	0.137
8	40	1 : 1.5	84	0.165
9	30	1 : 1.8	84	0.192
10	35	1 : 1.5	84	0.192
11	35	1 : 1.5	84	0.172
12	30	1 : 1.5	72	0.226
13	30	1 : 1.5	96	0.163
14	40	1 : 1.8	84	0.149
15	35	1 : 1.5	96	0.183
16	30	1 : 1.2	72	0.146
17	35	1 : 1.8	84	0.208

表 3 回归模型的方差分析

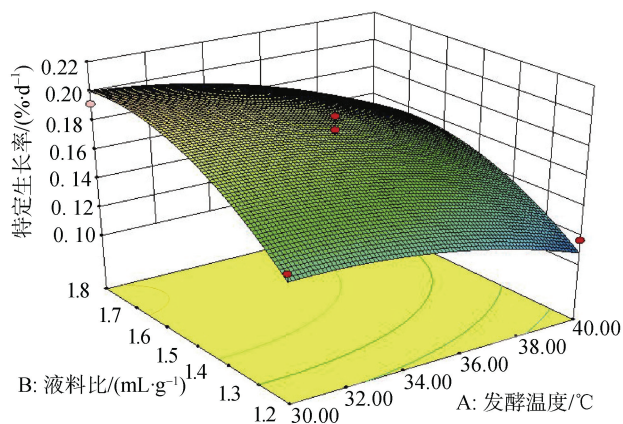
Tab. 3 Analysis of variance of regression models

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型的残差平方和	0.016	9	1.83×10 <sup>-3</sup>	18.54	0.000 4	**
A	5.51×10 <sup>-3</sup>	1	5.51×10 <sup>-3</sup>	56.01	0.000 1	**
B	4.66×10 <sup>-3</sup>	1	4.66×10 <sup>-3</sup>	47.31	0.000 2	**
C	3.16×10 <sup>-3</sup>	1	3.16×10 <sup>-3</sup>	32.11	0.000 8	**
AB	7.29×10 <sup>-4</sup>	1	7.29×10 <sup>-4</sup>	7.41	0.029 7	*
AC	4.90×10 <sup>-5</sup>	1	4.90×10 <sup>-5</sup>	0.50	0.503 2	
BC	3.06×10 <sup>-4</sup>	1	3.06×10 <sup>-4</sup>	3.11	0.121 1	
A <sup>2</sup>	1.55×10 <sup>-3</sup>	1	1.55×10 <sup>-3</sup>	15.73	0.005 4	**
B <sup>2</sup>	2.80×10 <sup>-5</sup>	1	2.80×10 <sup>-5</sup>	0.28	0.610 8	
C <sup>2</sup>	3.74×10 <sup>-4</sup>	1	3.74×10 <sup>-4</sup>	3.80	0.092 2	
残差平方和	6.89×10 <sup>-4</sup>	7	9.80×10 <sup>-5</sup>			
失拟度	4.08×10 <sup>-3</sup>	3	1.36×10 <sup>-4</sup>	1.93	0.265 9	
纯误差平方和	2.81×10 <sup>-4</sup>	4	7.00×10 <sup>-5</sup>			

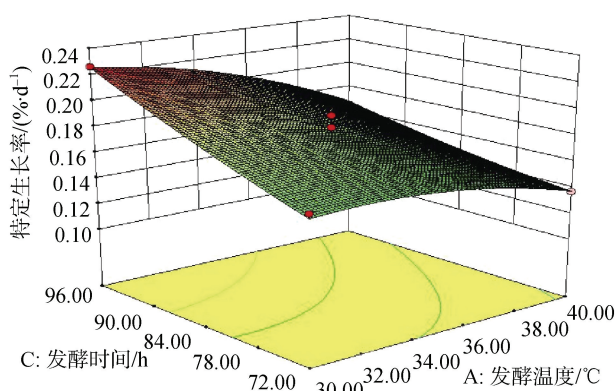
注: \*\* $P < 0.01$ , 差异极显著; \* $P < 0.05$ , 差异显著。

料液比。发酵时间与发酵温度的交互作用对青蛤特定增长率的影响见图 4(b)。由图可知, 当取料液比为中心水平, 发酵温度响应曲面的陡度大于发酵时间的陡度, 说明发酵温度对青蛤特定增长率的影响大于发酵时间。发酵时间与料液比的交互作用对青蛤特定增长率的影响见图 4(c)。如图所示, 当取发酵温度为中心

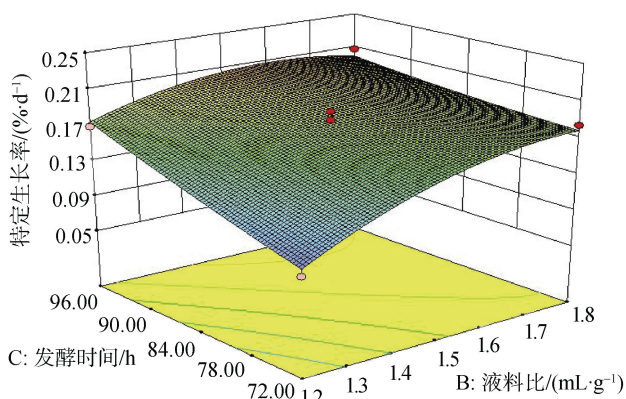
水平, 料液比响应曲面的陡度大于发酵时间的陡度, 且料液比等高线的密度大于向发酵时间移动的等高线密度, 说明料液比对青蛤特定增长率的影响大于发酵时间。综合以上三维响应曲面分析可知, 三个因素对浒苔发酵工艺产生的影响由大及小为: 发酵温度>料液比>发酵时间, 与方差分析的结果相一致。



(a) 发酵温度、料液比的相互作用对青蛤特定生长率的响应面图



(b) 发酵温度与发酵时间的交互作用



(c) 料液比、发酵时间的相互作用对青蛤特定生长率的响应面图

图 4 发酵温度、料液比及发酵时间的交互作用对青蛤特定生长率影响的响应面图

Fig. 4 Effect of the interaction between fermentation temperature, material-liquid ratio, and fermentation time on the specific growth rate of *C. sinensis*

## 2.6 浒苔发酵前后常规营养成分测定

发酵前后浒苔干粉中 3 种常规营养成分含量如表 4 所示。由试验结果可知, 浒苔经过优化工艺发酵后, 蛋白质含量由未发酵时的 31.13% 提高到

36.46%, 发酵浒苔和浒苔原料之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。发酵前后浒苔的粗脂肪与粗灰分的含量并无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 4 浒苔发酵前后常规营养成分(以干重计)  
Tab. 4 Conventional nutrients of *E. prolifera* before and after fermentation (dry weight)

营养成分	浒苔原料	发酵浒苔
粗蛋白/%	31.13±0.83 <sup>b</sup>	36.46±0.03 <sup>a</sup>
粗脂肪/%	0.85±0.02	0.82±0.01
粗灰分/%	24.20±0.17	23.92±0.36

## 2.7 不同饵料喂养青蛤效果对比

利用发酵浒苔与常规小球藻喂养青蛤的特定生长率与存活率结果如表 5 所示。表中试验组青蛤所投喂饵料为工艺优化后的发酵浒苔, 对照组青蛤饵料为活体小球藻。通过单因素方差分析发现两组之间的特定生长率不存在显著差异 ( $P > 0.05$ ); 通过卡方检验, 未发现试验组青蛤的存活率与对照组间存在显著差异 ( $P > 0.05$ ), 该结果说明使用工艺优化后的发酵浒苔替代小球藻作为贝类配合饲料这一做法具有可行性。

表 5 发酵浒苔与小球藻喂养青蛤的特定生长率与存活率  
Tab. 5 Specific growth and survival rates of *C. sinensis* fed with *Chlorella* and fermented *E. prolifera*

	对照组	试验组
特定生长率/(%·d <sup>-1</sup> )	1.72	1.67
存活率/%	89.58	86.67

## 3 讨论

本研究首先通过不同条件下发酵浒苔酸溶蛋白含量和 pH 的单因素试验, 确定了 3 个影响因素的最佳条件, 以用于进行响应面分析, 采用 Box-Behnken 中心组合试验设计及响应面分析, 建立二次回归模型, 通过对发酵温度、发酵时间、料液比三因素进行方差分析和交互作用分析, 观察不同工艺下浒苔发酵产物对青蛤特定生长率的影响, 由此建立响应面公式模型, 确定浒苔植物乳杆菌最优发酵工艺。

通过发酵可提高发酵产物酸溶蛋白含量主要是因为通过微生物的作用, 能够将发酵原料中蛋白质水解成小肽, 进而提高蛋白质的利用率。本文单因素试验结果证明了不同的发酵温度对发酵浒苔的酸溶蛋白含量存在显著影响。其中, 当发酵温度为 35 °C

时,其酸溶蛋白含量显著高于 30 °C 组与 40 °C 组。这一结果与于哲<sup>[23]</sup>利用不同发酵温度优化酵母菌发酵大米蛋白结论相似。吴培凤等<sup>[24]</sup>研究表明浒苔中半纤维素在提取温度为 85 °C 时达到最大值,熊皓平等<sup>[25]</sup>发现硃洲马尾藻多糖提取优化后的发酵温度为 90.7 °C,超过该温度后提取效果不再升高。

试验结果显示在一定范围内物料中的含水量会影响发酵微生物的生长代谢,且会影响到发酵产物的 pH。文中 5 个不同料液比试验组对发酵浒苔中酸溶蛋白含量影响结果表明,发酵浒苔中酸溶蛋白的含量会随着物料中含水量的增加呈上升趋势,且当料液比为(1:0.6)~(1:1.5) g·mL<sup>-1</sup>时各组间存在显著差异( $P<0.05$ )。这是因为在一定比例中,水作为溶剂可以使混合植物乳杆菌的浒苔干粉发酵得更为充分,这一发现与姚兰<sup>[26]</sup>利用不同料液比提取海带中岩藻多糖的结果相似。

据吕文竹等<sup>[27]</sup>研究结果显示,不同的发酵时间会影响发酵饲料中酸溶蛋白含量。本试验发现不同发酵时间会影响浒苔发酵产物中酸溶蛋白含量,且得出浒苔最适发酵时间为 84 h,利用该时间能够实现微生物对底物进行最大限度的利用。随着发酵时间的进一步延长,发酵浒苔的酸溶蛋白含量显著降低,这可能是因为超出合适的发酵时间会引起发酵产物中的微生物大量死亡,并引发其他杂菌的滋生,进而消耗发酵产物中的优质蛋白,从而导致发酵饲料品质下降。迟永洲等<sup>[12]</sup>发现,在发酵温度 28 °C,发酵时间 20 h 环境下,条浒苔的发酵效果最好。

为检验利用 Design-Expert 软件设计的模型是否可靠,本文对浒苔原料和工艺优化过的发酵浒苔进行常规营养物质测定,本次试验中测得浒苔原料的常规营养物质含量也与廖梅杰等<sup>[28]</sup>、王婷婷等<sup>[29]</sup>结果相近。研究结果表明工艺优化后发酵浒苔的营养价值较浒苔原料有所提升,发酵浒苔的粗蛋白含量较浒苔原料有显著提高。粗蛋白含量的提升是由于在发酵过程中,微生物通过呼吸作用消耗掉部分有机物料,将其转换为 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O,产生蛋白质的浓缩效应<sup>[30]</sup>。发酵后浒苔常规营养价值的提升,则说明利用微生物发酵实现浒苔成为水产动物饲料源具有可行性。

有研究显示将浒苔作为饲料添加剂能有效提升水产动物在生长性能、抗应激能力、抗病力等方面的表现<sup>[16-17]</sup>。通过对比使用工艺优化后的浒苔发酵产物与使用活体小球藻所喂养青蛤的生长性能后发

现,前者在特定生长率与存活率方面的表现并不理想,推测造成这一现象的主要原因是发酵浒苔营养较为丰富,在实验室的单一海水养殖环境下投喂发酵浒苔易引起水体的富营养化,且更易造成养殖水体浑浊,当水体指标超出正常范围时,试验组会进行少量换水,但可能由此引起青蛤产生应激反应,从而导致试验组青蛤的特定生长率与存活率略低于对照组。

## 4 结论

浒苔发酵工艺受料液比、发酵温度、发酵时间等条件影响,本试验以浒苔发酵产物所喂养的青蛤的特定生长率为响应值,利用响应面法对浒苔发酵工艺条件进行优化,结果表明料液比、发酵温度、发酵时间对浒苔发酵工艺的影响顺序为:发酵温度>料液比>发酵时间。根据试验结果得出最优的浒苔发酵工艺为:发酵温度 35 °C,料液比(1:1.5) g·mL<sup>-1</sup>,发酵时间 84 h。在此工艺下进行验证,发现发酵后浒苔的粗蛋白含量显著高于浒苔原料,且使用工艺优化后的浒苔发酵产物所喂养的青蛤与投喂活体小球藻的青蛤在特定生长率与存活率方面无显著差异,该结果也验证了优化后的浒苔发酵工艺具备合理性及可靠性。通过该工艺能够实现将浒苔发酵产物作为贝的配合饲料,进一步说明可以通过微生物发酵实现浒苔在饲料产业的再生利用,为浒苔发酵饲料在实际生产中的应用提供理论基础。

### 参考文献:

- [1] 付石军,郭时金,唐世云,等. 浒苔的营养价值及其在养殖业中的应用[J]. 饲料与畜牧, 2015(2): 48-51.  
FU Shijun, GUO Shijin, TANG Shiyun, et al. The nutritional value of *Enteromorpha Polifer* and its application in breeding industry[J]. Animal Agriculture, 2015(2): 48-51.
- [2] 罗佳捷,肖淑华,张彬,等. 浒苔的研究进展及其在动物生产中的应用[J]. 饲料博览, 2014(2): 31-34.  
LUO Jiajie, XIAO Shuhua, ZHANG Bin, et al. Research progress of *Enteromorpha polifer* and application in animal production[J]. Feed Review, 2014(2): 31-34.
- [3] 单菁竹,李京梅,许志华. CVM 中的抗议性响应: 动机与影响——以胶州湾浒苔治理支付意愿为例[J]. 自然资源学报, 2020, 35(3): 626-638.  
SHAN Jingzhu, LI Jingmei, XU Zhihua. The protest response in contingent valuation method: Motivation and impact: A case study of willingness to pay for the

- governance of green tides in Jiaozhou Bay[J]. Journal of Natural Resources, 2020, 35(3): 626-638.
- [4] 王宗灵, 傅明珠, 周健, 等. 黄海浒苔绿潮防灾减灾现状与早期防控展望[J]. 海洋学报, 2020, 42(8): 1-11. WANG Zongling, FU Mingzhu, ZHOU Jian, et al. Current situation of prevention and mitigation of the Yellow Sea green tide and proposing control measurements in the early stage[J]. Haiyang Xuebao, 2020, 42(8): 1-11.
- [5] 张成, 韩坤坤, 罗世龙, 等. 发酵豆粕的应用研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 2018(12): 42-45, 49. ZHANG Cheng, HAN Kunkun, LUO Shilong, et al. Progress in the application of soybean meal[J]. Cereal & Feed Industry, 2018(12): 42-45, 49.
- [6] 陈广信, 曹赞, 高振华. 不同发酵豆粕营养价值及应用[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(2): 111-114. CHEN Guangxin, CAO Zan, GAO Zhenhua. Application and nutrition value of different fermented soybean meal[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(2): 111-114.
- [7] XU F Z, ZENG X G, DING X L. Effects of replacing soybean meal with fermented rapeseed meal on performance, serum biochemical variables and intestinal morphology of broilers[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2012, 25(12): 1734.
- [8] 乔晓艳, 蔡国林, 陆健. 微生物发酵改善棉粕饲用品质的研究[J]. 中国油脂, 2013, 38(5): 30-34. QIAO Xiaoyan, CAI Guolin, LU Jian. Improvement of feeding quality of cottonseed meal by microbial fermentation[J]. China Oils and Fats, 2013, 38(5): 30-34.
- [9] ZHANG B R, YANG W, ZHANG H Y, et al. Effect of fermented blood cells on growth performance and intestinal characteristics of weaned piglets[J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2019, 103(6): 1875-1884.
- [10] 黄志俊. 浒苔固体快速发酵过程研究及产品开发[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015. HUANG Zhijun. Study on the rapid solid fermentation of *Enteromorpha prolifera* and its product development[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.
- [11] 李银平, 王进, 于源, 等. 浒苔生物有机肥的制备及其对樱桃萝卜品质影响的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(24): 120-124. LI Yinping, WANG Jin, YU Yuan, et al. Study on the production of *Enteromorpha prolifera* bio-organic fertilizer and its effect on the quality of Cherry Radish[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(24): 120-124.
- [12] 迟永洲, 叶晗, 左思琦, 等. 条浒苔快速液态发酵工艺研究[C]//中国食品科学技术学会第十五届年会论文摘要集, 青岛, 2018: 1. CHI Yongzhou, YE Han, ZUO Siqi, et al. Study on liquid fermentation process of *Enteromorpha clathrate*[C]// The 15th Annual Meeting of Chinese Institute of Food Science and Technology, Qingdao, 2018: 1.
- [13] 王吉萍. 大型海藻酶解发酵制备生物乙醇的研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2018. WANG Jiping. Study on preparation of bioethanol by enzymatic fermentation of macroalgae[D]. Qingdao: Qingdao University, 2018.
- [14] 黄明媛, 罗晓春. 动物内源蛋白酶与微生物蛋白酶对植物性蛋白分解特点简述[J]. 饲料研究, 2014(9): 4-6. HUANG Mingyuan, LUO Xiaochun. Brief introduction of the characteristics of plant protein degradation by animal endogenous protease and microbial protease[J]. Feed Research, 2014(9): 4-6.
- [15] 王盼, 孙占一, 申培丽. 浒苔多糖的制备及应用研究进展[J]. 现代食品, 2020(21): 77-79. WANG pan, SUN Zhanyi, SHEN Peili. The study of the preparation and application of *Enteromorpha* polysaccharides[J]. Modern Food, 2020(21): 77-79.
- [16] 徐安乐, 黎中宝, 上官静波, 等. 发酵浒苔对珍珠龙胆石斑鱼生长、非特异性免疫及消化酶活性的影响[J]. 海洋学报, 2018, 40(4): 96-105. XU Anle, LI Zhongbao, SHANGGUAN Jingbo, et al. Effect of fermented *Enteromorpha prolifera* on growth performance non-specific immunity and digestive enzyme activity of pearl gentian grouper[J]. Haiyang Xuebao, 2018, 40(4): 96-105.
- [17] 赵敏, 席庆凯, 刘天骥, 等. 浒苔粉对凡纳滨对虾生长、免疫及抗应激的影响[J]. 中国饲料, 2020(13): 68-72. ZHAO min, XI Qingkai, LIU Tianji, et al. Effects of *Enteromorpha prolifera* on growth, immunity and anti-stress of *Penaeus vannamei*[J]. China Feed, 2020(13): 68-72.
- [18] 王永伟, 宋丹, 李爱科, 等. 发酵饲料资源开发及应用技术研究进展[J]. 中国饲料, 2019 (11): 75-80. WANG Yongwei, SONG Dan, LI Aike, et al. Fermentative feed resources: development and application research[J]. China Seed, 2019 (11): 75-80.
- [19] 暴风. 饲料发酵工艺的应用研究[J]. 中国动物保健, 2020, 22(12): 51-52. BAO Feng. Applied research on feed fermentation technology[J]. China Animal Health, 2020, 22(12): 51-52.
- [20] 祝玉洪, 马立周. 发酵技术在饲料行业中的应用[J]. 饲料工业, 2013: 34(18): 49-54. ZHU Yuhong, MA Lizhou. Application of fermentation technology in feed industry[J]. Feed Industry, 2013: 34(18): 49-54.
- [21] 亓秀晔, 谢全喜, 陈振, 等. 乳杆菌酵母菌及混菌对发酵饲料品质的影响[J]. 中国酿造, 2017, 36(1): 75-78.



- QI Xiuye, XIE Quanxi, CHEN Zhen, et al. Effect of Lactobacillus, yeast and multi-strains fermentation on fermented feed quality[J]. *China Brewing*, 2017, 36(1): 75-78.
- [22] 肖志明, 李丽蓓, 邓涛, 等. 饲料原料中酸溶蛋白的测定方法研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2016, 52(2): 72-75, 80.  
XIAO Zhiming, LI Lipei, DENG Tao, et al. Study for the determination of acid-soluble protein in feed materials[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2016, 52(2): 72-75, 80.
- [23] 于喆. 大米蛋白的发酵优化及替代鱼粉饲喂鲫鱼的效果研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013: 10-13.  
YU Zhe. Fermentation optimization of rice protein and its replacement effect of fish meal on feeding in cultivation of *Carassius Auratus*[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2013: 10-13.
- [24] 吴培凤, 周德庆, 孙永, 等. 响应面法优化浒苔半纤维素的提取条件及其组分分析[J]. *海洋科学*, 2017, 41(1): 48-56.  
WU Peifeng, ZHOU Deqing, SUN Yong, et al. Optimization of hemicellulose extraction from *Enteromorpha prolifera* using response surface method and component analysis[J]. *Marine Sciences*, 2017, 41(1): 48-56.
- [25] 熊皓平, 黄和, 王博, 等. 响应面法优化硃洲马尾藻多糖提取工艺[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(5): 52-56.  
XIONG Haoping, HUANG He, WANG Bo, et al. Optimization of extraction conditions of *S. Naozhouense* sp. nov. polysaccharides by using response surface methodology[J]. *Food Research and Development*, 2011, 32(5): 52-56.
- [26] 姚兰. 海带中多糖的提取及其综合利用[D]. 济南: 山东轻工业学院, 2007.  
YAO Lan. The polysaccharide-extraction and comprehensive utilization of *Laminaria japonica*[D]. Jinan: Shandong University of Light Industry, 2007.
- [27] 吕文竹, 王洋, 方玉美, 等. 不同发酵条件对构树饲料酸溶蛋白含量的影响[J]. *饲料研究*, 2021(11): 75-78.  
LÜ Wenzhu, WANG Yang, FANG Yumei, et al. Effect of fermentation conditions on the content of acid soluble protein in *Broussonetia papyrifera* feed[J]. *Feed Research*, 2021(11): 75-78.
- [28] 廖梅杰, 郝志凯, 尚德荣, 等. 浒苔营养成分分析与投喂刺参试验[J]. *渔业现代化*, 2011, 38(4): 32-36.  
LIAO Meijie, HAO Zhikai, SHANG Derong, et al. Nutrition components analysis of *Enteromorpha prolifera* and its preliminary study on feeding *Apostichopus japonicus*[J]. *Fishery Modernization*, 2011, 38(4): 32-36.
- [29] 王婷婷, 郑丽杰, 韩威, 等. 不同海域浒苔品质差异评价[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(17): 321-326.  
WANG Tingting, ZHENG Lijie, HAN Wei, et al. Evaluation of quality difference of *Ulva prolifera* in different sea areas[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(17): 321-326.
- [30] 宋海燕, 何文辉, 彭自然, 等. 响应面法优化鹿角菜中岩藻多糖的提取工艺[J]. *海洋科学*, 2016, 40(4): 73-80.  
SONG Haiyan, HE Wenhui, PENG Ziran, et al. Optimization of fucoidan extraction process from *Pelvetia siliquosa* Tseng et C. F. Chang by using response surface methodology[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(4): 73-80.

# Optimization of *Enteromorpha prolifera* fermentation technology and evaluation of *Cyclina sinensis* feeding effects

XIA Qing<sup>1,2</sup>, SUN Ze-peng<sup>1,2</sup>, LIU Mei-mei<sup>1,2</sup>, LIAO Xiao-ting<sup>1,2</sup>, DONG Zhi-guo<sup>1,2,3</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Eco-environment, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222006, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222006, China; 3. Co-Innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222006, China)

Received: Sep. 29, 2021

**Key words:** *Enteromorpha prolifera*; *Cyclina sinensis*; fermentation process; response surface methodology; process optimization

**Abstract:** In this study, *Lactobacillus plantarum* was used as the fermentation strain, and the solid-state fermentation method was adopted for microbial fermentation of *Enteromorpha prolifera*. According to the single-factor experiment, we explored the effects of three factors (fermentation time, fermentation temperature, and the material-liquid ratio) on the fermentation of *E. prolifera*. The optimal conditions for *E. prolifera* fermentation were obtained using orthogonal testing. Then, we used response surface methodology to optimize the *E. prolifera* fermentation process. In addition, this study carried out a clam, *Cyclina sinensis*, culture experiment. We compared the growth performance of *Chlorella* and fermented *E. prolifera* on feeding *C. sinensis* to verify the actual effect of the fermentation process. The results showed that the primary and secondary order of the three factors affecting the *E. prolifera* fermentation process was the fermentation temperature, the material-to-liquid ratio, and the fermentation time. The *E. prolifera* fermentation conditions were a fermentation temperature of 35 °C, material-to-liquid ratio of (1 : 1.5) g·mL<sup>-1</sup>, and fermentation time of 84 h. The results showed that the crude protein content of the fermented *E. prolifera* was significantly higher than that of unfermented *E. prolifera* ( $P < 0.05$ ). No significant differences in specific growth or survival rates were detected in *C. sinensis* between feeding *Chlorella* and fermented *E. prolifera*. These results provide a theoretical basis for applying *E. prolifera* feedstuff in actual production.

(本文编辑: 赵卫红)