

乳酸菌接種對於銀合歡 (*Leucaena leucocephala*) 青貯發酵特性與含羞草鹼代謝影響之研究⁽¹⁾

朱明宏⁽²⁾⁽⁵⁾ 劉必謙⁽³⁾ Rajendra Adak⁽⁴⁾ 陳建德⁽⁴⁾

收件日期：115 年 1 月 30 日；接受日期：115 年 3 月 13 日

摘 要

銀合歡 (*Leucaena leucocephala*) 營養豐富且具良好適口性，適合作為芻料，但植體含有具毒性的含羞草鹼 (mimosine) 及其代謝物 3,4-dihydroxypyridine (3,4-DHP)，限制其在畜牧上的利用。青貯被視為最能兼具保存銀合歡營養與降低毒性之方法，但其發酵過程中乳酸、揮發性脂肪酸及毒性代謝物含量的變動仍未完全釐清。本研究以乳酸菌接種與否之兩種處理，比較銀合歡青貯之發酵特性、芻料化學組成、含羞草鹼及 3,4-DHP 含量在不同發酵時間 (0、7、14、21、30、46 及 74 天) 的變動情形。試驗結果顯示，銀合歡青貯前之乾物率為 36.1%，粗蛋白質含量 19.4%，含羞草鹼與 3,4-DHP 分別為 1.36 與 0.99%。青貯過程中，乳酸菌接種組顯著加速乳酸生成、有效抑制丙酸與丁酸產生，在青貯 30 天即達發酵穩定，早於對照組之 46 天。乳酸菌接種組之 pH 在青貯 46 天下降至約 5.2，其 Flieg 氏評分於第 14 天即達優良等級 (88.3)，均顯著優於對照組，顯示乳酸菌能加速銀合歡之良好發酵。在毒性物質降解方面，兩種處理之含羞草鹼在青貯前 7 天即下降 64.3%，並於 30 天後趨於穩定，又各時間點之含量在不同處理間無顯著差異。兩種處理之 3,4-DHP 均於 7 天內下降 20%，但乳酸菌接種組於後續各時間點之含量均顯著低於對照組，顯示乳酸菌有助於促進 3,4-DHP 降解。青貯 74 天後，乳酸菌接種組之粗蛋白質含量較高 (20.2%)，酸洗纖維含量較低 (37.8%)，且丁酸與 3,4-DHP 含量顯著低於對照組，整體青貯品質亦較佳。綜合以上結果顯示，青貯能有效降低銀合歡之含羞草鹼，添加乳酸菌雖未增加含羞草鹼代謝量，但能加速發酵穩定、維持營養價值並促進 3,4-DHP 降解，提升銀合歡青貯品質與餵飼動物安全性。

關鍵詞：乳酸菌、銀合歡、含羞草鹼、青貯品質。

緒 言

銀合歡 (*Leucaena leucocephala*) 是一種生長迅速、對生物與非生物性逆境均耐受性強的豆科植物，廣泛分佈於熱帶與亞熱帶國家 (Akingbade *et al.*, 2001; Honda and Borthakur, 2019)。銀合歡由於再生能力強且產量高，富含蛋白質、類胡蘿蔔素及礦物質，又動物適口性良好，雖然屬於中大型喬木，但若經常收穫，可維持叢生灌木型態，作為全年穩定供應的優質芻料 (Garcia *et al.*, 1996; Akingbade *et al.*, 2001)。然而，銀合歡雖然營養豐富，但其含有對動物具毒性的含羞草鹼 (mimosine) 與其代謝物 3,4- 雙羥基吡啶 (3,4-dihydroxypyridine, 3,4-DHP)、2,3- 雙羥基吡啶 (2,3-dihydroxypyridine, 2,3-DHP)，在食用不慎下會產生脫毛、食慾不振、體重下降、甲狀腺功能異常、胎兒畸形及不孕等毒害症狀 (Halliday *et al.*, 2013)，造成在飼養利用上受到部分限制。

銀合歡的含羞草鹼遍布植體所有部位，包含葉、莖、種子、花、根及根瘤，種子中的含量約占乾重 2.1 – 10.0%，葉片中的含量約占乾重 0.6 – 10.0%，幼嫩組織或器官中的含量顯著高於成熟老化者，其中生長快速的芽頂組織含量更可達乾重 12 – 20% (Yanuartono *et al.*, 2019; Honda and Borthakur, 2024)。此外，含羞草鹼的含量亦會因品種、栽培環境及氣候之不同而有所差異 (Honda and Borthakur, 2019)。為了利用銀合歡具有高營養價值的葉片、嫩莖及豆莢等部位，已開發許多降解含羞草鹼的方法以避免毒害。例如，將銀合歡葉片曝曬於陽光下 24 – 72 小時，

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2851 號。
(2) 農業部畜產試驗所南區分所。
(3) 國立岡山高級農工職業學校。
(4) 國立中興大學農藝學系。
(5) 通訊作者，E-mail: mmchu@mail.tlri.gov.tw。

可使含羞草鹼含量顯著降低 23 – 27% (Agbo *et al.*, 2017)；在濕度 70% 及 100°C 下加熱處理可顯著降低 50% 含羞草鹼含量 (Akbar and Gupta, 1985)；浸泡於 0.05 N 醋酸鈉 (Tawada *et al.*, 1986)、尿素或碳酸氫鈉 (Hossain *et al.*, 1991) 均能有效去除高達 80% 以上之羞草鹼含量。然而，陽光曝曬會造成銀合歡的羽狀複葉因乾燥碎裂而不易收集，高溫、熱水或化學溶液浸泡處理對於農民操作不易且成本高昂，又部分降解含羞草鹼之方式會顯著降低銀合歡之蛋白質與脂質等含量，不利於大規模生產作為芻料使用 (Agbo *et al.*, 2017; Yanuartono *et al.*, 2019)。

青貯是目前銀合歡作為芻料利用且可降低含羞草鹼危害的最可行方式，雖然銀合歡具有植體緩衝能力 (buffering capacity) 強及水溶性碳水化合物 (water soluble carbohydrates, WSC) 含量不足等不利於青貯發酵的特性，但可透過添加物的應用而製成品質良好之青貯 (Du *et al.*, 2023)。銀合歡葉片與 20% 米糠混合後青貯可使含羞草鹼含量減少 90% 以上；銀合歡嫩枝與葉片混合後分別添加蔗糖、蔗糖與乳酸菌進行青貯，青貯後兩者分別可使含羞草鹼含量減少 49 與 48%，除了降解含羞草鹼，這些添加物均使銀合歡青貯發酵後具有較高的乳酸含量，較低的乙酸與丁酸含量，青貯品質可達到良好等級 (Angthong *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014)。然而，青貯雖有益於銀合歡作為芻料，但過程中乳酸、揮發性脂肪酸、含羞草鹼及其毒性代謝物含量自發酵啟始至穩定期所需之時間及變化情形仍待釐清，用以確保發酵穩定及使用上之安全性。

銀合歡是國際自然保育聯盟 (International Union for Conservation of Nature, IUCN) 公告之世界百大嚴重危害生態的入侵物種，臺灣的原始植被也正遭受銀合歡入侵破壞。王等 (2012) 以銀合歡作為臺灣黑山羊之芻料，餵飼後的山羊肉具有低脂肪、低熱量及低 ω -6 脂肪酸 / ω -3 脂肪酸的特點，顯示除了伐除與造林，提供動物利用可成為銀合歡之移除方式並創造附加價值。為了增加銀合歡應用於芻料的效益並避免其毒害問題，本研究添加乳酸菌進行銀合歡青貯，探討乳酸菌接種與否對發酵過程中之揮發性脂肪酸、含羞草鹼與毒性代謝物含量的影響及其變動情形，作為銀合歡芻料化的參考。

材料與方法

I. 試驗材料

銀合歡試驗材料於 2024 年 4 月 8 日取自農業部畜產試驗所南區分所放牧區 (屏東縣恆春鎮)，採集時將整株銀合歡鋸下，選取直徑 5 mm 以下之軟嫩枝條及其所附帶之葉片、花、豆莢作為試驗材料 (花與豆莢各約占樣品 2 與 5%)，進行植體芻料化學組成分析及青貯試驗。

II. 植體芻料化學組成分析

不同處理分別於青貯前與青貯 74 天後進行取樣，取樣均為三重複，樣品經 60°C 烘乾至恆重後計算乾物率，烘乾後的樣品研磨成粉 (篩網孔徑 1 mm) 進行植體芻料化學組成分析，分析項目包含粗蛋白質 (crude protein, CP)、酸洗纖維 (acid detergent fiber, ADF) 及中洗纖維 (neutral detergent fiber, NDF) 含量。分析方法如下：CP 定量參照 AOAC (2019) 之方法，ADF 及 NDF 的測定參考 Vogel *et al.* (1999) 以 ANKOM²⁰⁰ 纖維分析儀 (ANKOM²⁰⁰ fiber analyzer, USA) 進行。

III. 青貯試驗

銀合歡細切至約 2 cm，材料均勻混合後取 1 kg 裝填於真空塑膠袋內，青貯試驗分為以下方式進行，對照組：青貯時無任何添加劑；接種組：青貯時添加商用乳酸菌劑 (*Lactobacillus plantarum* 與 *Lactobacillus casei*，接種量為 2×10^6 cfu/kg 材料鮮重)，對照與接種組均分別青貯 0、7、14、21、30、46 及 74 天，每種青貯時間與調製處理組合均為 3 重複，塑膠袋抽真空密封後於室溫下青貯 0、7、14、21、30、46 及 74 天後開封，採樣測定青貯發酵品質。

IV. 青貯品質測定

取 20 g 開封後之青貯樣品加蒸餾水 180 mL，打碎過濾後以酸鹼度計測定青貯酸鹼值。利用氣體層析儀依 Jones and Kay (1976) 的方法測定青貯之乙酸、丙酸、丁酸及乳酸含量。青貯品質以 Flieg 氏評分法表示，Flieg 氏評分法以青貯中乳酸、乙酸及丁酸各占所測定揮發性脂肪酸與乳酸總合之當量百分比，將三項數值依 Woolford (1984) 評分公式加總計算。

V. 含羞草鹼 (mimosine) 與 3,4- 雙羥基吡啶 (3,4-dihydroxypyridine, 3,4-DHP) 之萃取與測定

參考 Wu *et al.* (2012) 試驗方法，調整為以下步驟測定含羞草鹼與其代謝物 3,4-DHP 之含量。秤取測定銀合歡芻料化學組成之剩餘粉末 1 g，加入 20 mL 0.1N 鹽酸水溶液，靜置 1 分鐘後劇烈震盪 10 分鐘，避光靜置 24

小時，再從中取 1 mL 以 0.1N 鹽酸水溶液添加至 5 mL，經 0.22 μm 聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 過濾膜過濾，濾液以高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC) 搭配光二極體陣列式檢測器 (Photodiode array detector, PDA) 分析含羞草鹼與 3,4-DHP 含量。分析過程使用動相 0.1% (v/v) 磷酸水溶液：乙腈 (acetonitrile) = 90 : 10，分析管柱為 Agilent HC-C18 (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm)，管柱流速為 1.0 mL/min，測定標準品為純度 98% 之左旋含羞草鹼 (L-mimosine from Koa hoale seeds, CAS:10182-48-6, Sigma-Aldrich) 與純度 99% 之 3,4-DHP (CAS:10182-48-6, Combi-Blocks)，分別以波長 290 與 280 nm 之訊號測定含羞草鹼 (retention time: 5.60 min) 與 3,4-DHP (retention time: 6.48 min) 含量。

VI. 數據統計分析

試驗數據以 SAS 統計軟體 (Statistical Analysis System, SAS 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA) 進行變方分析 (analysis of variance, ANOVA)，如達顯著差異，各處理平均值再以最小顯著差異 (least significance difference, LSD) 進行檢定，比較各處理平均值之間是否達差異顯著。

結果與討論

I. 青貯前之芻料化學組成與含羞草鹼含量

銀合歡青貯前之乾物率與芻料化學組成如表 1，由於收穫時植株已具有部分豆莢，因此乾物率略高，為 36.1%，CP、ADF 及 NDF 含量分別為 19.4、36.1 及 58.0%。銀合歡之芻料化學組成會因植體部位、品種、植株成熟度及收穫季節等不同而有所差異，葉片含軟嫩枝條之 CP、ADF 及 NDF 含量分別為 10.0 – 30.1%、34.1 – 36.1% 及 32.0 – 42.0% (Garcia *et al.*, 1996)；成熟豆莢含種子之 CP、ADF 及 NDF 含量分別為 22.1、35.7 及 52.0% (Zapata-campos *et al.*, 2020)。Verdecia *et al.* (2020) 比較銀合歡刈割後經 60、120 及 180 天再生之芻料化學組成，植株成熟度隨著再生時間延長而增加，但 CP 含量由 31.8% 顯著降低至 25.5%，ADF 與 NDF 含量分別由 23.8 與 42.3% 顯著增加至 31.6 與 60.8%。本試驗之銀合歡由葉片、軟嫩枝條、豆莢及花所組成，CP 含量雖與前人研究相近但纖維含量略高，推測為收穫時銀合歡已開花並具部分豆莢，植株成熟度較高而導致纖維含量較高。

表 1. 銀合歡青貯前之乾物率、芻料化學組成、含羞草鹼及 3,4-DHP 含量 (n = 3)

Table 1. Dry matter, forage chemical composition, mimosine and 3,4-DHP content of *Leucaena leucocephala* before ensiling (n = 3)

DM [†]	CP	ADF	NDF	Mimosine	3,4-DHP
%	% of dry matter				
36.1 $\pm$ 0.1 [‡]	19.4 $\pm$ 0.1	36.1 $\pm$ 0.6	58.0 $\pm$ 1.3	1.36 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.07

[†] DM, dry matter; CP, crude protein; ADF, acid detergent fiber; NDF neutral detergent fiber.

[‡] Values are means $\pm$ standard error.

銀合歡青貯前之含羞草鹼與 3,4-DHP 含量分別為 1.36 與 0.99% (表 1)，含羞草鹼含量會因品種、植體部位、植株成熟度及環境氣候等不同而具差異。Honda *et al.* (2022) 比較 K636、KX2、KX3、KX4、KX5、KX7 等巨型銀合歡 (*L. leucocephala* subsp. *glabrata*) 品系之含羞草鹼含量彼此間具顯著差異，且與普通銀合歡 (*L. leucocephala* subsp. *leucocephala*) 之含量亦不相同，其中以 KX2 與 KX3 之含量較高，KX7 之含量最低。含羞草鹼含量在葉片約占乾重 0.6 – 10.0%，枝條約占乾重 0.15 – 2.2%，花約占乾重 1.2 – 2.7%，種子約占乾重 2.1 – 10.0%，不同部位的含羞草鹼含量均會隨著植株成熟度愈高而降低 (Yanuartono *et al.*, 2019; Honda and Borthakur, 2024)。本試驗所收穫的銀合歡雖以葉片及軟嫩枝條居多，但植株已開花且具部分豆莢，可能因植株部位組成、成熟度較高或品種因素而造成含羞草鹼含量較低。

II. 青貯過程發酵產物與含羞草鹼含量之變動情形

銀合歡青貯過程之發酵產物含量變動如圖 1，乳酸菌接種組與對照組青貯之乳酸含量分別在發酵 30、46 天內顯著增加，隨後兩者均漸趨穩定 (圖 1A)。在青貯 30 天內，不同檢測時間均以乳酸菌接種組之乳酸含量顯著高於對照組，其乳酸含量在青貯第 30 天可達 2.56%，對照組則在青貯第 46 天才達 2.66%。乳酸菌接種組與對照組青貯之乙酸、丙酸及丁酸含量均隨著發酵時間延長而顯著增加，兩種處理之乙酸含量均在青貯 46 天後漸趨穩

定 (圖 1B)；丙酸含量均在青貯 30 天後漸趨穩定 (圖 1C)；乳酸菌接種組之丁酸含量在青貯 30 天後達到穩定，對照組則在青貯 46 天後丁酸含量才穩定 (圖 1D)。

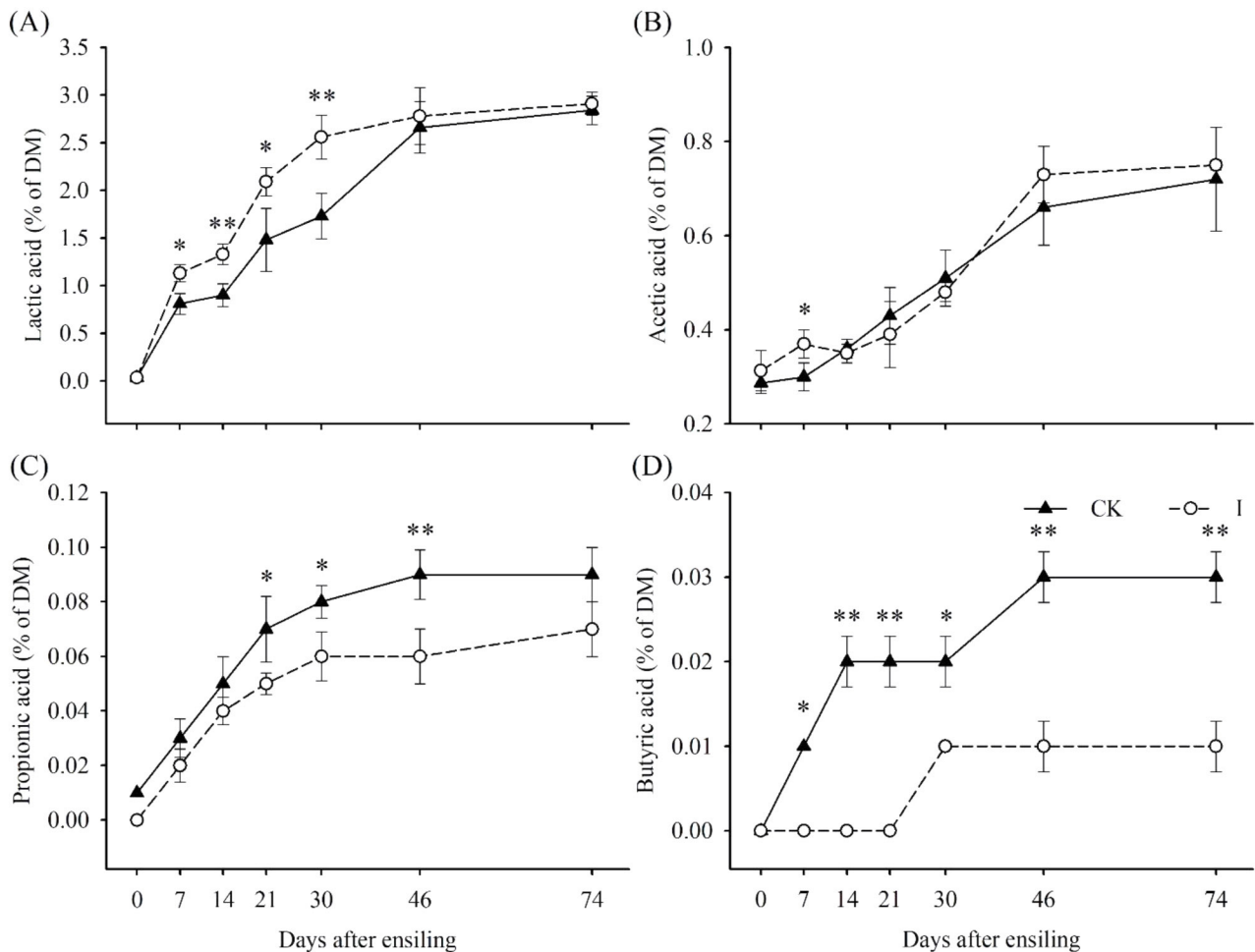


圖 1. 銀合歡青貯過程之 (A) 乳酸、(B) 乙酸、(C) 丙酸及 (D) 丁酸含量變化。(n = 3)

Fig. 1. Changes in (A) lactic acid, (B) acetic acid, (C) propionic acid, and (D) butyric acid content (% of DM) during ensiling of *Leucaena leucocephala*. CK, without inoculation; I, lactic acid bacteria inoculation. (n = 3)

Chen *et al.* (2014) 研究顯示，銀合歡嫩枝與葉片混合後分別添加蔗糖、乳酸菌、蔗糖與乳酸菌進行青貯，在青貯 7 天內，無添加之對照組與各添加處理組之乳酸、乙酸及丙酸含量均快速顯著上升，之後增幅放緩，丁酸含量則隨著青貯時間逐漸增加，此變動趨勢與本試驗相似。然而，各添加處理組之乳酸、乙酸、丙酸及丁酸含量均持續增加至青貯 60 天後才達到穩定，較本試驗之 46 天晚，可能與其參試銀合歡之乾物率 (29.3%) 低於本試驗 (36.1%) 有關，當豆科牧草含水率較高 (DM < 30%) 會導致發酵時間延長 (Kung *et al.*, 2018)，銀合歡葉片 (30.49% DM) 與 20% 米糠 (91.01% DM) 混合後青貯，在較高的乾物率 (37.07%) 下，經 21 天即可達發酵穩定 (Anghong *et al.*, 2007)。此外，本試驗青貯過程之乳酸含量在青貯 30 天內以乳酸菌接種組較高 (圖 1A)，乙酸含量在對照組與乳酸菌接種組之間無顯著差異 (圖 1B)，丙酸與丁酸含量則均以對照組較高 (圖 1C 及 1D)，相較於 Chen *et al.* (2014) 之銀合歡青貯過程，無添加對照組與乳酸菌添加組之乳酸、乙酸、丙酸及丁酸含量彼此間均無顯著差異，又其乳酸含量低於本試驗，乙酸、丙酸及丁酸含量均高於本試驗，應與其材料含水率高於本試驗有關，豆科牧草含水率較高 (DM < 30%) 會導致其青貯乳酸含量較低，乙酸、丙酸及丁酸含量較高 (Kung *et al.*, 2018)，此外，Chen *et al.* (2014) 所添加之乳酸菌為異質發酵 (heterofermentative) 菌株 (*Lactobacillus rhamnosus*)，亦會造成發酵後之乳酸生成量較低而乙酸生成量較高 (Li and Nishino, 2011; Borreani *et al.*, 2018)。

受到發酵產酸的影響，銀合歡兩種處理之青貯 pH 均在發酵過程的 46 天內顯著下降，隨後均達約 5.2 之穩定值 (圖 2A)。本試驗結果與 Chen *et al.* (2014) 不同，其不同處理之銀合歡青貯 pH 均在 3 天內下降顯著，青貯 15 天後，無添加對照組與乳酸菌添加組 pH 均達約 5.7 之穩定值，因其參試銀合歡之乾物率 (29.3%) 低於本試驗 (36.1%) 且其丁酸含量 (0.1 – 0.2%) 顯著高於本試驗 (< 0.03%)，在豆科青貯中，含水率較高 (DM < 30%) 之青貯

相對於含水率較低 ($DM > 40\%$) 之青貯具有較多可供代謝反應的水分，其 pH 下降速度會較含水率低者快，且含水率高者易因梭狀菌 (clostridia) 將乳酸轉化為丁酸，而使其 pH 較高 (Kung *et al.*, 2018)。

在青貯品質方面，乳酸菌接種組之 Flieg 氏評分在青貯第 14 天即可達 88.3 之優良等級，隨後漸趨穩定；對照組則在青貯第 30 天評分才達 85.3 之優良水準，至青貯 46 天後評分趨於穩定 (圖 2B)。Angthong *et al.* (2007) 將銀合歡葉片與 20% 米糠混合調整至較高乾物率 (37.07%) 後青貯，經 21 天發酵即可達理想之乳酸 / 乙酸 (3.43)、無丁酸生成及 94 分的優良青貯品質。由前人研究與本試驗青貯後之乳酸、揮發性脂肪酸含量及品質評分顯示 (圖 1 及圖 2)，銀合歡經調整乾物率至適當範圍或添加乳酸菌，可顯著促進青貯較快發酵生成乳酸，減少丙酸與丁酸生成而較早達到發酵穩定期。

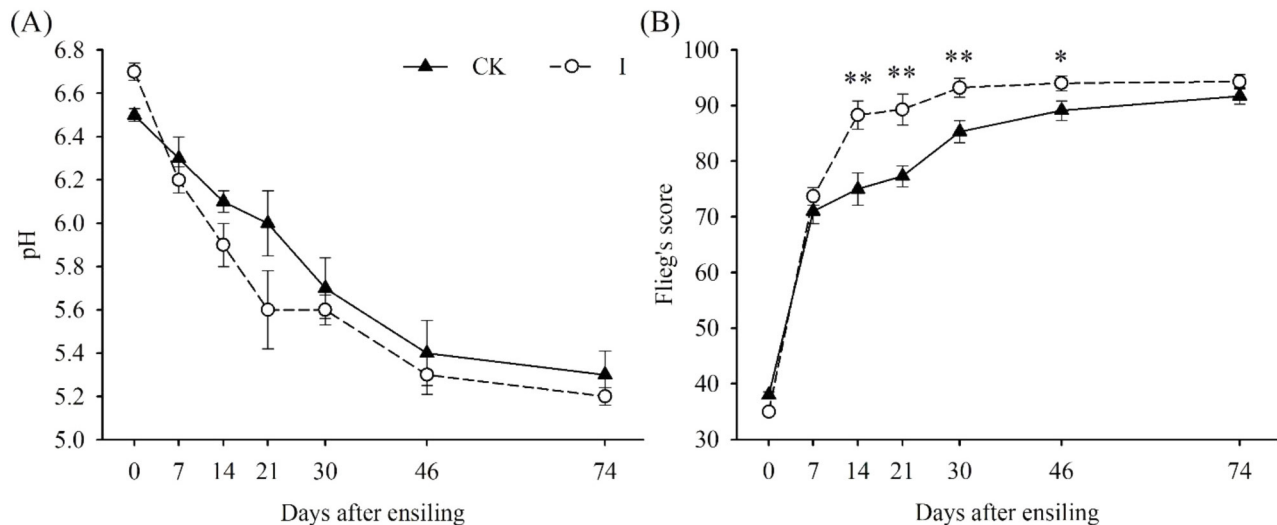


圖 2. 銀合歡青貯過程之 (A) pH 與 (B) Flieg 氏評分變化。(n = 3)

Fig. 2. Changes in (A) pH, and (B) Flieg's score during ensiling of *Leucaena leucocephala*. CK, without inoculation; I, lactic acid bacteria inoculation. (n = 3)

青貯可降解銀合歡之含羞草鹼與 3,4-DHP (圖 3)，在含羞草鹼含量方面 (圖 3A)，乳酸菌接種組與對照組在青貯過程之變動趨勢相近，又兩者在各青貯時間點之含量均無顯著差異，青貯 7 天內均由約 1.4% 顯著降低至約 0.5%，降解率達 64.3%，後續隨著發酵時間延長而緩慢降低，至青貯第 30 天後漸趨穩定。在 3,4-DHP 含量方面 (圖 3B)，兩種處理在青貯過程之變動趨勢相近，但各青貯時間點之含量不盡相同，發酵 7 天內均由約 1.0% 顯著降低至約 0.8%，降解率為 20.0%，但乳酸菌接種組在發酵 7 天後各青貯時間點之 3,4-DHP 含量均顯著低於對照組，又乳酸菌接種組與對照組之 3,4-DHP 含量在青貯第 74 天分別降低至 0.65 與 0.74%，降解率分別為 34 與 25%。由試驗結果顯示，青貯可顯著降低銀合歡之含羞草鹼與 3,4-DHP 含量，又乳酸菌之添加有助於較快且較大幅度降低 3,4-DHP 含量。

青貯是移除銀合歡植體內含羞草鹼並作為芻料利用最具效益的方式，Chen *et al.* (2014) 研究指出，銀合歡含羞草鹼在無添加與添加乳酸菌青貯之降解趨勢與幅度相似，經青貯 15 天，含羞草鹼含量均由 5.0% 降至約 4.0%，降解率約為 20%；添加蔗糖、蔗糖與乳酸菌之含羞草鹼降解趨勢與幅度相似，經青貯 15 天，含羞草鹼含量均由 5.0 降至 3.5%，降解率達 30%，降幅顯著高於無添加與添加乳酸菌之青貯，四種處理後續均隨著發酵時間延長而持續降低，至青貯 90 天時含羞草鹼含量分別降至 3.7、3.5、2.5 及 2.6%，分析不同添加處理之青貯發酵產物對含羞草鹼降解之影響，顯示降解與 pH 呈顯著負相關 ($P < 0.01$)，與乳酸、乙酸、丙酸與丁酸含量呈顯著正相關 ($P < 0.01$)，又 Chen *et al.* (2014) 對照組 (無任何添加) 與乳酸菌接種之銀合歡青貯 pH 均為 3.7，乳酸、乙酸、丙酸及丁酸含量分別為 1.2 與 1.2%、1.2 與 1.7%、0.6 與 0.7%、0.2 與 0.3%，本試驗之含羞草鹼降解趨勢及幅度與其研究不同 (圖 3A)，可能來自於青貯 pH 與發酵產物含量不同所致 (圖 1 及圖 2A)。

3,4-DHP 來自於銀合歡植體中的含羞草鹼酶 (mimosinase) 降解含羞草鹼，或含羞草鹼受到 *Synergistes jonesii*、*Streptococcus lutetiensis*、*Clostridium butyricum*、*Lactobacillus vitulinus* 及 *Butyrivibrio fibrisolvens* 等微生物降解而成，會因銀合歡受到破壞 (如細切、咀嚼)、生物或非生物性逆境等因素誘導含羞草鹼酶作用，以及具降解性微生物存在與否而影響其含量，又 3,4-DHP 亦可受微生物降解為無毒產物 (Derakhshani *et al.*, 2016; Honda and Borthakur, 2019; Honda and Borthakur, 2024)。綜合前人研究與本試驗結果 (表 3B) 顯示，3,4-DHP 在不同青貯條

件下之降解速率與程度有所差異，可能除了受到青貯 pH、乳酸及揮發性脂肪酸含量之影響外，銀合歡含水率與發酵過程微生物之組成亦是重要影響因子，進而影響青貯 pH 下降速率、發酵產酸種類與含量多寡、具降解能力之微生物或酶的活性。

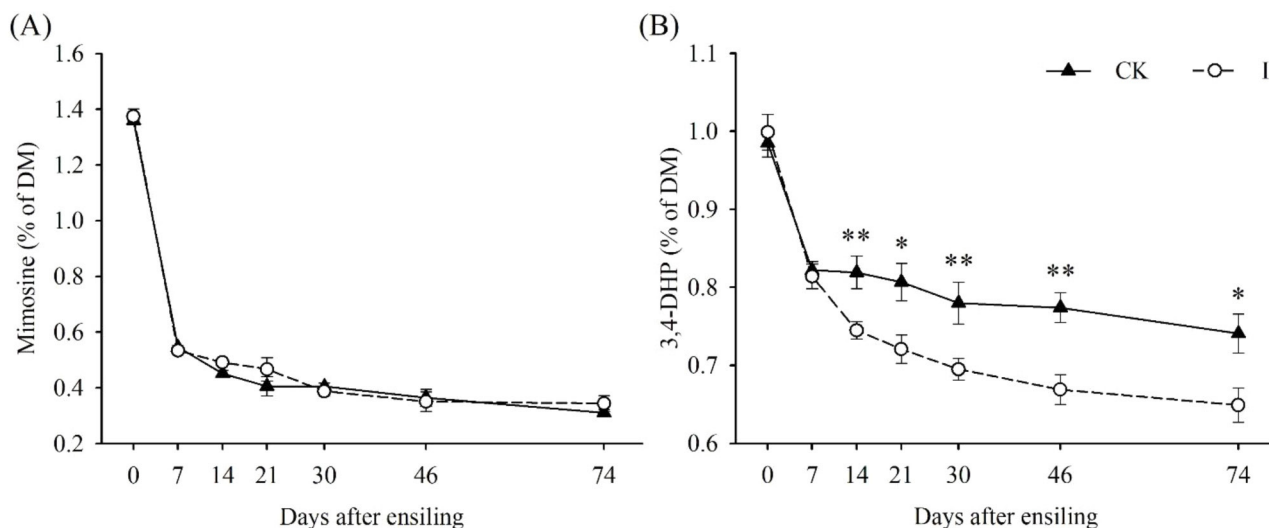


圖 3. 銀合歡青貯過程之 (A) 含羞草鹼與 (B) 3,4-DHP 含量變化。(n = 3)

Fig. 3. Changes in (A) mimosine, and (B) 3,4-DHP content (% of DM) during ensiling of *Leucaena leucocephala*. CK, without inoculation; I, lactic acid bacteria inoculation. (n = 3)

III. 青貯品質、青貯後之芻料化學組成與含羞草鹼含量

經過 74 天青貯，乳酸菌接種組與對照組之青貯發酵產物含量及品質如表 2。兩種青貯處理之 pH、乳酸、乙酸及丙酸含量均無顯著差異，僅對照組之丁酸顯著高於乳酸菌接種組，分別為 0.03% 與 0.01%。乳酸菌接種組之 Flieg 氏評分 (94.3) 顯著高於對照組 (91.7)，但兩者之青貯品質均達優良等級。銀合歡與桑樹、構樹及辣木等高營養價值之本植物具相同特性，因酸鹼緩衝能力強 (> 500 mEq/kg DM)、WSC 含量不足 (< 6% DM) 及附生之乳酸菌量有限 (< 10^5 cfu/g FM)，若植體乾物率未在適當範圍 (30 – 40%)，難以單獨製成品質良好之青貯，青貯 pH 多數高於 5.0，又 pH 下降幅度不顯著且緩慢 (Angthong *et al.*, 2007; Heinritz *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014)，造成梭狀菌的數量與活性不易受到抑制而將醣類或乳酸轉化為丁酸，當丁酸含量愈高，代表青貯乾物質與能量大幅損失，需藉由萎凋、添加乳酸菌、醣類或禾本科作物等方式調製為青貯利用 (Du *et al.*, 2023; Guo *et al.*, 2024)。銀合歡嫩枝與葉片混合後分別添加蔗糖、乳酸菌、蔗糖與乳酸菌 (29.3 – 31% DM)，經青貯 60 天以上可發酵良好 (Heinritz *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014)。然而，比較不同添加物之青貯試驗結果，銀合歡添加蔗糖後之品質顯著優於添加乳酸菌，具有較高之乳酸含量，較低之 pH、乙酸及丙酸含量，甚至可與添加蔗糖及乳酸菌之品質相當 (Heinritz *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014)，顯示 WSC 含量充足與否是影響銀合歡青貯品質優劣的重要因子。

表 2. 乳酸菌接種對銀合歡青貯 74 天後之發酵產物含量與品質影響 (n = 3)

Table 2. Effect of lactic acid bacteria inoculation on silage fermentation products and quality of *Leucaena leucocephala* after 74 days of ensiling (n = 3)

Type	pH	A [†]	P	B	L	Score
----- % of dry matter -----						
CK	5.3 ± 0.1 [‡]	0.72 ± 0.13	0.09 ± 0.04	0.03 ± 0.00 ^a	2.84 ± 0.35	91.7 ± 0.9 ^b
I	5.2 ± 0.0	0.75 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.01 ± 0.00 ^b	2.91 ± 0.12	94.3 ± 0.7 ^a

[†] A, acetic acid; P, propionic acid; B, butyric acid; L, lactic acid; Score, silage quality of Flieg's score; CK, without inoculation; I, lactic acid bacteria inoculation.

[‡] Values are means ± standard error. Values in the same column with different superscripts differ significantly (p < 0.05).

青貯 74 天後乳酸菌接種組之 CP 含量 (20.2%) 顯著高於對照組 (19.0%)，又其 ADF 含量 (37.8%) 顯著低於對

照組 (43.2%)，兩者之 NDF 無顯著差異 (表 3)，顯示乳酸菌接種組在青貯後之芻料品質優於對照組。相較於對照組，青貯後乳酸菌接種組之 CP 含量較高而 ADF 含量較低之原因推測來自於乳酸菌的添加能促進發酵，較快速生成乳酸而降低青貯 pH (圖 1A 及圖 2A)，pH 降低除了能夠抑制梭狀菌與植體蛋白酶活性以避免蛋白質水解 (proteolysis)，亦能促進結構性碳水化合物的酸水解 (acid hydrolysis)，進而降低纖維含量 (Heinritz *et al.*, 2012; He *et al.*, 2019)。此外，兩種處理在青貯後之 CP 含量均未顯著低於青貯前 (19.4%，表 1)，青貯後 CP 含量損失低可能與銀合歡之縮合單寧 (condensed tannin) 含量較高有關 (2.59 – 4.53% DM, Zapata-campos *et al.*, 2020)，此類物質能抑制微生物與蛋白酶對蛋白質之分解 (Albrecht and Muck, 1991)。

兩種青貯處理在發酵 74 天後的含羞草鹼含量無顯著差異，可較青貯前降解約 75%；3,4-DHP 含量以乳酸菌接種組 (0.65) 顯著低於對照組 (0.74) (表 3)，相較於青貯前，青貯後乳酸菌接種組分別約可降解 34 與 25%。Chen *et al.* (2014) 研究顯示，含羞草鹼降解率與乳酸含量之相關係數最大，其次是 pH，顯示乳酸含量對降解速率影響最顯著，其推測因乳酸是青貯發酵主要生成之有機酸中 pKa 最低 (3.86) 而酸性強，能快速降低 pH 而促進含羞草鹼之分解。本試驗兩種青貯處理在發酵 74 天後之含羞草鹼含量不具差異，可能來自於青貯後乳酸含量與 pH 均無顯著差異 (表 2)。在 3,4-DHP 含量方面，因含羞草鹼降解為 3,4-DHP、3,4-DHP 進一步代謝為無毒產物之間會造成 3,4-DHP 含量的增減相互抵消，又其生成與代謝之影響因子尚不清楚，青貯過程 3,4-DHP 含量變動之原因仍需進一步試驗探討。

表 3. 乳酸菌接種對銀合歡青貯 74 天後之芻料化學組成、含羞草鹼及 3,4-DHP 含量影響 (n = 3)

Table 3. Effect of lactic acid bacteria inoculation on forage chemical composition, mimosine, and 3,4-DHP of *Leucaena leucocephala* after 74 days of ensiling (n = 3)

Treatment	CP [†]	ADF	NDF	Mimosine	3,4-DHP
	----- % of dry matter -----				
CK	19.0 ± 0.1 ^{b‡}	43.2 ± 0.9 ^a	57.9 ± 0.5	0.31 ± 0.01	0.74 ± 0.03 ^a
I	20.2 ± 0.2 ^a	37.8 ± 0.6 ^b	56.5 ± 1.1	0.34 ± 0.04	0.65 ± 0.03 ^b

[†] CP, crude protein; ADF, acid detergent fiber; NDF, neutral detergent fiber; CK, without inoculation; I, lactic acid bacteria inoculation.

[‡] Values are means ± standard error. Values in the same column with different superscripts differ significantly (p < 0.05).

結 論

本研究證實銀合歡透過青貯能顯著降低含羞草鹼與 3,4-DHP 含量，未添加乳酸菌之青貯可於存放 46 天後發酵穩定且含羞草鹼含量降解顯著；添加乳酸菌雖未進一步降低含羞草鹼含量，但能加速於青貯 30 天後達發酵穩定、保留顯著較高之粗蛋白質並降低纖維含量，亦能較快速且顯著降低 3,4-DHP 含量 (青貯 74 天後 3,4-DHP 降解率達 34%，優於對照組 25%)。綜合以上結果，乳酸菌接種能提升銀合歡青貯之發酵效率與品質，有效促進含羞草鹼及其毒性代謝物之降解。

參考文獻

- 王勝德、蘇安國、涂榮珍、吳祥雲、楊深玄。2012。餵飼銀合歡對山羊肉理化性狀之影響。畜產研究 45：275-286。
- Agbo, A. N., J. K. Balogun, S. J. Oniye, and J. Auta. 2017. Effect of different processing methods on nutritional composition of *Leucaena leucocephala* (Lam De Wit) leaves as inclusion in fish feed. J. Appl. Sci. Environ. Manage. 21: 719-725.
- Akbar, M. A. and P. C. Gupta. 1985. Proximate composition, and tannin and mineral contents of various plant parts of subabul (*Leucaena leucocephala*). Indian J. Anim. Sci. 55: 808-812.
- Akingbade, A. A., I. V. Nsahlai, and C. D. Morris. 2001. Seasonal variation in forage quality and mimosine contents of two varieties of *Leucaena leucocephala*. Afr. J. Range Forage Sci. 18: 131-135.
- Albrecht, K. A. and R. E. Muck. 1991. Proteolysis in ensiled forage legumes that vary in tannin concentration. Crop Sci. 31: 494-469.

- Anghong, W., B. Cheva-Isarakul, S. Promma, and B. Cheva-Isarkul. 2007. Beta-carotene, mimosine and quality of leucaena silage kept at different duration. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 41: 282-287.
- AOAC. 2019. Official Methods of Analysis. 21st ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlingmt, VA.
- Borreani, G., E. Tabacco, R. J. Schmidt, B. J. Holmes, and R. E. Muck. 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* 101: 3952-3979.
- Chen, X. Z., F. Feng, Q. H. Liu, and J. G. Zhang. 2014. Degrading mimosine and tannins of *Leucaena leucocephala* by ensiling. *Appl. Mech. Mater.* 618: 349-353.
- Derakhshani, H., S. W. Corley, and R. Al Jassim. 2016. Isolation and characterization of mimosine, 3, 4 DHP and 2, 3 DHP degrading bacteria from a commercial rumen inoculum. *J. Basic Microbiol.* 56: 580-585.
- Du, Z., F. Yang, J. Fang, S. Yamasaki, T. Oya, D. Nguluve, H. Kumagai, and Y. Cai. 2023. Silage preparation and sustainable livestock production of natural woody plant. *Front. Plant Sci.* 14: 1253178.
- Garcia, G. W., T. U. Ferguson, F. A. Neckles, and K. A. E. Archibald. 1996. The nutritive value and forage productivity of *Leucaena leucocephala*. *Anim. Feed Sci. Tech.* 60: 29-41.
- Guo, Y., R. Huang, Y. Niu, P. Zhang, Y. Li, and W. Zhang. 2024. Chemical characteristics, antioxidant capacity, bacterial community, and metabolite composition of mulberry silage ensiling with lactic acid bacteria. *Front. Microbiol.* 15: 1363256.
- Halliday, M. J., J. Padmanabha, C. S. McSweeney, G. Kerven, and H. M. Shelton. 2013. *Leucaena* toxicity: A new perspective on the most widely used forage tree legume. *Trop. Grassl. Forrajes Trop.* 1: 1-11.
- He, L., W. Zhou, C. Wang, F. Yang, X. Chen, and Q. Zhang. 2019. Effect of cellulase and *Lactobacillus casei* on ensiling characteristics, chemical composition, antioxidant activity, and digestibility of mulberry leaf silage. *J. Dairy. Sci.* 102: 9919-9931.
- Heinritz, S. N., S. D. Martens, P. Avila, and S. Hoedtke. 2012. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174: 201-210.
- Honda, M. D. H. and D. Borthakur. 2019. Mimosine concentration in *Leucaena leucocephala* under various environmental conditions. *Trop. Grassl. Forrajes Trop.* 7: 164-172.
- Honda, D. H. and D. Borthakur. 2024. Mimosine concentration in giant leucaena (*Leucaena leucocephala* subsp. *glabrata*) fluctuates with age and plant part. *Trop. Grassl. Forrajes Trop.* 12: 11-23.
- Honda, M. D. H., A. Youkhana, T. Idol, and D. Borthakur. 2022. A maceration treatment of leucaena foliage improves its nutritional value by reducing mimosine concentration. *Trop. Grassl. Forrajes Trop.* 10: 1-14.
- Hossain, M. A., A. L. Mustafa, M. Alam, and M. Z. A. Khan. 1991. Studies on the removal of mimosine from ipil-ipil (*Leucaena leucocephala*) seed. *J. Bangl. Chem. Soc.* 4: 83-85.
- Jones, D. W. and J. J. Kay. 1976. Determination of volatile fatty acid C1-C6 and lactic acid in silage juice. *J. Sci. Food Agric.* 27: 1005-1014.
- Kung, L., R. D. Shaver, R. J. Grant, and R. J. Schmidt. 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101: 4020-4033.
- Li, Y. and N. Nishino. 2011. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Grassl. Sci.* 57: 184-191.
- Tawada, S., F. Hongo, K. Sunagawa, Y. Kawashima, and A. Yaga. 1986. A simple reduction method of mimosine in the tropical plant *Leucaena*. *Sci. Bullet. Coll. Agric.* 33: 87-94.
- Verdecia, D. M., R. S. Herrera, J. L. Ramírez, I. Leonard, R. Bodas, S. Andrés, F. J. Giráldez, C. Valdés, Y. Arceo, M. Paumier, A. Santana, Y. Álvarez, Y. Mendez, and S. López. 2020. Effect of age of regrowth, chemical composition and secondary metabolites on the digestibility of *Leucaena leucocephala* in the Cauto Valley, Cuba. *Agric. Syst.* 94: 1247-1253.
- Vogel, K. P., J. F. Pedersen, S. D. Masterson, and J. J. Toy. 1999. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. *Crop Sci.* 39: 276-279.
- Woolford, M. K. 1984. Factors affecting silage in and out of the silo. In: M. K. (eds.), *The Silage Fermentation*. Marcel Dekker, Inc. pp. 133-155. New York, USA.
- Wu, C. M., H. M. Yuan, G. Jia, G., Z. S. Wang, and X. Q. Wu. 2012. Determination of mimosine and 2,3-dihydroxypyridine in *Leucaena leucocephala* by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Appl. Mech. Mater.* 140: 296-

301.

- Yanuartono, Y., S. Indarjulianto, A. Nururrozi, S. Raharjo, and H. Purnamaningsih. 2019. Brief review: the negative impact of mimosin in *L. leucocephala* in ruminant animals and processing methods to reduce poisoning effects on ruminant livestock. *J. Livest. Sci. Prod.* 3: 199-213.
- Zapata-campos, C. C., J. E. García-martínez, J. Salinas-chavira, J. A. Ascacio-valdés, M. A. Medina-Morales, and M. Mellado. 2020. Chemical composition and nutritional value of leaves and pods of *Leucaena leucocephala*, *Prosopis laevigata* and *Acacia farnesiana* in a xerophilous shrubland. *Emir. J. Food Agric.* 32: 723-730.

Study on the effects of lactic acid bacteria inoculation on the fermentation characteristics and mimosine metabolism of *Leucaena leucocephala* silage⁽¹⁾

Pi-Chain Liu⁽²⁾ Rajendra Adak⁽³⁾ Chien-Te Chen⁽³⁾ and Ming-Hung Chu⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Received: Jan. 30, 2026; Accepted: Mar. 13, 2026

Abstract

Leucaena (*Leucaena leucocephala*) is nutritious and highly palatable, making it a suitable forage. However, the presence of the toxic amino acid mimosine and its metabolite 3,4-dihydroxypyridine (3,4-DHP) in the plant set limits on its use in livestock production. Ensiling is regarded the most effective method to preserve the nutritional value of leucaena while reducing its toxicity. Yet, the fluctuation of lactic acid, volatile fatty acids, and toxic metabolites in the fermentation process remain unclear. In this study, two treatments—with and without lactic acid bacteria (LAB) inoculation—were compared to evaluate the fermentation characteristics, chemical composition, and changes in mimosine and 3,4-DHP content of leucaena silage at different fermentation periods (0, 7, 14, 21, 30, 46, and 74 days). The results showed that prior to ensiling, leucaena had a dry matter content of 36.1%, crude protein (CP) of 19.4%, and mimosine and 3,4-DHP concentrations of 1.36% and 0.99%, respectively. During ensiling, the LAB treatment significantly accelerated lactic acid production and effectively inhibited propionic and butyric acid formation. Fermentation stability was achieved by day 30 in the LAB treatment, earlier than the 46 days in the control treatment. The pH of the LAB treatment decreased to approximately 5.2 by day 46, and its Flieg's score reached an excellent grade (88.3) by day 14; both were significantly superior to the control, indicating that LAB accelerated the desirable fermentation. Regarding toxicity degradation, the mimosine content in both treatments decreased by 64.3% within the first 7 days before ensiling and gradually stabilized after 30 days, with no significant differences observed between treatments at any ensiling time point. The 3,4-DHP content in both treatments decreased by about 20% within 7 days; however, at subsequent time points the inoculated silage consistently had lower 3,4-DHP levels than the control, suggesting that LAB inoculation facilitated 3,4-DHP degradation. After 74 days of ensiling, the LAB treatment demonstrated higher crude protein (20.2%), lower acid detergent fiber (37.8%), and significantly lower butyric acid and 3,4-DHP contents compared to the control, resulting in better overall silage quality. In conclusion, ensiling effectively reduces mimosine levels in leucaena. Although LAB inoculation did not increase the level of mimosine metabolism, it accelerated fermentation stability, preserved nutritional value, and promoted the degradation of 3,4-DHP, thereby improving the overall quality and feeding safety of leucaena silage.

Key words: Lactic acid bacteria, *Leucaena leucocephala*, Mimosine, Silage quality.

(1) Contribution No. 2851 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Southern Region Branch, MOA-TLRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

(3) National Kangshan Agriculture and Industrial Vocational Senior High School, Kaohsiung 820001, Taiwan, R. O. C.

(4) National Chung Hsing University, Department of Agronomy, Taichung 402202, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: mmchu@mail.tlri.gov.tw.