

銀合歡 (*Leucaena leucocephala*) 經不同調製處理 作為青貯利用之研究⁽¹⁾

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

收件日期：114 年 3 月 11 日；接受日期：114 年 5 月 23 日

摘 要

銀合歡 (*Leucaena leucocephala*) 具有生長速度快、環境適應性與再生能力強等特性，其葉片、嫩枝及豆莢對於反芻動物適口性佳且營養豐富，適合作為芻料。然而，因含有對動物具毒性的含羞草鹼 (mimosine) 而限制其利用。本研究以不同添加處理 (對照組無添加、添加 2×10^6 cfu/kg 乳酸菌、添加 5% 糖蜜與 2×10^6 cfu/kg 乳酸菌) 及不同青貯時間 (30、73 及 120 天) 進行銀合歡青貯，探討添加處理與青貯時間對於青貯品質、含羞草鹼及其具毒性代謝物 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) 含量之影響。試驗結果顯示，添加糖蜜與乳酸菌經青貯 30 天後 pH 為 4.5，青貯評分達到 97.7 分之優良水準；對照組與僅添加乳酸菌經青貯 73 天後 pH 均為 5.2，青貯評分分別達到 92.7 與 95.3 分。各處理中以添加糖蜜與乳酸菌青貯之平均品質最佳，具有較低之 pH (4.4)、較高之乳酸含量 (6.34%) 與青貯評分 (95.6)，對照組與僅添加乳酸菌青貯之揮發性脂肪酸含量與青貯評分彼此間均無顯著差異，隨著青貯時間增加，兩者之 pH 值下降、乙酸及乳酸含量增加，但對青貯評分影響不顯著。青貯可降低銀合歡之含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量，其中以含羞草鹼與 2,3-DHP 的降幅較顯著 ($P < 0.05$)。添加處理中以添加糖蜜與乳酸菌青貯降解效果最佳，含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量分別僅 0.3、0.8 及 0.16%，又青貯時間對於含羞草鹼及其代謝物含量影響均不顯著。本研究結果顯示，銀合歡可透過添加糖蜜與乳酸菌的調製方式顯著提升青貯發酵品質並降低其毒性，當發酵穩定後，青貯品質與含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量不再隨青貯時間延長而變動，可作為後續利用之參考。

關鍵詞：青貯時間、乳酸菌、銀合歡、糖蜜、青貯。

緒 言

銀合歡 (*Leucaena leucocephala*) 屬於豆科銀合歡屬木本植物，原產於中美洲，由於能適應多種氣候環境、生長旺盛且再生能力強，因此在全球廣泛分布 (Shelton and Brewbaker, 1994)，又因其性喜高溫多雨、富含蛋白質、類胡蘿蔔素、礦物質且適口性佳，成為許多亞熱帶與熱帶地區提高動物生產力的重要芻料用灌木 (Akingbade *et al.*, 2004; Giang *et al.*, 2016)。

雖然銀合歡營養價值高，但因含有對動物具毒性的含羞草鹼 (mimosine)，造成在牲畜飼養的利用上受到限制。對反芻動物而言，含羞草鹼的毒性影響包含脫毛、食慾不振、體重下降、甲狀腺腫大、流產甚至不孕等症狀 (Blaney, 2005; Vijayakumar and Srinivasan, 2018)。這些毒性效應來自於動物取食銀合歡後，含羞草鹼與其代謝物 3,4-dihydroxypyridine (3,4-DHP) 及 2,3-dihydroxypyridine (2,3-DHP) 均是酪胺酸的結構類似物，會取代酪胺酸並抑制酪胺酸脫羧酶 (tyrosine decarboxylase) 與酪胺酸酶 (tyrosinase) 等酵素，導致依賴酪胺酸的相關蛋白質合成、代謝途徑及酵素功能喪失 (Negi *et al.*, 2014)。然而，Jones (1981) 研究顯示，以銀合歡餵飼夏威夷與印尼的山羊或牛未發生含羞草鹼中毒的臨床症狀，其原因來自於兩地的山羊與牛瘤胃中含有厭氧的革蘭氏陰性菌 (*Synergistes jonesii*) 可將含羞草鹼代謝成無毒產物，又將此細菌接種至澳洲的山羊與牛，可使動物在餵飼 100% 銀合歡飼糧下未出現毒害作用 (Jones and Megarritty, 1986)。

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2828 號。
(2) 國立岡山高級農工職業學校。
(3) 國立中興大學農藝學系。
(4) 農業部畜產試驗所南區分所。
(5) 通訊作者，E-mail: mmchu@mail.tlri.gov.tw。

菌液接種雖然可有效降低銀合歡的毒害，但執行技術門檻高，為了利用富含營養的銀合歡，許多降解含羞草鹼來避免毒害的方法已開發，如乾燥、浸泡及青貯等。在 1,000°C 下乾熱處理可降低 9.45 – 14.52% 含羞草鹼含量。在 70% 濕度下進行 1,000°C 的加熱處理可顯著降低 50% 含羞草鹼含量 (Akbar and Gupta, 1985)。將葉片在 60°C 下乾燥 24 小時，然後以室溫浸泡溶液中 72 小時，再於 60°C 下乾燥 48 小時，可將含羞草鹼含量由 4.4% 降至 0.2% (Chanchay and Poosaran, 2009)。這些方法雖能有效降低含羞草鹼含量，但費時或成本高而不易大量生產。透過青貯的方式，將銀合歡葉與 20% 米糠混合後可使含羞草鹼含量減少超過 90%，青貯品質亦可達到良好等級 (Angthong *et al.*, 2007)。此外，銀合歡嫩枝與葉片在分別添加蔗糖、蔗糖與乳酸菌後青貯，青貯後兩者分別可使含羞草鹼含量減少 49 與 48%，亦具有較高的乳酸含量，較低的乙酸、丙酸與丁酸含量 (Chen *et al.*, 2014)，顯示調製處理有助於提升銀合歡青貯品質，亦可降低含羞草鹼含量。然而，除了動物可代謝含羞草鹼，銀合歡亦具有內源性酵素 (mimosinase) 可降解含羞草鹼為 3,4-DHP 與 2,3-DHP (Negi *et al.*, 2014)，青貯能否降低同樣具毒害的 3,4-DHP 與 2,3-DHP 含量，又青貯時間長短是否影響銀合歡青貯品質與含羞草鹼含量，目前尚無文獻探討。

臺灣過去為了滿足造紙原料、木材及工業用燃料的需求，自國外引進銀合歡進行造林，憑藉著強盛的生長與繁殖能力，銀合歡成為極為強勢的入侵物種，造成全島與各外離島的生物多樣性備受影響。為了減少對生態與環境的衝擊，移除與造林成為降低銀合歡數量最立竿見影的方式，但如善用其營養特性開發成當地牧場可就地取材的芻料，更可發揮其利用價值。王等 (2010) 指出銀合歡是生產有機臺灣黑山羊的廉價芻料，雖然羊隻在試驗期間未出現毒害症狀，但長期飼養仍需注意羊隻肝功能可能產生的負面影響。為了增加銀合歡的利用性，本研究以添加糖蜜、乳酸菌的調製方式進行青貯，探討不同添加處理與青貯時間對銀合歡青貯品質、含羞草鹼及其毒害代謝物含量的影響，作為銀合歡應用於反芻動物飼養的參考。

材料與方法

I. 試驗材料

銀合歡試驗材料於 2024 年 1 月 9 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 以下之柔嫩莖桿及其所附帶之葉片、花、豆莢作為試驗材料，取樣之材料於蔭棚下堆置 2 小時後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

青貯前之樣品經取樣後以 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 纖維分析儀進行。

III. 青貯試驗

銀合歡經 2 小時堆置後細切至約 2 cm，分為以下方式進行青貯試驗，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)、添加糖蜜 (5% 鮮重) 與商用乳酸菌劑 (接種量為 2×10^6 cfu/kg 材料鮮重) 混合等兩種處理，糖蜜與乳酸菌劑均以水溶液噴灑接種。材料均勻混合後密封於真空塑膠袋內，每袋裝填 1 kg，每種處理 3 重複，於室溫下分別青貯 30、73 及 120 天後開封，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、乙酸及丁酸各佔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) 及其代謝物之萃取與測定

參考 Wu *et al.* (2012) 試驗方法，調整為以下方式測定含羞草鹼與其代謝物 3,4- 雙羥基吡啶 (3,4-dihydropyridine, 3,4-DHP)、2,3- 雙羥基吡啶 (2,3-dihydropyridine, 2,3-DHP) 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 μ m 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、3,4-DHP 及 2,3-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 × 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)、純度 99% 之 3,4-DHP (CAS:10182-48-6, Combi-Blocks) 及純度 98% 之 2,3-DHP (CAS:16867-04-2, Combi-Blocks)，分別以波長 290、280 及 310 nm 之訊號測定含羞草鹼 (retention time: 5.60 min)、3,4-DHP (retention time: 6.48 min) 及 2,3-DHP (retention time: 9.56 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. 青貯之發酵產物含量與品質

青貯前之銀合歡乾物率與芻料化學組成如表 1，由於採集時間為較乾燥的冬季且植株經堆置 2 小時後才進行青貯，因此乾物率較高 (41.4%)，CP、ADF 及 NDF 含量分別為 21.7、35.8 及 45.4%。Garcia *et al.* (1996) 研究顯示，銀合歡葉片之 CP 與粗纖維含量分別為 24.0 – 34.4% 與 18.0 – 20.4%，可媲美高品質苜蓿之營養組成；葉片含枝條之 CP、ADF 及 NDF 含量分別為 10.0 – 30.1%、34.1 – 36.1% 及 32.0 – 42.0%。銀合歡芻料化學組成之差異來自於品種、收穫季節及植株成熟度等因素影響，當割期相同，雨季與乾季之全株 CP 含量無顯著差異，但銀合歡在雨季因生長快速而木質化程度較高，其 ADF 與 NDF 含量因而高於乾季 (Casanova-Lugo *et al.*, 2014)。本試驗銀合歡雖於乾燥的冬季採集，但纖維含量略高於前人研究，推測為採集時植株已開花並具少許豆莢，植株成熟度較高導致纖維含量較高。

表 1. 銀合歡青貯前之乾物率及芻料化學組成

Table 1. Dry matter content and forage chemical composition of pre-ensiled *Leucaena leucocephala*

DM [†]	CP	ADF	NDF
%	% of DM		
41.4 ± 0.2 [‡]	21.7 ± 0.2	35.8 ± 1.2	45.4 ± 0.1

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

[‡] Values are means ± standard error.

銀合歡與桑樹、構樹及辣木等高營養價值之木本植物相似，均具有含水率高、植體緩衝能力 (buffering capacity) 強且水溶性碳水化合物 (water soluble carbohydrates, WSC) 含量不足等特性，不易單獨製成良好青貯 (Du *et al.*, 2023)。以不同添加處理 (糖蜜、乳酸菌劑添加與否) 與青貯時間 (30、73 及 120 天) 進行銀合歡青貯試驗，青貯之 pH、丁酸含量及品質評分均極顯著受到添加處理與青貯時間之交感效應影響，又 pH 與乳酸含量均極顯著受到添加處理、青貯時間之個別主效應影響 (表 2)。由交互效應之分析結果顯示 (表 3)，對照組於青貯 30 天後開封檢測，pH 與丁酸含量最高，分別為 5.6 與 0.15%，青貯評分最低 (77.0)。添加糖蜜與乳酸菌後青貯，三種青貯天數之 pH 與丁酸含量均最低，青貯評分均可達 92.0 以上之優良品質，而對照組或僅添加乳酸菌之處理均需超過 30 天之發酵時間才能具有較佳的青貯品質，此結果與 Chen *et al.* (2014) 相似，銀合歡嫩枝與葉片分別添加蔗糖、乳酸菌、蔗糖與乳酸菌後青貯，於不同時間開封檢測。在青貯 7 天內，添加蔗糖、蔗糖與乳酸菌之 pH 顯著下降，乳酸含量顯著增加且高於無添加與僅添加乳酸菌者，乙酸含量雖增加但顯著低於無添加與僅添加乳酸菌者，添加蔗糖、蔗糖與乳酸菌在青貯 15 天後其 pH 與揮發性脂肪酸含量趨於穩定，但僅添加乳酸菌與無添加之青貯需 30 至 60 天後發酵狀態才穩定。桑葉青貯亦有相似的發酵結果 (Wang *et al.*, 2019)，青貯之 pH、乳酸、乙酸、乳酸菌及大腸桿菌 (coliform bacteria) 含量均會受到添加物與青貯時間之個別主效應及交互效應影響，添加乳酸菌與蔗糖之處理在青貯 7 天後即可達到 pH 4.0 以下且高乳酸菌與乳酸、低大腸桿菌與乙酸含量的理想青貯品質。綜合本試驗與前人研究結果，糖類與乳酸菌的添加可快速促進乳酸菌之乳酸發酵，在短時

間內生成乳酸、降低 pH 而抑制其他微生物活性，達到優良的青貯品質，亦可減少乙酸、丙酸及丁酸等不利於青貯品質的有機酸生成。

表 2. 不同添加處理與青貯時間對銀合歡青貯發酵產物與品質影響之變方分析

Table 2. Analysis of variance of the effects of different additives and ensiling times on the fermentation products and quality of *Leucaena leucocephala* silage

Source	DF	Mean square					
		pH	A [†]	P	B	L	Score
Additive treatment (A)	2	0.41*	0.43	0.02	0.00	7.29*	72.44*
Ensilng time (E)	2	2.13*	0.03*	0.00	0.00	50.53*	213.78
A × E	4	0.06*	0.04	0.02	0.02*	0.53	130.56*
Error	18	0.01	0.01	0.01	0.00	0.39	25.22

[†] A, acetic acid; P, propionic acid; B, butyric acid; L, lactic acid; Score, silage quality of Flieg's score.

* significance at 1% levels.

表 3. 添加處理對於銀合歡不同青貯時間之發酵產物含量與品質影響

Table 3. Effect of additive treatment on fermentation products and quality of *Leucaena leucocephala* silage at different ensiling times

Ensilng time	CK [†]	L	LM
		pH	
30 d	0.98 ± 0.04 ^{aa‡}	1.03 ± 0.08 ^{aA}	0.76 ± 0.02 ^{ab}
73 d	0.89 ± 0.03 ^{ba}	0.88 ± 0.03 ^{ba}	0.75 ± 0.03 ^{ab}
120 d	0.89 ± 0.02 ^{ba}	0.87 ± 0.01 ^{ba}	0.81 ± 0.04 ^{ab}
		Butyric acid (% of DM)	
30 d	0.15 ± 0.02 ^{aA}	0.14 ± 0.06 ^{aA}	0.03 ± 0.02 ^{ab}
73 d	0.08 ± 0.03 ^{ba}	0.00 ± 0.00 ^{bb}	0.04 ± 0.02 ^{aAB}
120 d	0.04 ± 0.02 ^{ba}	0.02 ± 0.01 ^{ba}	0.04 ± 0.01 ^{aA}
		Flieg's score	
30 d	77.0 ± 0.6 ^{bc}	83.3 ± 2.0 ^{bb}	97.7 ± 2.3 ^{aA}
73 d	92.7 ± 3.8 ^{aA}	95.3 ± 2.1 ^{aA}	92.0 ± 3.1 ^{aA}
120 d	88.3 ± 3.8 ^{ab}	88.7 ± 4.5 ^{abB}	97.0 ± 2.1 ^{aA}

[†] CK, without any addition; L, addition of lactic acid bacteria; LM, addition of lactic acid bacteria and molasses.

[‡] Values are means ± standard error. Values within each column (in lowercase letter) and within each row (in uppercase letter) with different superscripts differ significantly (P < 0.05).

比較添加處理之個別主效應對銀合歡青貯發酵產物含量與品質之影響 (表 4)，不同處理間之乙酸、丙酸及丁酸含量均不具顯著差異，但添加糖蜜與乳酸菌之青貯在發酵後的乳酸含量 (6.34%) 顯著較高，因此其青貯評分 (95.6) 顯著高於對照組與僅添加乳酸菌之青貯。然而，僅添加乳酸菌之青貯與無添加之對照組在發酵產物含量及品質均不具顯著差異，推測 WSC 含量對於銀合歡青貯品質之影響較顯著。Du *et al.* (2023) 指出，青貯發酵的適宜乾物率為 30 – 40%，在此範圍內可促進乳酸菌進行乳酸發酵，進而抑制其他有害微生物的繁殖。若青貯乾物率過低 (< 25% DM)，容易導致發酵時間延長且產生以梭狀菌 (*Clostridia*) 為主的丁酸發酵，該過程會分解蛋白質並產生氨氮 (NH₃-N)，因而降低青貯發酵品質。反之，若青貯乾物率過高 (> 50% DM)，乳酸菌會因水分活性不足而生長受到抑制，無法產生大量乳酸來降低青貯 pH。本試驗之銀合歡雖然乾物率略高 (41.4%，表 1)，但對照組青貯發酵生成的乳酸、乙酸、丙酸及丁酸含量均與添加乳酸菌之青貯無顯著差異 (表 4)，又兩者之青貯評

分與乳酸含量顯著低於添加糖蜜與乳酸處理組，顯示銀合歡需添加適量之 WSC，才能發酵成品質良好之青貯。

分析青貯時間之個別主效應對銀合歡青貯發酵產物含量與品質之影響 (表 4)，丙酸與丁酸含量均不受青貯時間影響，但青貯 120 天後具有顯著較高之乳酸含量 (4.62%)，其乙酸含量 (0.82%) 亦顯著較高，但青貯評分之影響不具顯著差異，此結果與銀合歡葉片青貯相似 (Anghong *et al.*, 2007)。銀合歡葉片與 20% 米糠混合後經 21、51、81 及 111 天青貯，除 81 天青貯之乳酸含量較高外，pH、乙酸、丁酸及乳酸含量在不同青貯天數間均無顯著差異，青貯品質均可達到良好等級。然而，Chen *et al.* (2014) 研究指出，銀合歡經添加蔗糖或乳酸菌後青貯，各處理之 pH 與揮發性脂肪酸含量在 7 天內變化最顯著，30 天後各處理之 pH 與揮發性脂肪酸含量便趨於穩定，顯示青貯時間對於銀合歡青貯之發酵產物含量與品質的影響應存在於青貯初期 (< 30 天)，可待進一步分析探討。

表 4. 不同添加處理與青貯時間對銀合歡青貯在之發酵產物含量與品質之影響比較

Table 4. Comparisons of the effects of different additive treatments and ensiling times on the fermentation products and quality of *Leucaena leucocephala* silage

	pH	A [†] (%)	P (%)	B (%)	L (%)	Score
Additive treatment						
CK	5.3 ± 0.1 ^{ab}	0.51 ± 0.10 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.02 ^a	2.07 ± 0.27 ^b	86.0 ± 2.8 ^b
L	5.3 ± 0.1 ^a	0.62 ± 0.08 ^a	0.08 ± 0.04 ^a	0.06 ± 0.03 ^a	2.42 ± 0.28 ^b	89.1 ± 2.3 ^b
LM	4.4 ± 0.1 ^b	0.57 ± 0.05 ^a	0.07 ± 0.05 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	6.34 ± 0.42 ^a	95.6 ± 1.5 ^a
Ensiling time						
30 d	5.2 ± 0.2 ^a	0.42 ± 0.05 ^b	0.09 ± 0.04 ^a	0.07 ± 0.02 ^a	2.89 ± 0.75 ^b	87.8 ± 3.1 ^a
73 d	5.0 ± 0.1 ^a	0.47 ± 0.02 ^b	0.07 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.02 ^a	3.32 ± 0.62 ^b	93.3 ± 1.6 ^a
120 d	4.8 ± 0.1 ^b	0.82 ± 0.06 ^a	0.10 ± 0.05 ^a	0.07 ± 0.03 ^a	4.62 ± 0.76 ^a	89.6 ± 2.7 ^a

[†] A, acetic acid; P, propionic acid; B, butyric acid; L, lactic acid; Score, silage quality of Flieg's score; CK, without any addition; L, addition of lactic acid bacteria; LM, addition of lactic acid bacteria and molasses.

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

II. 含羞草鹼與其代謝物含量之變化

銀合歡青貯後之含羞草鹼與其代謝物 3,4-DHP 含量均受到添加處理之主效應影響，又 3,4-DHP 含量亦受到添加處理與青貯時間之交感效應影響，但添加處理與青貯時間對 2,3-DHP 之影響均不具顯著差異 (表 5)。由交互效應之分析結果顯示 (表 6)，對照組與僅添加乳酸菌經 30 天青貯之 3,4-DHP 含量最高，分別為 0.98% 與 1.03%。添加糖蜜與乳酸菌處理之 3,4-DHP 含量，顯著低於其他處理組，且其含量在 30、73 及 120 天之不同青貯時間下並無顯著差異，分別為 0.76、0.75 及 0.81%，又對照組及僅添加乳酸菌處理組之 3,4-DHP 含量均以存放 73 與 120 天顯著低於存放 30 天。

表 5. 不同添加處理與青貯時間對銀合歡含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量影響之變方分析

Table 5. Analysis of variance of the effects of additive treatments and ensiling times on mimosine, 3,4-DHP and 2,3-DHP content of *Leucaena leucocephala* silage

Source	DF	Mean square		
		mimosine	3,4-DHP	2,3-DHP
Additive treatment (A)	2	0.0010*	0.0325**	0.0029
Ensiling time (E)	2	0.0090	0.0193	0.0002
A × E	4	0.0010	0.0442**	0.0016
Error	18	0.0000	0.0043	0.0026

*,** significance at 5% and 1% levels, respectively.

表 6. 添加處理對於銀合歡不同青貯時間之 3,4-DHP 含量影響

Table 6. Effect of additive treatments on 3,4-DHP content in *Leucaena leucocephala* silage at different ensiling times

Ensiling time	CK [†]	L	LM
	% of DM		
30 d	0.98 ± 0.04 ^{aA‡}	1.03 ± 0.08 ^{aA}	0.76 ± 0.02 ^{aB}
73 d	0.89 ± 0.03 ^{bA}	0.88 ± 0.03 ^{bA}	0.75 ± 0.03 ^{aB}
120 d	0.89 ± 0.02 ^{bA}	0.87 ± 0.01 ^{bA}	0.81 ± 0.04 ^{aB}

[†] CK, without any addition; L, addition of lactic acid bacteria; LM, addition of lactic acid bacteria and molasses.

[‡] Values are means ± standard error. Values within each column (in lowercase letter) and within each row (in uppercase letter) with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

Chen *et al.* (2014) 指出，銀合歡分別添加蔗糖、乳酸菌、蔗糖與乳酸菌後青貯，在相同青貯時間下，添加蔗糖、蔗糖與乳酸菌之青貯料含羞草鹼含量顯著低於無添加與僅添加乳酸菌者。比較相同青貯時間之青貯 pH 與乳酸含量，添加蔗糖、蔗糖與乳酸菌之 pH 顯著較低，兩者之乳酸含量亦顯著高於無添加與僅添加乳酸菌者，推測青貯發酵品質較佳（較低之 pH 與高乳酸含量）有助於降低含羞草鹼含量，又發酵愈快穩定且品質愈佳之青貯其含羞草鹼含量降低之速度愈快且愈顯著，此結果與本試驗之 3,4-DHP 含量及其所對應之 pH、乳酸含量及青貯品質相同（表 3、表 4 及表 6）。

本試驗青貯前之銀合歡含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量分別為 1.6、1.01 及 0.29%（表 7），含羞草鹼含量較低於前人研究（1.6 – 10%，Yanuartono *et al.*, 2019）。銀合歡之含羞草鹼含量受到品種、植株部位及生育階段等因素影響，莖稈、葉片及種子中的含量以葉片最高（1.6 – 10.0%），種子次之（3.2 – 5.0%），莖稈最低（0.1 – 2.3%），相同部位又以幼嫩者之含量較高（Yanuartono *et al.*, 2019; Honda and Borthakur, 2024），本試驗銀合歡因含有葉片、嫩莖稈、少量豆莢及花，因此含羞草鹼含量低於主要以葉片為試驗材料之前人研究。此外，含羞草鹼是銀合歡因應土壤酸鹼、乾旱、淹水及病蟲害等逆境的調控物，藉由含羞草鹼的生合成、降解為 3H4P（3 hydroxy-4-pyridone）或 3,4-DHP 與 2,3-DHP，可提升銀合歡對生物性與非生物性逆境之抗性，又 3,4-DHP 與 2,3-DHP 均為 3H4P 之同分異構物（isomer），彼此間可相互轉換來調控含羞草鹼之合成與降解（Negi *et al.*, 2014; Honda and Borthakur, 2024）。由本試驗分析結果顯示（表 7），銀合歡植株中以含羞草鹼與 3,4-DHP 含量較高，2,3-DHP 含量顯著較低。

表 7. 不同添加處理與青貯時間對銀合歡青貯之含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量影響之比較

Table 7. Comparisons of the effects of different additive treatments and ensiling times on mimosine, 3,4-DHP and 2,3-DHP content in *Leucaena leucocephala* silage

	mimosine	3,4-DHP	2,3-DHP
	% of DM		
Before ensiling	1.6	1.01	0.29
Additive treatment			
CK [†]	0.5 ± 0.1 ^{a‡}	0.92 ± 0.05 ^a	0.17 ± 0.02 ^a
L	0.3 ± 0.0 ^b	0.92 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.01 ^a
LM	0.3 ± 0.0 ^b	0.80 ± 0.03 ^b	0.16 ± 0.01 ^a
Ensiling time			
30 d	0.4 ± 0.1 ^a	0.92 ± 0.04 ^a	0.19 ± 0.02 ^a
73 d	0.4 ± 0.1 ^a	0.85 ± 0.04 ^a	0.16 ± 0.02 ^a
120 d	0.4 ± 0.0 ^a	0.86 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.01 ^a

[†] CK, without any addition; L, addition of lactic acid bacteria; LM, addition of lactic acid bacteria and molasses.

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

銀合歡藉由添加米糠、蔗糖、乳酸菌後青貯，均可顯著提升青貯品質並降低含羞草鹼含量（Anghong *et al.*,

2007; Chen *et al.*, 2014), 本試驗結果顯示青貯有助於降低含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量, 其中對於含羞草鹼與 2,3-DHP 的降幅尤為顯著(表 7)。各處理中以添加糖蜜與乳酸菌之效果最佳, 青貯後之含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量分別為 0.3、0.83 及 0.16%, 均顯著低於對照組與僅添加乳酸菌者, 僅添加乳酸菌之含羞草鹼含量亦低於無添加者, 但 3,4-DHP 與 2,3-DHP 含量在兩種處理間無顯著差異, 此與 Chen *et al.* (2014) 研究結果相似, 添加蔗糖與乳酸菌之青貯可使含羞草鹼含量降低 48%, 僅添加乳酸菌與無添加之含羞草鹼含量僅分別降低 30.7 與 25.5%。

本試驗三種青貯時間之含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量均低於青貯前, 但青貯時間長短對於三者含量之影響均無顯著差異, 分別為 0.4%、0.85% – 0.92% 及 0.16% – 0.19%, 此結果與 Angthong *et al.* (2007) 相同, 銀合歡葉片青貯前之含羞草鹼含量為 1.79%, 青貯 21、51、81 及 111 天後分別為 0.13、0.14、0.16 及 0.12%, 彼此間無顯著差異, 可降低含羞草鹼含量 91.06 – 93.30%。然而, Chen *et al.* (2014) 研究顯示, 相同青貯時間下以青貯發酵品質較佳(低 pH、高乳酸、低乙酸、丙酸及丁酸含量)之含羞草鹼含量顯著較低, 其含羞草鹼降低之速度與程度亦較顯著, 又發酵達穩定狀態後, 含羞草鹼含量不會隨著青貯時間延長而下降。由青貯後之結果顯示(表 7), 在各種添加處理與青貯時間延長下, 含羞草鹼與 2,3-DHP 含量降低顯著, 3,4-DHP 含量雖下降但程度未若其他兩者, 推測青貯發酵可有效降低含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量, 但 3,4-DHP 之降解與含羞草鹼代謝為 3,4-DHP 之間可能相互抵消, 造成青貯後之 3,4-DHP 含量下降不顯著。

結 論

本試驗以不同添加處理(無添加、糖蜜、糖蜜與乳酸菌)及青貯時間(30、73 及 120 天)進行銀合歡青貯試驗, 添加糖蜜與乳酸菌經青貯 30 天後即具有優良之青貯品質, 亦能顯著降低其含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量, 僅添加乳酸菌與無添加者均需至青貯 73 天後才具有相同之青貯品質與代謝物含量。試驗結果顯示青貯發酵可降低銀合歡之含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量, 當發酵穩定後, 青貯品質與含羞草鹼、3,4-DHP 及 2,3-DHP 含量不再隨青貯時間延長而變動。

參考文獻

- 王勝德、蘇安國、楊深玄。2010。有機銀合歡進行臺灣黑山羊有機生產之可行性研究。畜產研究 39: 199-209。
- 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. 2004. Reproductive performance, colostrum and milk constituents of mimosine-adapted South African Nguni goats on *Leucaena leucocephala*-grass or natural pastures. Small Rumin. Res. 52: 253-260.
- Angthong, 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.
- A. O. A. C. 2019. Official Methods of Analysis. 21st ed. Assoc. Offic. Anal. Chem., Arlingmt, VA.
- Blaney, B. J. 2005. Plant and fungal toxins as contaminants of feed and meat. In: Improving the safety of fresh meat. Woodhead Publishing. pp. 77-101.
- Casanova-Lugo, F., J. Petit-Aldana, F. J. Solorio-Sánchez, D. Parsons, and L. Ramírez-Avilés. 2014. Forage yield and quality of *Leucaena leucocephala* and *Guazuma ulmifolia* in mixed and pure fodder banks systems in Yucatan, Mexico. Agrofo. Syst. 88: 29-39.
- Chanchay N., and N. Poosaran. 2009. The reduction of mimosine and tannin contents in leaves of *Leucaena leucocephala*. As. J. Food and Ag-Ind. Special Issue: S137-S144.
- 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.
- 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.
- Giang, N. T. T., M. Wanapat, K. Phesatcha, and S. Kang. 2016. Level of *Leucaena leucocephala* silage feeding on intake,

- rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy steers. *Trop. Anim. Health Prod.* 48: 1057-1064.
- 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.
- Honda, M. 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.
- 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.
- Jones, R. J. 1981. Does ruminal metabolism of mimosine explain the absence of leucaena toxicity in Hawaii ?. *Aust. Vet. J.* 57: 55-56.
- Jones, R. J. and R. G. Megarrity. 1986. Successful transfer of DHP-degrading bacteria from Hawaiian goats to Australian ruminants to overcome the toxicity of *Leucaena*. *Aust. Vet. J.* 63: 259-262.
- Negi, V. S., J. P. Bingham, Q. X. Li, and D. Borthakur. 2014. A carbon-nitrogen lyase from *Leucaena leucocephala* catalyzes the first step of mimosine degradation. *Plant Physiol.* 164: 922-934 .
- Shelton, H. M. and J. L. Brewbaker. 1994. *Leucaena leucocephala* – the most widely used forage tree legume. In: Gutteridge, R. C., Shelton, H. M. (eds.), *Forage tree legumes in tropical agriculture*. CAB Intl. pp. 15-29. Oxon, UK.
- Vijayakumar, S. and P. Srinivasan. 2018. Clinical management of spontaneous *Leucaena leucocephala* (Subabul) poisoning in non descriptive goat. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7: 1148-1151.
- 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.
- Wang, Y., X. Chen, C. Wang, L. He, W. Zhou, F. Yang, and Q. Zhang. 2019. The bacterial community and fermentation quality of mulberry (*Morus alba*) leaf silage with or without *Lactobacillus casei* and sucrose. *Bioresour. Technol.* 293: 122059.
- 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-dihydropyridine 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.

Study on *Leucaena leucocephala* with different ensiling treatments for silage use ⁽¹⁾

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

Received: Mar. 11, 2025; Accepted: May 23, 2025

Abstract

Leucaena leucocephala (leucaena) is characterized by rapid growth, strong environmental adaptability, and high regenerative capacity. Its leaves, tender branches, and pods are highly palatable and rich in nutrients, making it a suitable forage resource for ruminants. However, its utilization is limited due to the presence of mimosine, a toxic compound to animals. This study aimed to investigate the effects of different additive treatments (no additives (CK), 2×10^6 cfu/kg lactic acid bacteria (LAB), and 5% molasses with 2×10^6 cfu/kg LAB) and ensiling duration (30, 73, and 120 days) on the silage quality of leucaena, and the contents of mimosine and its toxic metabolites, 3,4-dihydropyridine (3,4-DHP) and 2,3-dihydropyridine (2,3-DHP). The results showed that silage with molasses and LAB reached a pH of 4.5 and achieved a Flieg's score of 97.7, indicating excellent quality after 30 days of ensiling. In contrast, CK or with only LAB required 73 days of storage to reach a pH of 5.2, with corresponding Flieg's scores of 92.7 and 95.3, respectively. Among all treatments, the silage containing molasses and LAB exhibited the best silage quality, with a lower pH (4.4), higher lactic acid content (6.34%), and a higher silage score (95.6). There were no significant differences in volatile fatty acid content or silage score between CK and only LAB treatment. As ensiling time increased, the pH of CK and only LAB treatment silage decreased, while acetic acid and lactic acid contents increased; however, these changes did not significantly affect the silage score. Ensiling effectively reduce the contents of mimosine, 3,4-DHP, and 2,3-DHP in leucaena, with the most significant reductions observed in mimosine and 2,3-DHP ($P < 0.05$). The greatest degradation was achieved with molasses and LAB treatment, resulting in final concentration of mimosine, 3,4-DHP, and 2,3-DHP of 0.3, 0.8, and 0.16%, respectively. Furthermore, ensiling time had no significant effect on the residual content of mimosine and its metabolites. In conclusion, the results of this study indicated that the silage quality of leucaena can be significantly improved and its toxicity effectively reduced by addition of molasses and lactic acid bacteria. Once fermentation stabilizes, further ensiling does not substantially alter silage quality or the concentrations of mimosine, 3,4-DHP, and 2,3-DHP, which can serve as a reference for use.

Key words: Ensiling time, Lactic acid bacteria, *Leucaena leucocephala*, Molasses, Silage.

(1) Contribution No. 2828 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

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

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

(4) Southern Region Branch, MOA-TLRI, Pingtung 946004, Taiwan, R. O. C.

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