

发酵过程对橙皮渣中农药残留的影响*

毛雪飞^{1,2}, 焦必宁², 钱永忠¹, 赵其阳², 付陈梅², 孙志高²

1(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京, 100081) 2(中国农业科学院柑橘研究所, 重庆, 400712)

摘要 利用热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)1254 和宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*)对甜橙皮渣进行发酵处理, 研究发酵过程对皮渣中16种农药残留含量的影响。结果显示: 酵母和曲霉发酵处理对甜橙皮渣中百菌清和敌敌畏残留的降解最显著, 降解率达到了72.87%~100%; 除氧化乐果外, 其他有机磷农药残留的降解率为27.95%~62.28%, 显著高于对照, 也高于相应处理中的三氯杀螨醇、腐霉利和菊酯类农药残留的降解率。此外, 酵母发酵处理对皮渣中农药残留降解的总体效果要好于曲霉处理。

关键词 发酵, 甜橙, 皮渣饲料, 农药残留

将柑橘皮渣发酵后制成干饲料, 既能改善产品的耐贮性, 又能明显提高粗蛋白含量, 对于皮渣的综合加工利用具有非常重要的意义^[1]。

柑橘果皮较厚, 且覆盖一层蜡质, 非常容易富集农药残留, 据作者所在实验室研究, 柑橘中90%以上的农残分布在果皮油胞层中。虽然皮渣加热干燥过程会对农药残留有一定的降解作用, 但也易导致产品中部分农药残留的浓缩, 如 Gunther 等人^[3]干燥橘皮饲料时, 谷硫磷残留的含量由干燥前的1.4 mg/kg 升高到干燥后的1.6 mg/kg, 而饲料中富集的农药残留会通过食物链最终威胁到消费者的健康和安全^[2]。目前有研究显示, 微生物代谢对农药残留有不同程度的降解作用, 尤其是啤酒和葡萄酒酿造过程中农药残留的研究相对较多^[4], 还有一些集中在特种菌对水和环境农药残留污染的降解^[5]。本试验利用热带假丝酵母1254 和宇佐美曲霉对甜橙皮渣进行发酵处理, 研究微生物发酵过程对皮渣中农药残留含量的影响, 以期控制橙皮渣饲料中的农药残留、保障畜产品的质量安全提供参考。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)1254 和宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*), 引自工业微生物菌种

第一作者: 硕士研究生(焦必宁研究员和钱永忠研究员为通讯作者)。

* 国家“十一五”科技支撑计划(2007BAD47B05, 2007BAD47B07), 重庆市“十一五”重大技术研究专项资助(CSTC2007AA1016)

收稿日期: 2008-01-24

保藏管理中心, 由中国农业科学院柑橘研究所加工课题组保藏和提供。

1.1.2 培养基及原料

培养基: 5°Brix 麦芽原汁; 马铃薯汁。

甜橙皮渣: 锦橙整果浸泡农药, 晾干贮藏2d后, 榨汁所得皮渣再经粉碎处理, 含水率约70%。

1.1.3 试验仪器

Agilent 6890 气相色谱仪, 配电子捕获检测器(μ -ECD)和火焰光度检测器(FPD); HA180 型电子天平, 日本 AND 公司; FW135 型高速组织粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司; HH-S 数显恒温水浴锅, 金坛市金南仪器厂; KL512 型氮吹仪, 北京康林科技有限责任公司; RJM-28-10 型马弗炉, 沈阳市节能电炉厂; CS101-2ABN 型恒温烘箱, 重庆永生实验仪器厂; HH-B11.600 型恒温培养箱, 天津津北真空仪器厂。

1.1.4 试验试剂

以下试剂未特别指出, 均为分析纯: 乙腈; 丙酮(重蒸); 正己烷(重蒸); NaCl, 140℃烘烤4h; 无水Na₂SO₄, 620℃烘4h; 佛罗里硅土(60~100目), 650℃烘4h, 使用前140℃烘2h, 趁热加5%去离子水去活。

柑橘生产中常用的16种农药均为市售: 百菌清、三氯杀螨醇、腐霉利、敌敌畏、甲胺磷、氧化乐果、水胺硫磷、三唑磷、杀扑磷、乐果、毒死蜱、联苯菊酯、甲氧菊酯、氯氟氰菊酯(功夫)、氯氰菊酯、溴氰菊酯; 相应农药标准品购自天津环境保护研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 皮渣发酵方法

皮渣→加0.3%生石灰→灭菌(122±2℃, 20

min)→冷却→接种→培养(28~30℃,3 d)→取样

↑

菌种活化→扩大培养(28~30℃,48 h)

菌种的活化与扩培:斜面转接成活后经一级、二级三角瓶扩大培养,温度 28~30℃,pH 值自然,酵母和曲霉 2 次活化的培养时间均为 48 h。

试验设置 3 个处理:酵母发酵、曲霉发酵和 CK(不接菌种,其他条件同酵母和曲霉发酵),每个处理 5 kg 橙皮渣,接种量为 5%,纸封口(透气),28~30℃ 下避光培养 3 d。设置 4 个取样点,分别为发酵前(3 个处理前的混匀样品)以及发酵后的 CK、酵母和曲霉样品,每个取样点随机抽样 3 份,每份样品重复检测 2 次取平均值。

1.2.2 农药残留检测方法

样品前处理和农药残留检测方法以农业行业标准 NY/T 761-2004^[6]为基础,做适当修改。

1.2.2.1 样品提取

准确称取 25.0 g 橙皮渣(已粉碎),加入 50.0 mL 乙腈,180 r/min 振荡 30 min,滤纸过滤,滤液收集到装有 2~4 g NaCl 的 100 mL 具塞量筒中,收集滤液 40~50 mL,盖上塞子,剧烈振荡 1 min,室温下静置 30 min,使乙腈相与水相分层。

1.2.2.2 样品净化

从 100 mL 具塞量筒中吸取 10.00 mL 乙腈溶液,放入 50 mL 大试管中,于 75℃ 水浴加热,管内缓缓通入 N₂,浓缩近干,加入 2 mL 丙酮。该溶液供以下处理:

有机磷类农药处理方法:将该丙酮溶液完全转移至 5 mL 刻度小试管,用丙酮分 3 次冲洗大试管;并转移至小试管,最后准确定容至 5.0 mL,混匀,供色谱测定。

有机氯、菊酯类和腐霉利农药的处理方法:玻璃层析柱先加入 1 cm 高的无水 Na₂SO₄,再加入 2 g 去活佛罗里硅土,最后加入 1 cm 高的无水 Na₂SO₄,轻轻敲实。将佛罗里硅土柱用 10.0 mL 丙酮+正己烷(体积比 10:90)、10.0 mL 正己烷预淋洗条件化,当溶剂液面到达柱吸附层表面时,立即倒入上述丙酮溶液,用 50 mL 大试管(2)接收洗脱液,用 10 mL 丙酮+正己烷(体积比 10:90)洗刷大试管后淋洗佛罗里硅土柱,并重复一次。将盛有淋洗液的大试管(2)置于氮吹仪上,在水浴温度 50℃ 条件下,氮吹蒸发至小于 2 mL。溶液转移至 5 mL 刻度小试管,用正己烷定容,方法同有机磷类农药处理。

1.2.3 气谱检测条件

1.2.3.1 有机磷类农药

FPD 检测器温度 250℃;HP-1701 毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm);载气为 N₂(99.999%),流速 5 mL/min(恒流);H₂ 流量 75 mL/min;空气流量 100 mL/min;进样口温度 220℃,不分流进样 1 μL。程序升温:140℃ 保持 2 min,以 8℃/min 升至 200℃,保持 0.5 min,再以 15℃/min 升至 250℃,保持 5 min。

1.2.3.2 有机氯、菊酯类农药和腐霉利

μ-ECD 检测器温度 300℃;HP-1 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);载气为 N₂(99.999%),流速 0.7 mL/min(恒流);进样口温度 230℃,不分流进样:1 μL。程序升温:80℃ 保持 0.5 min,以 25℃/min 升至 200℃,保持 0.5 min,再以 20℃/min 升至 280℃,保持 15 min。

1.2.4 农药的加标回收率试验

采用外标法,在皮渣的空白样品上添加上述 16 种农药标准品,加标浓度梯度设置为 0.05 mg/kg、0.25 mg/kg 和 1.00 mg/kg。按 1.2.2 中方法进行样品前处理和检测,均重复 4 次。

1.2.5 浓缩因子

试验中使用浓缩因子(concentration factor, CF)作为评价皮渣失重情况的指标^[7]:

$$CF = \frac{\text{发酵前皮渣质量(kg)}}{\text{发酵后皮渣质量(kg)}}$$

1.2.6 数据的统计分析

使用 DPS 软件计算农药回收率数据的变异系数(CV),对不同发酵处理后皮渣中的农药残留含量进行多重比较(Duncan 新复极差法)。

2 结果与讨论

2.1 检测方法

利用 GC 建立皮渣中 16 种农药残留的检测方法,其检测限和回收率等技术参数见表 1。从表 1 可以看出:16 种农药的平均加标回收率在 70.9%~108.4%,变异系数在 1.4%~11.8%,其中大多数回收率集中在 80%~108%,只有氧化乐果在加标浓度为 1.00mg/kg 时的回收率低于 80%,可能是由于在萃取或分析过程中氧化乐果部分降解所致。总之,该方法的检测限、回收率及变异系数均能满足农药多残留的分析要求。

表 1 16种农药在橙皮渣基质中的加标回收率

加标浓度 /mg·kg ⁻¹	农药种类	平均回收率/%	CV/%	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	农药种类	平均回收率/%	CV/%	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
0.14		85.7	8.5			93.8	4.4	
0.25	百菌清	88.0	6.7	0.14	敌敌畏	88.4	3.7	1.70
1.00		92.1	7.7			85.9	5.6	
0.05		82.8	6.7			87.6	1.4	
0.25	三氯杀螨醇	83.9	5.8	0.10	甲胺磷	80.1	3.2	1.30
1.00		108.4	11.8			94.5	5.0	
0.05		86.0	2.9			86.0	5.5	
0.25	腐霉利	89.0	5.4	0.15	氧化乐果	90.7	3.8	2.10
1.00		92.8	7.2			70.9	3.1	
0.05		88.0	8.3			105.8	8.2	
0.25	甲氧菊酯	108.0	2.1	0.26	水胺硫磷	92.5	4.6	1.20
1.00		88.3	4.7			94.3	5.7	
0.05		90.2	6.4			103.2	10.1	
0.25	甲氧菊酯	89.4	6.8	0.25	三唑磷	86.9	5.6	2.20
1.00		91.2	8.3			91.1	5.2	
0.05		88.0	6.7			98.4	3.4	
0.25	功夫	90.0	6.9	0.10	杀扑磷	90.4	7.0	2.30
1.00		87.3	10.0			81.8	4.3	
0.05		86.8	7.8			98.1	2.3	
0.25	氟氰菊酯	90.2	8.1	0.13	乐果	100.3	6.9	1.50
1.00		87.8	8.4			88.2	2.8	
0.05		90.1	11.0			96.9	2.2	
0.25	溴氰菊酯	82.4	9.3	0.21	毒死蜱	89.0	4.2	1.80
1.00		88.5	6.9			87.9	7.4	

2.2 发酵后各处理样品的失重

发酵后各处理样品的浓缩因子如表 2 所示,酵母发酵处理的 CF 值为 1.131,高于曲霉处理的 1.073 和 CK 的 1.042。这说明酵母处理的失重较大,另一方面也说明其发酵速率高于曲霉,相应的代谢物以及代谢热的产生速率也要高于曲霉发酵。因此,发酵后皮渣中的农药残留含量需通过浓缩因子折算,再进行比较。

表 2 发酵后各处理样品的浓缩因子

	发酵前	CK	酵母	曲霉
样品质量/kg	5.000	4.800	4.420	4.660
CF		1.042	1.131	1.073

2.3 发酵对百菌清、三氯杀螨醇和腐霉利残留降解率的影响

图 1 显示的是 CK、酵母和曲霉发酵 3 种处理的橙皮渣中,百菌清、三氯杀螨醇和腐霉利残留的降解率。其中经酵母和曲霉发酵处理的百菌清残留降解率分别达到了 96.47% 和 92.07%,而 CK 中百菌清残留的降解率为 42.71%,从表 3 的统计分析可以看出,2 种发酵处理与 CK 的差异显著。但是,3 种处理中三氯杀螨醇(23.54%、23.34% 和 23.98%)和腐霉

利(12.52%、19.98% 和 20.62%)残留的含量变化不大,各处理之间没有显著性差异。

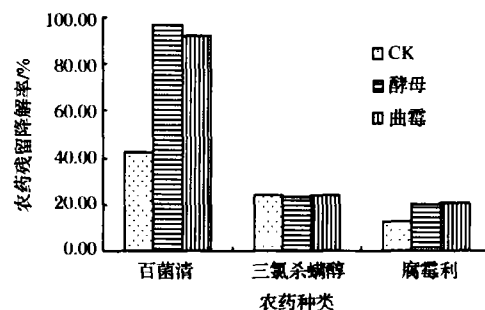


图 1 不同发酵处理对皮渣中百菌清、三氯杀螨醇和腐霉利残留降解率的影响

2.4 发酵对有机磷类农药残留降解率的影响

CK、酵母和曲霉发酵 3 种处理的皮渣中,8 种有机磷农药残留的降解率和统计分析如图 2 和表 3 所示。其中,敌敌畏残留含量的变化最为显著,敌敌畏在发酵前的起始含量为 0.704 mg/kg,经酵母发酵后其含量降到了检测限以下,降解率达到了 100%,而曲霉发酵处理的降解率也有 72.87%,与 CK 的 52.10% 相比差异均显著。并且,酵母发酵对敌敌畏

的降解率显著高于曲霉处理。

从图2可以看出,3种处理的皮渣中甲胺磷、水胺硫磷、杀扑磷和毒死蜱残留含量的变化趋势较为相近,2种发酵过程对上述4种有机磷农药残留的降解率均显著高于CK,其中酵母发酵处理对4种农药的降解率(58.13%、44.27%、41.90%和62.28%)显著高于曲霉发酵处理(35.35%、32.34%、27.95%和34.39%)。

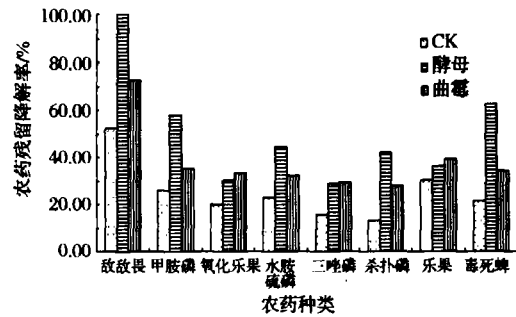


图2 不同发酵处理对皮渣中8种有机磷类农药残留降解率的影响

表3 发酵前和发酵后各处理样品中的农药残留含量 mg/kg

农药种类	发酵前	CK		酵母		曲霉	
		发酵后	折算后 ¹⁾	发酵后	折算后 ¹⁾	发酵后	折算后 ¹⁾
百菌清	2.624±0.148	1.566	1.503±0.128 ^a	0.105	0.093±0.016 ^b	0.223	0.208±0.028 ^b
三氯杀螨醇	1.959±0.183	1.560	1.498±0.158 ^a	1.699	1.502±0.188 ^a	1.598	1.489±0.218 ^a
腐霉利	6.716±0.196	6.120	5.875±0.506 ^a	6.079	5.374±0.447 ^a	5.720	5.331±0.422 ^a
联苯菊酯	2.310±0.170	1.898	1.822±0.141 ^a	1.870	1.653±0.316 ^a	1.836	1.711±0.275 ^a
甲氰菊酯	5.571±0.299	4.145	3.979±0.216 ^a	4.162	3.679±0.092 ^a	3.632	3.385±0.439 ^a
功夫	2.879±0.272	2.264	2.174±0.192 ^a	2.381	2.105±0.255 ^a	2.178	2.030±0.195 ^a
氯氰菊酯	4.695±0.328	3.945	3.787±0.332 ^a	4.055	3.585±0.455 ^a	3.872	3.608±0.262 ^a
溴氰菊酯	3.611±0.239	2.751	2.641±0.200 ^a	2.818	2.491±0.281 ^a	2.539	2.367±0.304 ^a
敌敌畏	0.704±0.028	0.351	0.337±0.031 ^a	0	0 ^c	0.205	0.191±0.007 ^b
甲胺磷	4.261±0.243	3.298	3.166±0.107 ^a	2.018	1.784±0.460 ^c	2.956	2.755±0.051 ^b
氧化乐果	6.460±0.241	5.373	5.158±0.191 ^a	5.089	4.499±0.523 ^{ab}	4.624	4.310±0.221 ^b
水胺硫磷	6.804±0.391	5.474	5.255±0.081 ^a	4.289	3.791±0.105 ^c	4.939	4.603±0.127 ^b
三唑磷	7.811±0.328	6.877	6.602±0.173 ^a	6.283	5.554±0.270 ^b	5.944	5.540±0.281 ^b
杀扑磷	7.775±0.323	7.045	6.764±0.071 ^a	5.111	4.518±0.265 ^c	6.011	5.602±0.242 ^b
乐果	4.815±0.194	3.495	3.356±0.175 ^a	3.487	3.082±0.113 ^b	3.144	2.930±0.055 ^b
毒死蜱	5.706±0.213	4.667	4.481±0.084 ^a	2.435	2.153±0.172 ^c	4.017	3.744±0.222 ^b

注:1)表示发酵后各处理中农药残留含量与CF的比值。数据上标a、b、c表示折算后的农药残留含量在CK、酵母和曲霉处理间的多重比较结果, $P<0.05$;下文中农药残留降解率的多重比较结果与其一致。

另外,酵母和曲霉发酵皮渣中三唑磷(28.90%和29.08%)和乐果(35.99%和39.15%)残留的降解率显著高于CK(15.48%和30.32%),但酵母和曲霉处理之间并没有显著性差异。对氧化乐果残留来说,曲霉处理(33.28%)与CK存在显著性差异,差值为13.14%,而酵母处理的降解率(30.36%)与CK(20.14%)相比没有显著差异,且2种发酵处理之间差异不显著,这可能与取样误差有关。

2.5 发酵对菊酯类农药残留含量的影响

图3的数据对比显示,发酵过程对橙皮渣中菊酯类农药残留降解率的影响并不是很大。其中曲霉处理的甲氰菊酯残留降解率最高,为39.24%,与CK和酵母处理的差值分别为10.67%和5.27%;但表3的统计结果显示,3个处理的甲氰菊酯残留降解率差异不显著,这可能与农残检测的取样误差有关。另外,其他4种菊酯类农药残留降解率在CK、酵母和曲霉发酵处理间的差异也不显著。

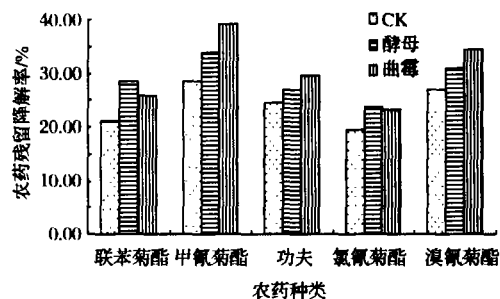


图3 不同发酵处理对皮渣中5种菊酯类农药残留降解率的影响

3 讨论

(1)本研究表明,酵母和曲霉发酵处理对橘皮渣中百菌清和敌敌畏残留含量的影响最为显著,降解率在70.89%~100%。其中,2种发酵处理对百菌清残留的降解率均在92%以上,与CK相比降解效果十分显著。这可能是因为:百菌清作为一种杀菌剂,该浓度下会因作用于微生物而大量消耗^[8];另一方面,

百菌清自身易降解^[9],其在CK中的降解率达到了42.71%。但值得注意的是,发酵对另一种杀菌剂腐霉利残留含量的影响并不显著,是否因菌种的特异性而造成的差异还需深入分析和研究。敌敌畏易降解、挥发^[10],在CK中52.10%的降解率是16种农药中最高,并且其在酵母处理中的降解率高达100%,曲霉处理也有72.87%。

(2)酵母和曲霉发酵处理对橙皮渣中有机磷农药残留的降解率,要高于菊酯类农药、三氯杀螨醇和腐霉利。统计分析显示,除氧化乐果外,酵母和曲霉发酵对橙皮渣中甲胺磷、水胺硫磷、杀扑磷、毒死蜱、三唑磷和乐果残留的降解效果极显著,而发酵处理中的菊酯类农药、三氯杀螨醇和腐霉利残留降解率与CK相比无显著性差异。一般来说,有机磷类农药相对不稳定、易降解,农药自身稳定性的差异可能是造成有机磷农药残留降解率高于菊酯类农药的最主要原因。

(3)本试验中,酵母发酵处理对橘皮渣中农药残留降解的总体效果好于曲霉处理。试验中,酵母的发酵速率快于曲霉,其代谢过程尤其是放热造成橙皮渣中的小环境温度的差异,可能是造成酵母处理中敌敌畏、甲胺磷、水胺硫磷、杀扑磷和毒死蜱残留降解率高于曲霉的原因。很多研究证实,特种微生物可以有效地降解部分有机磷、有机氯和菊酯类农药残留^[11~13],但本试验中的农药残留是否为热带假丝酵母1254或宇佐美曲霉自身代谢所利用,以及是否存在代谢差异,还需进一步研究证实。

参 考 文 献

1 周 炼,王日葵,郭 莉,等.甜橙皮渣发酵蛋白饲料的

- 研制[J].食品与发酵工业,2005,31(5):51~54
- 2 毛雪飞,焦必宁,钱永忠,等.加工过程对水果及其制品中农药残留的影响[J].核农学报,2008,22(1):71~76
- 3 Gunther F A, Carman G E, Blinn R C, et al. Persistence of residues of Guthion on and in mature lemons and oranges and in laboratory processed citrus "pulp" cattle feed [J]. Agricultural and Food Chemistry, 1963, 11(5):424~427
- 4 Cabras P, Angioni A. Pesticide Residues in grapes, wine, and their processing products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(4):3 023~3 026
- 5 刘云焕,陈东海.微生物降解有机磷农药的研究进展[J].北方环境,2005,30(1):22~24
- 6 NY/T 761-2004“蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药的多残留检测方法”
- 7 Lentza-Rizos C, Avramides E J, Kokkinaki K. Residues of Azoxystrobin from Grapes to Raisins[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(1):138~141
- 8 冯 波,单 敏,方 华,等.百菌清对土壤微生物数量和酶活性的影响[J].农业环境科学学报,2006,25(3):674~677
- 9 王会利,陈长龙,胡继业,等.百菌清和福美双在蘑菇上的残留研究[J].农药学报,2006,8(3):283~287
- 10 郭建辉,陈丽萍,施通华.敌敌畏在3种豆类蔬菜及其土壤中残留降解研究[J].亚热带植物科学,2006,35(1):20~21
- 11 钟 宁,曾清如,姜洁凌,等.有机磷农药的降解及其研究进展[J].现代农药,2005,4(6):1~6
- 12 庞金钊,王丽坤,刘文芝,等.有机氯农药降解菌的特性研究[J].生物技术,2006,16(1):70~72
- 13 王兆守,林 淦,李秀仙.拟除虫菊酯降解菌的分离、筛选及鉴定[J].福建农林大学学报(自然科学版),2003,32(2):176~180

Effects of Fermentation on Pesticide Residues in Sweet Orange Peel

Mao Xuefei^{1,2}, Jiao Bining², Qian Yongzhong¹,

Zhao Qiyang², Fu Chenmei², Sun Zhigao²

1(Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agri-Products, CAAS, Beijing 100081, China)

2(Citrus Research Institute, CAAS, Chongqing 400712, China)

ABSTRACT The effects of *Candida tropicalis* and *Aspergillus usamii* fermentation on pesticide residues in sweet orange peel were investigated in this paper. Among the 16 pesticide residues, the reduction rates of chlorothalonil and dichlorvos residues in these peels were the highest by two fermentation courses, and their values ranged from 72.87% to 100%; on the other hand, the reduction rates (27.95%~62.28%) of organophosphorus pesticide residues without omethoate in the two fermenting courses were generally higher than those of pyrethroid, dicofol and procymidone pesticides, as well as significantly higher than CK; furthermore, the effects of *Candida tropicalis* on reducing pesticide residues in the fermented peels were generally superior to the *Aspergillus usamii* treatment.

Key words fermentation, sweet orange, peel feed, pesticide residues