

有机酸盐在青贮乳酸发酵中的抑菌效果研究

李晓红, 罗红霞*, 句荣辉, 杨新建, 潘妍, 贾红亮, 林少华

(北京农业职业学院, 北京 102442)

摘要: 采用正交法测定了4种有机酸盐不同复配比分别对青贮饲料发酵时3种常见有害菌的抑制作用。结果表明, 脱氢醋酸钠浓度为0.03%, 山梨酸钾浓度为0.06%, 双乙酸钠浓度为0.12%, 苯甲酸钠浓度为0.12%的复配组合对大肠杆菌生长的抑制效果最好; 脱氢醋酸钠浓度为0.12%, 山梨酸钾浓度为0.03%, 双乙酸钠浓度为0.06%, 苯甲酸钠浓度为0.06%的复配组合对青霉菌生长的抑制效果最好; 脱氢醋酸钠浓度为0.06%, 山梨酸钾浓度为0.03%, 双乙酸钠浓度为0.12%的复配组合对酵母菌的生长的抑制效果最好。

关键词: 青贮; 双乙酸钠; 脱氢醋酸钠; 山梨酸钾; 苯甲酸钠

中图分类号: S816.71

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2018)03-0416-06

Antibacterial effects of different organic acid salt combinations

LI Xiaohong, LUO Hongxia, JU Ronghui, YANG Xinjian, PAN Yan, JIA Hongliang, LIN Shaohua

(Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442)

Abstract: The antibacterial effects of different organic acid salt combinations were investigated by means of orthogonal experiment. When the concentration of sodium dehydroacetate, potassium sorbate, sodium diacetate and sodium benzoate were 0.03%, 0.06%, 0.12% and 0.12%, respectively, the combination showed the best effect on inhibiting the growth of *Escherichia coli*. The combination of 0.12% sodium dehydroacetate, 0.03% potassium sorbate, 0.06% sodium diacetate and 0.06% sodium benzoate showed the best effect on inhibiting the growth of penicillium. The combination of 0.06% sodium dehydroacetate, 0.03% potassium sorbate and 0.12% sodium diacetate showed the best effect on inhibiting the growth of *Saccharomyces*.

Key words: silage; sodium diacetate; sodium dehydroacetate; potassium sorbate; sodium benzoate

青贮饲料是以全株玉米和牧草等为原料, 经切碎、压实密封装入青贮窖内, 在厌氧条件下利用其表面自然附着的乳酸菌发酵制成的可长期保存的饲料^[1]。青贮饲料在保持了青绿饲料的大部分营养成分的同时也具有保存时间长、适口性好等优点, 很好地解决了冬春季饲料的短缺问题。青贮饲料实际上是一个很复杂的微生物共生体系^[2], 乳酸菌是其发酵过程中起主要作用的微生物。然而青贮植物原料表面附着许多细菌和真菌对青贮发酵是有害的, 如大肠杆菌可导致青贮饲料异常发酵而变质; 一旦接触氧气, 霉菌和酵母菌便会加速青贮饲料的腐败; 其他腐败菌大多会消耗青贮饲料大量营养物质, 并

产生臭味和苦味^[3]。为确保乳酸菌群在发酵过程中处于优势地位以提高青贮发酵的品质和成功率, 通常要加入青贮添加剂^[4-5]。

化学类添加剂可迅速降低青贮饲料的 pH 值、抑制有害菌的生长繁殖, 已成为青贮发酵中最为常用的添加剂。然而, 因有机酸具有刺激性的气味及使用不当可能会引起严重的烧伤, 故更安全的有机酸盐被提议作为替代的青贮添加剂^[6]。某些有机酸盐(如苯甲酸钠、山梨酸钾、丙酸钙、双乙酸钠和脱氢乙酸钠等)应用于青贮发酵的效果已被研究证实^[7-11]。但若仅使用某种单一的化学抑菌剂往往会有添加量较大、微生物本身可能对该种防腐剂产生

收稿日期: 2017-11-05

基金项目: 北京市农委项目(20160202-14), 北京农业职业学院科技研发推广项目(XY-YT-16-44), 北京农业职业学院技术研发与示范推广基金(XY-YF-17-10)和北京农业职业学院学生科技实践项目(XY-XK-18-15)共同资助。

作者简介: 李晓红, 博士, 讲师。E-mail: lixiaohongXHL@163.com

* 通信作者: 罗红霞, 博士, 教授。E-mail: hongxiajun@163.com

适应性^[12]等问题。基于此, 本试验选用抑菌效果较好的 4 种常用有机酸盐进行复配, 研究其对青贮发酵有害菌的抑制效果, 为其应用于青贮饲料生产提供参考。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

1.1.1 药品 脱氢醋酸钠、山梨酸钾、双乙酸钠和苯甲酸钠购自上海源叶生物科技有限公司。

1.1.2 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基和 PDA 培养基购自北京陆桥技术有限公司。

1.1.3 菌种 大肠杆菌、青霉菌和酵母菌由本实验室从全株玉米秸秆青贮饲料中分离、鉴定和保存。

1.2 主要仪器与设备

恒温培养箱 DHG-9053A 型(上海一恒科技有限公司), 高压灭菌锅 LDZF-30KB-II 型(上海申安医疗器械厂), 超净操作台 SW-CJ-1F 型(苏净安泰空气技术有限公司), 内径(6.0±0.1) mm, 外径(7.8±0.1) mm, 高(10.0±0.1) mm 的牛津杯等。

1.3 试验方法

1.3.1 各种有机酸盐溶液的制备 分别将脱氢醋酸钠、山梨酸钾、双乙酸钠和苯甲酸钠制成 0.03%、0.06% 和 0.12% 的溶液, 设计正交试验。

1.3.2 菌悬液的制备 (1) 细菌菌液的制备。将待试细菌菌种分别用接种环在平板接一环于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 于 37℃ 培养 24 h 后用无菌水制成含菌数约为 1×10^6 cfu·mL⁻¹ 的菌悬液放入 4℃ 冰箱备用。

(2) 真菌菌液的制备。将待试真菌菌种分别用接种环在平板接一环于真菌液体培养基中, 于 30℃ 培养 48 h 后用无菌水制成含菌数约为 1×10^6 cfu·mL⁻¹ 的菌悬液放入 4℃ 冰箱备用。

1.3.3 抑菌圈的测定 将培养基灭菌(121℃, 15 min), 冷却至 60℃ 左右, 于超净工作台中向各无菌培养皿中倒入 12~15 mL, 自然冷却凝固。在凝固好的培养基平板上分别加入菌数约为 1×10^6 cfu·mL⁻¹ 的细菌和真菌菌悬液 0.2 mL 均匀涂布, 用镊子夹取无菌牛津杯轻放于含菌平皿中。取 0.2 mL 一定浓度的抑菌液于到牛津杯中, 分别于 (37±1)℃ 和 (30±1)℃ 下培养 3 d, 测量抑菌圈直径, 每次试验作 3 次重复, 取平均值。

1.3.4 最佳抑菌条件确定 为考察各种有机酸盐复配的抑菌作用效果, 本研究采用正交试验设计方案, 对脱氢醋酸钠、山梨酸钾、双乙酸钠和苯甲酸钠的最佳复配方案进行选择, 考察因素与水平见表 1。

表 1 优化复配有机酸盐正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test of combined organic acid salts optimization

水平 Level	脱氢醋酸钠/% Sodium dehydroacetate	山梨酸钾/% Potassium sorbate	双乙酸钠/% Sodium diacetate	苯甲酸钠/% Sodium benzoate
1	0	0	0	0
2	0.03	0.03	0.03	0.03
3	0.06	0.06	0.06	0.06
4	0.12	0.12	0.12	0.12

2 结果与分析

由表 2 可得, 双乙酸钠和苯甲酸钠的极差 R 分居第 1 和第 2 位, 是影响大肠杆菌生长的关键因素, 而山梨酸钾和脱氢醋酸钠对大肠杆菌生长的影响较小。由表 3 方差分析可得, 双乙酸钠和苯甲酸钠对大肠杆菌生长的抑制有显著性, 脱氢醋酸钠和山梨酸钾无显著性。综合考虑抑菌圈直径试验结果, 选择 $A_2B_3C_4D_4$ 为最佳配比, 即当双乙酸钠的浓度为 0.12%, 苯甲酸钠的浓度为 0.12%, 山梨酸钾的浓度为 0.06%, 脱氢醋酸钠的浓度为 0.03% 时复配的溶液对大肠杆菌的生长有明显的抑制作用。对 $A_2B_3C_4D_4$ 进行了 6 次验证试验, 其抑菌圈直径均大于 37.0 mm。

由表 4 可得, 对青霉菌生长抑制效果最显著的是苯甲酸钠, 其次是双乙酸钠和脱氢醋酸钠。由表 5 方差分析可得, 脱氢醋酸钠、山梨酸钾、双乙酸钠和苯甲酸钠 4 种有机酸盐对青霉菌抑菌圈的影响均具有显著性。结合抑菌圈直径试验结果, 选择 $A_4B_2C_3D_3$ 为最佳复配方式, 即脱氢醋酸钠的浓度为 0.12%, 山梨酸钾的浓度为 0.03%, 双乙酸钠的浓度为 0.06%, 苯甲酸钠的浓度为 0.06%。对 $A_4B_2C_3D_3$ 进行了 6 次验证试验, 其抑菌圈直径均大于 26.5 mm。

由表 6 可知, 就极差而言, 双乙酸钠对酵母菌生长的抑制作用最强、脱氢醋酸钠次之, 苯甲酸钠和山梨酸钾的抑制作用较小。由方差分析(表 7)可得, 脱氢醋酸钠和双乙酸钠对酵母菌的抑菌圈直径影响显著。综合考虑, 7 号组合 $A_3B_2C_4D_1$ 即 0.06%

脱氢醋酸钠、0.03%山梨酸钾和0.12%双乙酸钠的复配溶液对酵母菌生长的抑制效果最好。对 A₃B₂C₄D₁ 进行了6次验证试验,其抑菌圈直径均大于29.0 mm。

通过正交试验、极差和方差结果分析,得出各有机酸盐对3种青贮有害菌抑制效果的显著水平:双乙酸钠对3种有害菌生长的抑制均有显著性影响,脱氢醋酸钠对青霉菌和酵母菌的抑制作用显著,苯甲酸钠对大肠杆菌和青霉菌生长的抑制较为显著,山梨酸钾对青霉菌的抑制作用效果较为显著。对大肠杆菌抑菌效果较好的前3个复配组合为 A₂C₃C₄D₄ (抑菌圈直径为39.5 mm)、A₁B₄C₄D₃ (抑菌圈直径

为34.5 mm)、A₃B₁C₃D₄ (抑菌圈直径为33.5 mm);抑制青霉菌效果较好的是 A₄B₂C₃D₃ (抑菌圈直径为27.0 mm)、A₃B₁C₃D₄ (抑菌圈直径为26.0 mm)和 A₂B₃C₄D₄ (抑菌圈直径为25.5 mm);抑制酵母菌效果较好的是 A₃B₂C₄D₁ (抑菌圈直径为30.5 mm)和 A₄B₂C₃D₃ (抑菌圈直径为27.5 mm)、A₂B₃C₄D₄ (抑菌圈直径为25.5 mm)。根据各有机酸盐对每个有害菌生长抑制的显著性的不同,综合考虑成本及效果,应选择 A₂B₃C₄D₄ 的复合有机酸盐配方。即脱氢醋酸钠浓度为0.03%,山梨酸钾浓度为0.06%,双乙酸钠浓度为0.12%,苯甲酸钠浓度为0.12%。

表2 不同浓度有机酸盐对大肠杆菌生长影响的正交试验结果

Table 2 Orthogonal test result of the inhibitory effect of different concentrations of organic acid salts to *Escherichia coli*

试验号 Test number	A	B	C	D	抑菌圈直径/mm Inhibitory zone diameter
1	1	1	1	1	6.0
2	3	3	1	3	20.0
3	4	4	1	4	28.5
4	2	2	1	2	8.5
5	2	4	3	1	19.5
6	4	3	2	1	25.0
7	3	2	4	1	30.0
8	1	4	4	3	34.5
9	4	1	4	2	30.0
10	1	3	3	2	31.0
11	2	3	4	4	39.5
12	2	1	2	3	30.0
13	3	1	3	4	33.5
14	3	4	2	2	32.0
15	4	2	3	3	29.5
16	1	2	2	4	31.0
K ₁	25.625	24.875	15.750	20.125	
K ₂	24.375	24.750	29.500	25.375	
K ₃	28.875	28.875	28.375	28.500	
K ₄	28.250	28.625	33.500	33.125	
R	4.500	4.125	17.750	13.000	

注:表中A、B、C、D分别代表脱氢醋酸钠、山梨酸钾、双乙酸钠和苯甲酸钠,表4和表6同。

Note: A, B, C and D in the table represent sodium dehydroacetate, potassium sorbate, sodium diacetate and sodium benzoate, respectively, as well as table 4 and 6.

表3 不同浓度有机酸盐对大肠杆菌生长影响的方差分析

Table 3 Variance analysis of the inhibitory effect of different concentration of organic acid salts to *Escherichia coli*

有机酸盐 Organic acid salt	偏差平方和 SS	自由度 DF	F比 F ratio	F临界值 F critical value	显著性 Significance
脱氢醋酸钠 Sodium dehydroacetate	54.672	3	0.956	5.390	
山梨酸钾 Potassium sorbate	62.172	3	1.087	5.390	
双乙酸钠 Sodium diacetate	707.074	3	12.367	5.390	显著* Significant*
苯甲酸钠 Sodium benzoate	357.922	3	6.260	5.390	显著* Significant*

表 4 不同浓度有机酸盐对青霉菌生长影响的正交试验结果

Table 4 Orthogonal test result of the inhibitory effect of different concentrations of organic acid salts to *Penicillium*

试验号 Test number	A	B	C	D	抑菌圈直径/mm Inhibitory zone diameter
1	1	1	1	1	6.0
2	3	3	1	3	20.0
3	4	4	1	4	20.5
4	2	2	1	2	18.0
5	2	4	3	1	23.0
6	4	3	2	1	24.0
7	3	2	4	1	20.0
8	1	4	4	3	15.5
9	4	1	4	2	10.5
10	1	3	3	2	13.0
11	2	3	4	4	25.5
12	2	1	2	3	23.5
13	3	1	3	4	26.0
14	3	4	2	2	23.5
15	4	2	3	3	27.0
16	1	2	2	4	25.0
K_1	14.875	16.500	16.125	18.250	
K_2	22.500	22.500	24.000	16.250	
K_3	22.375	20.675	22.250	21.500	
K_4	20.500	20.625	17.625	24.250	
R	7.625	6.000	7.875	8.000	

表 5 不同浓度有机酸盐对青霉菌生长影响的方差分析

Table 5 Variance analysis of the inhibitory effect of different concentrations of organic acid salts to *Penicillium*

有机酸盐 Organic acid salt	偏差平方和 SS	自由度 DF	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significance
脱氢醋酸钠 Sodium dehydroacetate	153.563	3	22.540	5.390	显著* Significant*
山梨酸钾 Potassium sorbate	77.063	3	11.311	5.390	显著* Significant*
双乙酸钠 Sodium diacetate	162.313	3	23.824	5.390	显著* Significant*
苯甲酸钠 Sodium benzoate	149.688	3	21.971	5.390	显著* Significant*

3 讨论

本试验对几种常用防腐剂进行复配,研究了不同配比的有机酸盐对青贮饲料发酵过程中3种有害菌的(大肠杆菌、青霉菌和酵母菌)的抑制效应。大肠杆菌能与乳酸菌竞争生长,同时物质代谢能力较强,可使青贮饲料变质,是青贮过程中的有害微生物^[2]。霉菌通常存在于青贮饲料的表层和边缘等与空气接触的部分,能分解糖分和乳酸,而且部分产生毒素,是导致青贮饲料好气性变质的主要微生物。青霉菌是在空气、土壤中广泛存在的主要产毒真菌之一,可能存在于玉米青贮饲料中^[13],可产生青霉酸、桔青霉素等,动物摄入后会对机体造成危

害。研究认为酵母菌的强烈活动对青贮发酵是不利的。它与乳酸菌争夺糖分,并产生乙醇等不利于青贮饲料保存的物质;在取用过程中酵母菌与氧气接触后,可分解有机酸,使pH升高,导致霉菌的生长繁殖,从而引起青贮饲料的二次发酵,青贮品质下降,因此也视为有害菌^[14]。研究表明,脱氢醋酸钠的浓度为0.03%,山梨酸钾的浓度为0.06%,双乙酸钠的浓度为0.12%,苯甲酸钠的浓度为0.12%的复配组合对大肠杆菌生长的抑制效果最好;脱氢醋酸钠的浓度为0.12%,山梨酸钾的浓度为0.03%,双乙酸钠的浓度为0.06%,苯甲酸钠的浓度为0.06%的复配组合对青霉菌生长的抑制效果最好;脱氢醋酸钠的浓度为0.06%,山梨酸钾的浓度为0.03%,

双乙酸钠的浓度为 0.12% 的复配组合对酵母菌生长的抑制效果最好。

复配的有机酸盐对有害微生物的抑制效果往往比单一有机酸盐更理想,且能减少各有机酸盐的添加量。综合考虑各方面因素,本试验确定了以双

乙酸钠为主、其余成分协作的添加剂配方。此外,使用复配有机酸盐防腐剂既能减少单一有机酸盐的用量、提高发酵成功率、降低化学防腐剂对动物的危害,又能减少资金投入、降低生产成本,对青贮饲料的发酵生产有一定的指导意义。

表 6 不同浓度有机酸盐对酵母菌生长影响的正交试验结果

Table 6 Orthogonal test result of the inhibitory effect of different concentrations of organic acid salts to *Saccharomyces*

试验号 Test number	A	B	C	D	抑菌圈直径/mm Inhibitory zone diameter
1	1	1	1	1	6.0
2	3	3	1	3	14.0
3	4	4	1	4	24.5
4	2	2	1	2	15.5
5	2	4	3	1	16.5
6	4	3	2	1	11.5
7	3	2	4	1	30.5
8	1	4	4	3	16.5
9	4	1	4	2	16.5
10	1	3	3	2	9.5
11	2	3	4	4	25.5
12	2	1	2	3	6.1
13	3	1	3	4	20.0
14	3	4	2	2	6.2
15	4	2	3	3	27.5
16	1	2	2	4	6.2
K_1	9.550	12.125	15.000	16.125	
K_2	15.525	19.550	7.500	11.550	
K_3	18.050	15.500	18.375	16.400	
K_4	20.000	15.925	22.250	19.050	
R	10.450	7.400	14.750	7.500	

表 7 不同浓度有机酸盐对酵母菌生长影响的方差分析

Table 7 Variance analysis of the inhibitory effect of different concentrations of organic acid salts to *Saccharomyces*

有机酸盐 Organic acid salt	偏差平方和 SS	自由度 DF	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significance
脱氢醋酸钠 Sodium dehydroacetate	247.357	3	7.471	5.390	显著* Significant*
山梨酸钾 Potassium sorbate	109.957	3	3.321	5.390	
双乙酸钠 Sodium diacetate	471.047	3	14.228	5.390	显著* Significant*
苯甲酸钠 Sodium benzoate	116.357	3	3.515	5.390	

4 结论

本研究通过 4 因素 4 水平的正交试验得出:脱氢醋酸钠 0.03%,山梨酸钾 0.06%,双乙酸钠 0.12%,苯甲酸钠 0.12% 的复配有机酸盐组合对大肠杆菌的抑菌效果显著优于其他组合,且对霉菌和酵母也表现出较强的抑制效果。因此添加复配有机酸盐溶液对减少青贮饲料发酵过程中有害微生物的数量,确

保乳酸菌群的优势地位有很大的积极作用,可以有效提高青贮发酵的成功率。

参考文献:

- [1] 傅彤. 微生物接种剂对玉米青贮饲料发酵进程及其品质的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [2] 张慧杰. 饲草青贮微生物菌群动态变化与乳酸菌的鉴定筛选[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [3] 李永凯. 西藏乳酸菌的分离筛选及对青贮饲料发酵品

- 质的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [4] 时建忠. 青贮饲料生产技术及青贮饲料添加剂的应用[N]. 中国畜牧报, 2002-06-23(011).
- [5] 张运涛. 生物性青贮添加剂的应用[J]. 中国饲料, 1995(3): 17-19.
- [6] WEN A Y, YUAN X J, WANG J, et al. Effects of four short-chain fatty acids or salts on dynamics of fermentation and microbial characteristics of alfalfa silage[J]. *Anim Feed Sci Tech*, 2017, 223: 141-148.
- [7] LINGVALL P, LÄTTEMÄE P. Influence of hexamine and sodium nitrite in combination with sodium benzoate and sodium propionate on fermentation and hygienic quality of wilted and long cut grass silage[J]. *J Sci Food Agr*, 1999, 79(2): 257-264.
- [8] KLEINSCHMIT D H, SCHMIDT R J, KUNG L. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage[J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88(6): 2130-2139.
- [9] HINGSTON A R, CHRISTENSEN D A. The effect of type of silo and formic acid preservation on the nutritive value of barley, wheat and oat silages for growing Hereford steers[J]. *Can J Anim Sci*, 1982, 62(1): 155-162.
- [10] 张新慧, 张永根, 赫英飞. 添加两种乙酸钠盐对玉米青贮品质及有氧稳定性的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(6): 1810-1815.
- [11] YUAN X J, WEN A Y, DESTA S T, et al. Effects of sodium diacetate on the fermentation profile, chemical composition and aerobic stability of alfalfa silage[J]. *Asian Austral J Anim*, 2017, 30(6): 804-810.
- [12] 李涛, 高伟. 利用正交法研究三种防腐剂对细菌的抑菌效应[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2007, 35(S1): 27-30.
- [13] 李春杰, 李长胜, 孙双. 玉米青贮 HACCP 技术与青霉菌污染防治[J]. 农业系统科学与综合研究, 2009, 25(3): 361-363.
- [14] 胡朝辉. 青贮饲料中天然微生物的分离与乳酸菌抑菌研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2016.