



 SYNFERM™ | 芯發旺™ 植物青貯保護劑

# 青貯菌劑的篩選及對苜蓿半乾青貯品質的影響

文 / 游翠凰<sup>(2)(3)</sup> 王紓愨<sup>(2)</sup> 劉信宏<sup>(2)</sup> 陳嘉昇<sup>(2)</sup>

**本**研究的目的是開發本土青貯菌劑，以協助不易青貯的芻料如豆科等之保存及利用。乳酸菌分離篩選來源包括：青貯料、醃漬食品、酸乳、水果、堆肥及動物糞便。分離總共獲得 60 株菌株，經生長耐性篩選後，以活性較佳的 22 株進行苜蓿青貯菌種初步篩選。篩選試驗利用不同含水率的苜蓿進行接種，並以商業菌株進行比較，藉由不同青貯時間的 pH 值變化及產氣情形評估各菌株接種效果。青貯 8 週後，未萎凋苜蓿以接種 ST15 處理的 pH 值 4.61 為最低（不接種對照為 4.86），萎凋苜蓿中以接種 ST12 之 pH 值 4.88 為最低（不接種對照為 5.45）；而 D41 青貯產氣最少。因此，繼續以 ST15、ST12 及 D41 菌株進行後續試驗。此三菌株經鑑定，D41 為 *Lactobacillus casei*、ST12 及 ST15 均為 *Lactobacillus plantarum*。將苜蓿萎凋至含水率 56.9%，對照組不接種，接種處理分別為接種商業菌劑及 D41、ST12 及 ST15，接種量均為  $1 \times 10^6$  cfu/g forage，青貯 4、8、12 週開封並測定發酵產物。對照組乳酸及乙酸含量分別介於 0.26% DW-0.69% DW 及 0.29% DW-1.67% DW；接種處理則在 0.64% DW-2.24% DW 及 0.29% DW-0.87% DW 之間，顯示接種可促進乳酸發酵。對照組之青貯評分隨青貯時間下降，青貯 12 週時降至 38 分，而接種處理仍維持於 82-89 分之間。自行分離菌株在 4 週、8 週的發酵及青貯評分均優於商業菌株，顯示自行分離菌株能有效促進發酵。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1752 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(3) 通訊作者·E-mail: young@mail.tlri.gov.tw





## 緒言

青貯品質常因作物種類、收穫時期、水分含量及青貯製程而受影響 (Wilkinson, 1983)。其中，因作物表面菌相與營養組成差異所形成之不同青貯發酵產酸，是影響青貯品質的重要因子，乳酸菌的添加不僅可加速青貯發酵，使青貯料快速達到穩定狀態，並藉由低酸度來保存其營養成份 (Kung, 1996; Kung and Ranjit, 2001)。

高蛋白質芻料之營養價值高，但植體酸鹼緩衝能力較高，且水溶性碳水化合物不足，是不利於青貯發酵的因素，而掌握生長期、水分及利用添加劑有助其青貯發酵 (McDonald *et al.*, 1991; Fraser *et al.*, 1998)。同時，多篇研究結果表示乳酸菌的添加有利於提升青貯品質 (王等, 2008; 王等, 2009; Kung and Ranjit, 2001; Oude Elferink *et al.*, 1997)。良好的青貯發酵產酸 pH 值隨時間降低，觀察接種與未接種的青貯處理 pH 值變化，可做為青貯添加菌劑篩選的指標 (Jones *et al.*, 1991; Stokes *et al.*, 1994)。

苜蓿為多年生豆科牧草對土壤固氮有實質幫助，可以在芻料栽培系統裡扮演相當重要之角色。在溫帶地區，苜蓿可調製成乾草，國內則因氣候影響，苜蓿調製乾草的比例低，利用半乾青貯方式保存可能是較適之選項，但青貯品質仍然不易掌握。Muck (1987;1990) 進行苜蓿青貯試驗表示，苜蓿在青貯、萎凋及青貯期間有明顯蛋白質分解發生，造成植體緩衝能力高，pH 值降低受限，調整水分含量是獲得良好青貯品質的方式之一，雖然，其他條件也對青貯品質影響很大，但依材料特性選擇適當前處理是重要關鍵。Filya *et al.* (2007) 之接種試驗則顯示乳酸菌接種顯著提高苜蓿青貯品質。



本研究的主要目的在於開發本土之青貯菌劑，協助豆科等不易青貯之芻料利用保存，以提昇營養價值增加芻料自給率。

## 材料與方法

### I. 菌株分離及篩選

(i) 自青貯料、醃漬食品、酸乳、水果、堆肥及動物糞便中採樣進行乳酸菌分離，分別取前述材料適量，加入無菌水震盪 30 分鐘後，其濾液經系列稀釋後取 0.2 mL，於含 cycloheximide 100 mg/L 之 MRS 乳酸菌篩選培養基上以四區劃線法分離菌株，置於 30°C 恆溫箱厭氣培養 48 小時後，挑取單一菌落移至新鮮 MRS 平板培養基，重覆此步驟進行純系分離 3 次，將純化菌株分別以 10% 甘油冷凍保存於冷凍小管中。將保存之冷凍菌株移至新鮮 MRS 液態培養基培養 24 小時測定 pH 值，保留產酸達 pH4 以下菌株進行革蘭氏染色及鏡檢，將得到之革蘭氏陽性菌，繼代培養進行步驟 2 菌株耐性測試。

(ii) 藉由調整培養基狀態篩選環境適應性強的菌株，(1) 耐鹽性測試：以 NaCl 調整 MRS 液態培養基之含鹽率分別為 10%、5% 及 0% (不加鹽)，分別接種分離之菌株，培養 48 小時後，測定其 pH 值。(2) 耐酸性測試：利用 NaOH 及 HCl 調整 MRS 液態培養基之 pH 值分別至 pH 3.5、pH 4.5 及 pH 6.05，接種菌株後，於培養 24、48 及 72 小時後，測定其 pH 值變化。

### II. 苜蓿青貯

#### (i) 菌種初篩

由耐鹽及耐酸試驗中分別挑選生長表現較佳之 13 株菌及 9 株菌，合計 22 株菌，加上商業菌株 *Lactobacillus plantarum* (Ecosyl 公司提供，以下稱 ECO 組) 與對照組不接種處理共 24 組進行苜蓿青貯接種菌初篩試驗。

苜蓿收穫後分為二部分，一部分材料細切至 3-5cm，材料細切混合均勻後，將材料分為 24 組，對照組 (Control) 不接種，其餘材料分別接種商業菌株或自行分離菌株，接種量均為  $1 \times 10^6$  cfu/g forage，接種後將材料混合均勻密封於真空塑膠袋中，每袋裝填 135g，室溫下保存。另一部分材料萎凋 4 小時再以機械細切，進行相同的處理，方法同前。於不同時間開封測定 pH 值，評估青貯發酵酸度 (每次開封二個重複)。



## (ii) 菌劑接種試驗

將初篩試驗中挑選出之 D41、ST12 及 ST15 菌株，委託財團法人食品工業發展研究所鑑定，並進行大量培養供後續試驗。苜蓿於田間收穫萎凋 4 小時後含水率為 56.9%，經機械細切至 3–5cm 進行青貯接種試驗，將材料分為 5 部分，其中對照組 (Control) 為不接種，其餘四組分別接種試驗菌劑 D41、ST12、ST15 及商業菌 ECO，接種量均為  $1 \times 10^6$  cfu/g forage，材料混合均勻後密封於真空塑膠袋內，每袋裝填材料 120g，置於室溫下保存，分別於 4、8、12 週開封測定青貯發酵狀況與營養成分（每次開封二個重複）。

## III. 青貯品質分析

酸鹼值為 20 克新鮮青貯料加蒸餾水 180 mL，打碎過濾後以酸鹼度計測定之值。乳酸、丁酸、丙酸及乙酸之測定以氣體層析儀依 Jones & Kay (1976) 的方法進行，將前述青貯萃取液經過陽離子管柱，洗出液以 0.05N tetrabutyl ammonium hydroxide (TBAH) 滴定至 pH 為 8，70°C 下烘乾，加入定量丙酮溶解並依 TBAH 滴定量加入適量 benzyl bromide 與揮發性脂肪酸反應，樣品製備完成，再以氣相層析儀分析含量。依青貯料中乳酸、丁酸及乙酸占測定乙酸、丙酸、丁酸與乳酸四者總量之當量百分比進行評分，再將三項總加所得即為青貯品質評分 (Fleig's score)，評分 40 以下表示青貯失敗、40–60 分為可接受、60–80 分為好的青貯、80 分以上為發酵優良的青貯 (陳等, 2000)。

因本試驗系統密閉，沒有滲漏，因此以青貯後之乾物率除以青貯前之乾物率計算乾物回收率。

## 結果與討論

### I. 菌株分離及篩選

由不同來源獲得的分離菌株共計 60 株，繼代培養後保留活性佳菌株，經鏡檢後獲得革蘭氏陽性菌 36 株，分別進行耐鹽及耐酸性試驗。

(1) 耐鹽性測試結果：培養 48 小時，不含鹽培養基中有 7 株菌 pH 值達 3.8 以下；含鹽 5% 時則有 13 株菌達 pH 4 以下；含鹽 10% 時，僅有 4 株菌最終 pH 值低於 5。(2) 耐酸性測試：結果當培養基初始 pH 值 6.05 時，8 參試菌株於 24 小時產酸至 pH4 以下，培養 72 小時後 12 株菌最終 pH 值小於 4；培養基初始 pH 為 4.5 時，在 48 小時後有 5 菌株 pH 小於 3.5，72 小時後有 11 株菌 pH 小於 3.5；在 pH 值低的環境下 (初始為 pH 3.5) 時，僅 2 菌株 (ST12 及 WS) 於 48 小時後 pH 低於 3.3，72 小時後達 pH 3.3 以下則有 9 株。利用低 pH 值篩選之 9 菌株及含鹽率 5% 篩選的 13 菌株，共 22 株分離株進行青貯菌種初篩試驗。

### II. 苜蓿青貯

#### (i) 菌種初篩

未萎凋苜蓿含水率 72.3%，青貯 8 週後開封，未接種組 pH 為 4.86，接種商業菌株 ECO 組為 4.64，而自行分離菌株之 pH 值在 4.61–4.81 之間，均較對照組低，其中以 ST15 之 pH 值 4.61 最低。

苜蓿萎凋至含水率為 58.3%，青貯開封後之 pH 值變化如圖 1，對照組 pH 值降低趨勢如圖中曲線，青貯 2 週以前，各接種處理表現參差，未顯著



表 1. 苜蓿半乾青貯接種青貯乳酸菌不同保存時間青貯前後營養組成變化

Treatment*	Crude protein	Neutral detergent fiber	Acid detergent fiber	
				-----%-----
Pre-ensiling	12.9	45.2	30.4	
Ensiled 12 weeks	Control	13.3	45.1	36.3
	ECO	12.7	46.1	36.8
	D41	12.7	47.4	38.9
	ST12	13.3	46.2	35.7
	ST15	12.5	47.1	37.4

\*: Control, without inoculation; ECO, inoculated with commercial product Ecosyl; D41, inoculated with isolated strain D41 (*L. casei*); ST12, inoculated with isolated strain ST12 (*L. plantarum*); ST15, inoculated with isolated strain ST15 (*L. plantarum*)

表 2. 接種不同乳酸菌之苜蓿半乾青貯的含水率與乾物質回收率

Treatment*	Dry matter content(%)			Dry matter recovery(%)		
	4W	8W	12W	4W	8W	12W
Control	40.5 <sup>ab</sup>	40.4 <sup>b</sup>	40.8 <sup>a</sup>	93.9 <sup>a</sup>	93.6 <sup>b</sup>	94.5 <sup>a</sup>
ECO	40.8 <sup>a</sup>	40.4 <sup>b</sup>	43.0 <sup>a</sup>	94.6 <sup>a</sup>	93.7 <sup>b</sup>	95.0 <sup>a</sup>
D41	40.9 <sup>a</sup>	42.1 <sup>a</sup>	38.9 <sup>b</sup>	94.9 <sup>a</sup>	97.6 <sup>a</sup>	90.2 <sup>b</sup>
ST12	39.7 <sup>b</sup>	40.8 <sup>b</sup>	41.0 <sup>a</sup>	92.1 <sup>b</sup>	94.6 <sup>a</sup>	95.1 <sup>a</sup>
ST15	40.4 <sup>ab</sup>	40.5 <sup>b</sup>	39.4 <sup>b</sup>	93.7 <sup>a</sup>	94.0 <sup>a</sup>	91.3 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup> Means in the same section and the same column with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

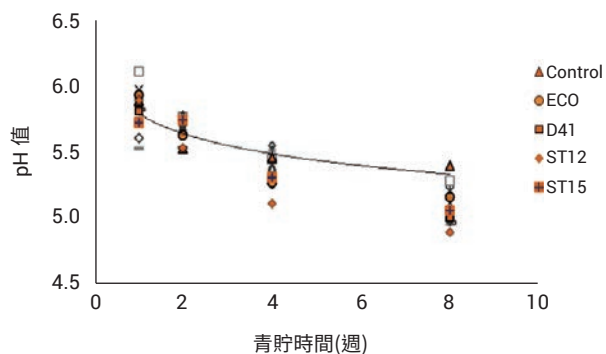
\*: The same as table 1.

優於對照組，青貯 4 週時部分處理 pH 值下降幅度大，其中商業菌株與 10 個自行分離菌株之 pH 值顯著低於對照之 pH 5.45；青貯 8 週時，對照組之降低有限，而接種處理的 pH 值則持續下降且均較對照組低，其中以 ST12 菌株 pH 4.88 最低。苜蓿青貯無論是否萎凋都有明顯產氣情形，接種處理均

有降低產氣的效果，其中又以 D41 之改善效果最佳。

綜合上述結果選擇以 ST15、ST12 及 D41 做為苜蓿青貯開發菌劑試驗菌株，將此三菌株委託財團法人食品工業發展研究所鑑定，並進一步探討接種菌劑對苜蓿青貯發酵及營養成分之影響。

圖 1. 萎凋苜蓿菌種初篩，利用 pH 值評估分離菌株的表現



## (ii) 菌劑鑑定

菌株經財團法人食品工業發展研究所鑑定，鑑定結果分離株 D41 為 *Lactobacillus casei*，ST12 及 ST15 均為 *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*。

## (iii) 接種試驗

此試驗原料為萎凋苜蓿，含水率 56.9%；青貯前粗蛋白質含量為 12.9%；中洗纖維含量為 34.7%；酸洗纖維含量為 30.7%。青貯 12 週後，酸洗纖維含量增加，粗蛋白質與中洗纖維變動不

大，各處理間差異不顯著（表 1）。

青貯後之乾物率及乾物質回收率如表 2，乾物率介於 38.9% 42.1% 之間，變動不大，乾物質回收率均超過 90%。青貯發酵結果如表 3，對照組的 pH 值隨青貯時間下降，青貯 4 週、8 週、12 週時 pH 值分別為 5.51、5.34 及 4.93，而各接種處理的 pH 值均低於對照。8 週前，接種處理與對照間的差距較大，12 週時接種處理與對照間的差距減少，顯示接種處理的發酵速度較快，其中尤以 D41 的反應最快，4 週時 pH 值即已降至 4.23 為各組最低，8 週時 pH 值 4.31 仍為各組最低，12 週時則以 ST12 的 4.67 最低。接種處理顯著改善青貯 pH 值。苜蓿半乾青貯發酵產酸以乳酸與乙酸為主，產酸量隨青貯時間增加，但對照組乙酸的增加率較乳酸高，造成乙酸 / 乳酸比上升，青貯評分下降，12 週時評分由 4 週時的 68 分降至 38 分，由好等級的青貯降至失敗的程度。接種處理的乳酸含量顯著高於對照組，乙酸 / 乳酸比也顯著低於對照，顯示接種處理確實有助於促進苜蓿青貯的乳酸發酵，同時，12 週時接種處理的評分仍維持在 82–89 分間的高等級。

菌種比較方面，自行分離菌株在 4 週、8 週的發酵及青貯評分均優於商業菌株，顯示自行分離菌株可較商業菌株更快發揮促進發酵的效果。

### 結論

據 Filya *et al.* (2007) 進行的苜蓿貯接種試驗結果，不同菌株對環境適應性及活性各異，接種後造成青貯發酵產酸也會不同，同質乳酸菌會將醣完全轉化為乳酸，促使青貯的乳酸生成快速，而異質乳酸菌則除乳酸外還有乙酸的生成。本試驗對照組在發酵後期的乙酸生成率高於乳酸生成，是否與此有關需進一步的實驗證明。本試驗同樣顯示乳酸菌接種有助於苜蓿青貯發酵，且自行分離菌株的表現較商業菌株為佳，可能與其經過耐性及針對材料特性篩選，也有可能與生長環境適應性較佳有關。

本研究結果顯示，由多種來源分離獲得之乳酸菌株，確實可供開發為促進豆科芻料發酵之青貯菌劑利用。實驗室分離乳酸菌具有適應本土環境的特性，未來可再依青貯材料特性篩選不同接種菌株。

表 3. 苜蓿半乾青貯接種不同乳酸菌不同青貯時間開封對青貯品質的影響

Ensiling period	Inoculant*	pH	Acetic acid	Propionic acid	Butyric acid	Lactic acid	Flieg's score	A/L	
week			-----% DW-----						
4	Control	5.51 <sup>a</sup>	0.29 <sup>bc</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.34 <sup>c</sup>	68 <sup>c</sup>	0.85 <sup>a</sup>	
	ECO	5.17 <sup>b</sup>	0.30 <sup>bc</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.60 <sup>bc</sup>	69 <sup>c</sup>	0.49 <sup>b</sup>	
	D41	4.23 <sup>c</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	2.22 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0.17 <sup>c</sup>	
	ST12	5.13 <sup>b</sup>	0.22 <sup>c</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.64 <sup>bc</sup>	90 <sup>ab</sup>	0.35 <sup>b</sup>	
	ST15	5.04 <sup>b</sup>	0.50 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	1.10 <sup>b</sup>	84 <sup>b</sup>	0.46 <sup>b</sup>	
8	Control	5.34 <sup>a</sup>	0.88 <sup>a</sup>	0.22 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.26 <sup>c</sup>	50 <sup>b</sup>	3.36 <sup>a</sup>	
	ECO	5.09 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.14 <sup>a</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.37 <sup>c</sup>	51 <sup>b</sup>	2.35 <sup>a</sup>	
	D41	4.31 <sup>c</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	2.24 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	0.20 <sup>b</sup>	
	ST12	4.80 <sup>b</sup>	0.29 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	1.14 <sup>b</sup>	95 <sup>a</sup>	0.26 <sup>b</sup>	
	ST15	4.88 <sup>b</sup>	0.30 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.88 <sup>b</sup>	79 <sup>a</sup>	0.34 <sup>b</sup>	
12	Control	4.93 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.69 <sup>b</sup>	38 <sup>b</sup>	2.49 <sup>c</sup>	
	ECO	4.70 <sup>b</sup>	0.64 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	1.71 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	0.37 <sup>b</sup>	
	D41	4.82 <sup>c</sup>	0.87 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	1.71 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>	0.51 <sup>b</sup>	
	ST12	4.67 <sup>b</sup>	0.68 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	1.83 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	0.38 <sup>b</sup>	
	ST15	4.69 <sup>b</sup>	0.67 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	0.00 <sup>b</sup>	1.82 <sup>a</sup>	88 <sup>a</sup>	0.38 <sup>b</sup>	

<sup>a, b, c</sup> Means in the same section and the same column with different superscripts are different significantly ( $P < 0.05$ ).

\* : The same as table 1.

## 參考文獻

- 王紓愨、陳嘉昇、謝文彰、游翠凰、劉信宏。2008。成熟度、接種處理與青貯保存時間對全株水稻青貯品質的影響。畜產研究 41:153-162。
- 王紓愨、陳嘉昇、游翠凰、劉信宏。2009。太陽麻之青貯調製研究。畜產研究 42:309-318。
- 陳嘉昇、張定偉、王紓愨。2000。牧草品質與品質的快速測定。行政院農業委員會畜產試驗所專輯第72號。
- Filya, I., R. E. Muck and F. B. Contreras-Govea, 2007. Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. J. Dairy Sci. 90(11): 5108-5114.
- Fraser, M. D., R. Fychan and R. Jones. 1998. The effect of harvest date and inoculation on the yield, fermentation characteristics and feeding value of forage pea and field bean silages. Grass and Forage Sci. 56: 218-230.
- Kung, Jr. L. 1996. Use of additives in silage fermentation. pp.37-42. In: Directfed Microbial, Enzyme and Forage Additive Compendium, Miller Publishing Co., Minnetonka, MN, USA.
- Kung, Jr. L. and N. K. Ranjit. 2001. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. J. Dairy Sci. 84: 1149-1155.
- Jones, B. A., R. E. Muck, and S. C. Ricke 1991. Selection and application of *Streptococcus bovis* as a silage inoculant. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3000-3005.
- 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.
- Komarek, A. R., H. Manson and N. Thiex. 1996. Crude fiber determination using the ANKOM system. Publ.102. ANKOM technol. Corp., Fairport, NY.
- McDonald P., A. R. Henderson and S. J. E. Heron. 1991. The Biochemistry of Silage (second ed.), Chalcombe Publ., Cambrian Printers, Ltd., Merlow, Bucks, Aberystwyth, Wales, UK.
- Muck, R. E. 1987. Dry matter level effects on alfalfa silage quality: I. Nitrogen transformations. Trans. ASAE 30: 7-14
- Muck, R. E. 1990. Dry matter level effects on alfalfa silage quality. II. Fermentation products and starch hydrolysis. Trans. ASAE 33: 373-381.
- Oude Elferink, S. J. W. H., F. Driehuis, J. C. Gottschal and S. F. Spoelstra. 1997. Silage fermentation processes and their manipulation, FAO Electronic Conference on Tropical Silage.
- Stokes, M. R. and J. Chen. 1994. Effects of an enzyme-inoculant mixture on the course of fermentation of corn silage. J. Dairy Sci. 77: 3401-3409.
- Vogel, K., 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.
- Wilkinson, J. M. 1983. Silage made from tropical and temperate crops. Part I. The ensiling process and its influence on feed value. World Anim. Rev. 45: 36-42.



## 生合生物科技股份有限公司

821高雄市路竹區北嶺六路66號  
www.synbiotech.com | Email: service@synbiotech.com.tw  
電話: +886-7-6955680 | 傳真: +886-7-6955713

