

國立臺灣大學生物資源暨農學院動物科學技術學系



碩士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

國產苜蓿、盤固草半乾青貯添加綜合乳酸菌、糖蜜與
丙酸銨對於半乾青貯品質以及泌乳羊生產表現之影響

Effect of Adding Mixed Lactic Acid Bacteria, Molasses
and Ammonium Propionate on Domestic Alfalfa and
Pangolagrass Haylage Quality and Lactating Goat

Performance

黃孝義

Hsiao-Yi Huang

指導教授：徐濟泰 博士

Advisor: Jih-Tay Hsu, Ph.D.

中華民國 109 年 7 月

July, 2020

誌謝



本論文能夠順利完成，首先要感謝徐濟泰老師在碩士班兩年內對我的指導與鼓勵，並且讓我在這兩年的時間內有很多的機會可以去嘗試許多不同的事情；再來要感謝王翰聰老師在體外及原位消化試驗上給我的建議，讓我能夠順利完成試驗，若未來還有機會再做體外試驗，單向閥絕對會是我的首選；感謝王紓愨博士與李春芳博士撥空擔任我的口試委員，並給予我許多寶貴的建議，使本論文能更加完善。

感謝行政院農業委員會計畫「牧草黴菌毒素篩檢監測與控制(IV)」(108 農科-2.3.4-牧-U1(4))提供經費；感謝畜產試驗所恆春分所陳嘉昇所長、王紓愨博士、游翠鳳女士與劉信宏先生，在我下去恆春做草時提供我許多的協助；感謝筱薇學姊與智宏學長對於這個牧草計畫所付出的努力，讓我能夠接續著你們的成果，繼續完成後續的研究；感謝大蘭陽牧羊場提供我試驗用的羊隻；感謝台大農場鄭位明技正、高仕軒技士、陳振隆技士、羊舍阿姨、羊舍阿伯，在我進行對物試驗與體外試驗時給予我許多的協助。感謝系辦公室廖奕雯學姊與游位育學長，在生活上與行政上的協助，特別是 GC 軟體的採購案，在此由衷感謝。

感謝 307 實驗室所有的人；感謝摯友火車在我碩一時跟我一起去健身、慢跑、打球，讓我在忙碌的研究之餘能夠釋放壓力；感謝岫秀在我動物試驗遇到瓶頸時給予我的鼓勵與陪伴，並且在行政上也給予我許多的幫助；感謝旻毅在我實驗上需要幫忙時，總是義不容辭地跳出來幫忙；感謝昱成、莘惠、昀融、柏勳、宇哲、玫淇、苓祐與東東在實驗室生活上扶持與陪伴，並共同維持實驗室的整潔。

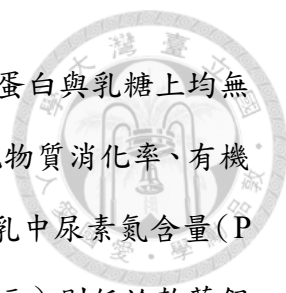
最後感謝我的父母 24 年來的栽培與教導，並且讓我在沒有經濟壓力的狀況下完成我的學業。

摘要



本研究目的在探討綜合乳酸菌、糖蜜與丙酸銨對於國產牧草半乾青貯發酵與表層發霉之效果並評估此模式下調製出來的半乾青貯對於泌乳羊生產表現之影響。本試驗分成兩個階段，第一個階段接續陳等(2019)之盤固草半乾青貯研究，探討盤固草半乾青貯在綜合乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*, *L. buchneri*, *Pediococcus acidilactici*) 與表層 3%丙酸銨的處理之下，10 週與 42 週開封性狀之差異；與接續劉(2018)之研究，探討苜蓿半乾青貯草捆在不同處理下之差異：(1) 對照組 (未處理草捆)；(2) 處理組：內部綜合乳酸菌 (*L. plantarum*, *L. buchneri*, *P. acidilactici*; 1×10^6 in fresh grass)、3%糖蜜與外部 3%丙酸銨。第二階段分別以體內以及體外試驗的方式評估半乾青貯的營養價值，在動物試驗當中一共使用四頭泌乳中期的阿爾拜因泌乳羊個別飼養於代謝籠中，採交叉試驗設計的方式分成兩組進行試驗，一組餵飼以半乾青貯為主之飼糧，另外一組餵飼以乾草為主之飼糧 (精芻比 50:50)，並調整精料中玉米跟大豆粕的比例，使兩組在等能量、等蛋白質的狀況下進行試驗。

在盤固草半乾青貯的試驗當中，42 週與 10 週開封之草捆在發霉的比例、表層霉斑的數量與 pH 值上均無顯著差異，而 42 週相較於 10 週則有較高的乳酸與乙酸含量 ($P < 0.05$)，顯示在綜合乳酸菌與表層 3%丙酸銨的共同處理下，能夠使盤固草半乾青貯在正常的保存環境下，穩定的存放 42 週。在苜蓿半乾青貯的試驗當中，處理組相較於對照組具有較低的中洗纖維、水溶性碳水化合物含量與 pH 值 ($P < 0.05$) 並且有較高的乳酸含量與瘤胃中有效可降解乾物質 ($P < 0.01$)，顯示綜合乳酸菌與糖蜜的添加能夠促進苜蓿半乾青貯的發酵狀態並改善其可消化營養組成性狀，然而 pH 值改變的幅度並不是很大 (對照組：5.54；處理組：5.34)，可能與本研究苜蓿半乾青貯乾物質比例較高有關 (Dry matter：63.86%)，在表層霉斑的數量上，處理組相較於對照組有較低的趨勢 ($P = 0.07$)，而在黴菌毒素的檢測當中，兩個組別均有發現玉米烯酮毒素超標的現象；在動物試驗當中，半乾青貯飼糧組與乾



草飼糧組在乾物質採食量、有機物質採食量、泌乳量、乳脂、乳蛋白與乳糖上均無顯著差異，而半乾青貯飼糧組相較於乾草飼糧組則是有較高的乾物質消化率、有機物質消化率、非纖維碳水化合物消化率與採食量，並且有較低的乳中尿素氮含量($P < 0.05$)，在成本的計算上，半乾青貯飼糧（每公斤乾物質 8.083 元）則低於乾草飼糧（每公斤乾物質 10.243 元）。

綜合上述試驗結果，綜合乳酸菌與 3%丙酸銨的添加，能夠使盤固草半乾青貯穩定的保存 42 週；而綜合乳酸菌、3%糖蜜與 3%丙酸銨的添加，則是能夠促進苜蓿半乾青貯的發酵狀態與改善其可消化營養組成性狀，並且對於表層霉斑的抑制也有部分效果，然而在 pH 值變動的幅度上則較不明顯；若以本試驗所調製出之半乾青貯作為泌乳羊之芻料來源，能夠使泌乳羊維持與乾草飼養下相等的乾物質採食與泌乳表現，並且能夠提供夠多的非纖維碳水化合物給予泌乳羊，同時使酪農戶之飼料成本降低五分之一。

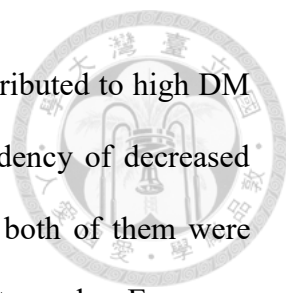
關鍵詞：苜蓿半乾青貯、盤固草半乾青貯、丙酸銨、糖蜜、乳酸菌、黴菌、營養價值。

Abstract



The aim of this study was to evaluate the effect of mixed lactic acid bacteria (LAB), molasses, and ammonium propionate (AP) on domestic haylage fermentation, surface spoilage and lactating goat performance. This study was divided into two parts. The first part followed Chen et al. (2019) and Liu (2018), continued on studying the difference between pangolagrass haylage with the addition of mixed LAB (*Lactobacillus plantarum*, *L. buchneri*, *Pediococcus acidilactici*) and 3% AP after 10 weeks' and 42 weeks' ensiling, and examining the the difference between alfalfa haylage under different treatments: (1) control group (deionized water) (2) treatment group (3.33×10^5 cfu/g of *L. plantarum*, 3.33×10^5 cfu/g of *L. buchneri*, 3.33×10^5 cfu/g of *P. acidilactici*, 3% molasses, and 3% ammonium propionate). In the second part of this study, we used *in vivo*, *in vitro* and *in situ* methods respectively to evaluate the feeding value of haylage produced in the first part of the present study. In feeding experiment, a crossover experimental design using 4 mid-lactation Alpine goats in metabolic cages was set up to compare the feeding value of haylage based diet to hay based diet (concentrate : forage = 50 : 50). The crude protein and metabolizable energy of two groups were equalized by adjusting the proportion of corn and soybean meal in the concentrate.

There was no statistically significant difference on surface spoiled rate, spoilage spot, and pH value between pangolagrass haylage after 10 and 42 weeks' ensiling, whereas pangolagrass haylage after 42 weeks' ensiling had higher lactic acid and acetic acid content than pangolagrass haylage after 10 weeks' ensiling ($P < 0.05$). In alfalfa haylage experiment, treatment group had lower pH value, neutral detergent fiber, and water soluble carbohydrate contents ($P < 0.05$) and higher lactic acid content and effective DM degradability than control group ($P < 0.01$). However, the changes of pH value were



limited (treatment group: 5.34; control group: 5.54). This may be attributed to high DM content before ensiling (DM: 63.68%). Treatment group had a tendency of decreased surface spoilage spot than control group ($P = 0.07$). Nevertheless, both of them were found to contain zearalenone exceeding the advisory levels set up by European commission. In lactating goat feeding experiment, DM intake, organic matter intake, milk yield, milk fat, milk protein, and lactose did not differ between two different diets. However, dairy goats fed haylage diet had higher DM, OM, and non-fiber carbohydrate digestibilities and intake and lower milk urea nitrogen than hay diet ($P < 0.05$). In addition, the cost of haylage diet (8.083 NT\$/kg DM) was lower than hay diet (10.243 NT\$/kg DM).

In conclusion, pangolagrass haylage treated with mixed LAB and 3% AP could keep quality stable under 42 weeks' storage in normal condition, and adding mixed LAB, 3% molasses, and 3% AP on alfalfa haylage could improve fermentation quality and digestive indices and inhibit surface spoiled condition. However, the changes of pH value were limited. Using alfalfa and pangolagrass haylage to replace all the hay could maintain the same DM intake, production performance, and provide more non-fiber carbohydrate for lactating goats, and meanwhile reduce feed cost up to 20%.

Key words: Alfalfa haylage, Pangolagrass haylage, Ammonium propionate, Molasses, Lactic acid bacteria, Mould, Feeding value.

目錄



誌謝	I
摘要	II
Abstract.....	IV
目錄	VI
圖次	VII
表次	VIII
前言	1
壹、文獻探討	2
一、臺灣國產芻料現況	2
二、芻料的保存方式	5
三、青貯的發酵模式 (Ensilage)	10
四、參與青貯發酵之微生物	14
五、青貯中常見之黴菌毒素	20
六、青貯添加物 (Silage additives)	27
貳、材料與方法	32
一、半乾青貯草捆製作	32
二、半乾青貯草捆開封採樣、分析	36
三、體外乾物質消化率與原位消化試驗	43
四、泌乳羊試驗	45
五、樣品分析方法	51
六、統計模式	60
參、結果討論	61
一、添加物於中型半乾青貯膠膜草捆應用上之成效	61
二、盤固草與苜蓿半乾青貯營養價值評估	81
肆、結論	101
伍、參考文獻	102
陸、附錄	121

圖次



圖 1. 近十年國產牧草種植面積與鮮草年產量	2
圖 2. 臺灣近十年反芻動物在養頭數	3
圖 3. 近十年臺灣芻料總進口量	3
圖 4. 青貯調製不同階段中所發生的變化	11
圖 5. 乳酸菌代謝六碳糖之主要代謝路徑	15
圖 6. 乳酸菌代謝五碳糖之代謝路徑	15
圖 7. 黃麴毒素 B、G、M 之化學結構	22
圖 8. 玉米烯酮毒素之化學結構	25
圖 9. 伏馬鐮孢毒素之化學結構	26
圖 10. 布氏乳酸桿菌在厭氧環境下代謝乳酸之途徑	30
圖 11. 半乾青貯草捆製作、採樣時間軸	33
圖 12. 丙酸銨噴灑模式與劑量	34
圖 13. 苜蓿、盤固草半乾青貯採樣流程	36
圖 14. 靛酚生成化學反應式	39
圖 15. 開封穩定性測試 PVC 管	42
圖 16. 盤固草半乾青貯之表層霉斑	65
圖 17. 苜蓿半乾青貯表層霉斑生長情形	80
圖 18. 苜蓿半乾青貯開封穩定性測試	80
圖 19. 半乾青貯與乾草乾物質在瘤胃裡消失的情形	97
圖 20. 中洗纖維含量與瘤胃中有效可消化乾物質之關係	100

表次



表 1. 國內各地區適合栽種之芻料作物種類與栽種時期	4
表 2. 乾草調製過程中各階段所造成的乾物質損失	6
表 3. 不同芻料作物之酸鹼緩衝能力與 pH 值	7
表 4. 青貯發酵中不同代謝路徑對乾物質及總能的損耗	12
表 5. 青貯中重要的梭狀芽孢桿菌與其分類	16
表 6. 反芻動物飼糧中各種常見黴菌毒素濃度上限規範	21
表 7. 青貯添加物的分類	28
表 8. 人工唾液組成	44
表 9. 試驗羊隻起始體重、採食量與乳產量	45
表 10. 動物試驗中各原料之化學組成	47
表 11. 半乾青貯與乾草組之飼糧配方與營養組成	48
表 12. 動物試驗中半乾青貯與乾草之黴菌毒素含量	49
表 13. 中性洗劑配方	57
表 14. 酸性洗劑配方	58
表 15. 盤固草半乾青貯 10 週與 42 週發霉狀況之比較	65
表 16. 盤固草半乾青貯 10 週與 42 週發酵品質之比較	66
表 17. 其他研究之盤固草青貯與半乾青貯發酵品質	67
表 18. 苜蓿半乾青貯與原始苜蓿草之化學組成與 pH 值	72
表 19. 綜合乳酸菌、糖蜜與丙酸銨對於苜蓿半乾青貯揮發性脂肪酸與青貯評分之 影響	73
表 20. 其他研究之苜蓿青貯與半乾青貯發酵品質	74
表 21. 苜蓿半乾青貯之表層發霉狀態與微生物數量	78
表 22. 苜蓿半乾青與原始苜蓿草之黴菌毒素含量	79

表 23. 不同飼糧組成對於阿爾拜因泌乳羊各組成分日採食量之影響.....	83
表 24. 不同飼糧組成對於阿爾拜因泌乳羊各組成分表面消化率之影響.....	85
表 25. 不同飼糧組成對於阿爾拜因泌乳羊乳產量與飼糧利用效率之影響.....	87
表 26. 不同飼糧組成對於阿爾拜因泌乳羊乳組成之影響.....	89
表 27. 添加物使用成本與各蜀料之價格.....	91
表 28. TMR 價格之計算.....	92
表 29. 生乳中可能殘留之黴菌毒素濃度預估.....	93
表 30. 盤固草半乾青貯與乾草之體外乾物質消化率與瘤胃乾物質分解性狀.....	98
表 31. 苜蓿半乾青貯與乾草之體外乾物質消化率與瘤胃乾物質分解性狀.....	99
附表 1. Fleig 氏青貯品質評分表.....	121

前言



飼料成本佔草食動物生產成本約四到五成，其中以進口乾草為大宗，進口乾草的總量從 2009 年的 19 萬公噸到 2018 年的 27 萬公噸，呈現逐年增長的趨勢；而在受限於產量與品質穩定性的情況下，國產芻料的自給率在近十年始終低於 53%。若是能針對現存調製問題，開發關鍵技術，並搭配行政院農業委員會自 102 年起實施的「調整耕作制度活化農地計畫」，應有助於國產牧草品質維護並提高其應用性，達到取代進口乾草、降低草食動物生產成本之目的。

芻料的保存方式可分成乾草、青貯與半乾青貯；惟臺灣屬於亞熱帶季風氣候，春夏季受梅雨、午後雷陣雨、颱風等天氣因子影響；冬季受東北季風影響，很難有較長的曝曬時間供穩定的製成品質優良的乾草，因此縮短芻料收割後的萎凋時間，製成水分含量較高的青貯與半乾青貯是另一種保存方式的選擇。由於水分含量較高，在保存的過程中若無法有效阻隔氧氣的滲入(如運送過程中包裝表層膠膜的破損)，容易導致黴菌的滋生，進而產生黴菌毒素汙染的問題，如黃麴毒素、嘔吐毒素、伏馬鐮孢毒素、玉米烯酮毒素、赭麴毒素與 T-2 毒素等，均是常見於牧草中的黴菌毒素；此外牧草中較低的水溶性碳水化合物含量與豆科作物較強的酸鹼緩衝能力，皆不利於青貯製作前期的發酵，而妥善的控制水分並適度的使用添加物，能改善青貯的發酵狀態與保存過程中的穩定性。常見的添加物包含乳酸菌、有機酸類與富含碳水化合物的營養物質；乳酸菌能產生大量的乳酸降低 pH 值，使青貯快速達到穩定狀態；有機酸可以抑制黴菌、梭狀芽孢桿菌等雜菌生長，穩定青貯的保存狀態；而糖蜜、黑糖等富含碳水化合物的物質，則作為微生物在發酵時碳源的補充。

本研究接續劉(2018)針對苜蓿半乾青貯所求得最佳添加物使用量，將其放大應用於中型膠膜草捆中(約 200 kg)，評估添加物在此模式中使用之成效；並接續陳等(2019)之盤固草半乾青貯試驗，共同評估兩種半乾青貯對於泌乳羊生產表現之影響。



壹、文獻探討

一、臺灣國產芻料現況

臺灣現有種植的牧草種類包含禾本科與豆科兩類，其中以禾本科作物為主，常見的禾本科作物有盤固草、狼尾草、尼羅草、青割玉米與蘇丹草等，而豆科作物則有苜蓿草、埃及三葉草與多年生花生等。在上述的牧草當中，以盤固草、狼尾草與青割玉米三種作物的種植面積與產量為最大宗。臺灣 107 年度盤固草總種植面積約為 2,800 公頃、年產近 21 萬公噸鮮草；狼尾草總種植面積約為 2,000 公頃、年產 28 萬公噸鮮草（行政院農業委員會，2019）。在近十年的變化趨勢裡，國產盤固草與狼尾草整體在產量上變動不大，惟狼尾草有微幅下降的趨勢（99 年 32.1 萬公噸；108 年 27.7 萬公噸），國產牧草的總產量則是在 76 到 94 萬公噸之間波動，主要變動還是由於農委會於 102 年所推動之「調整耕作制度活化農地計畫」，使得短

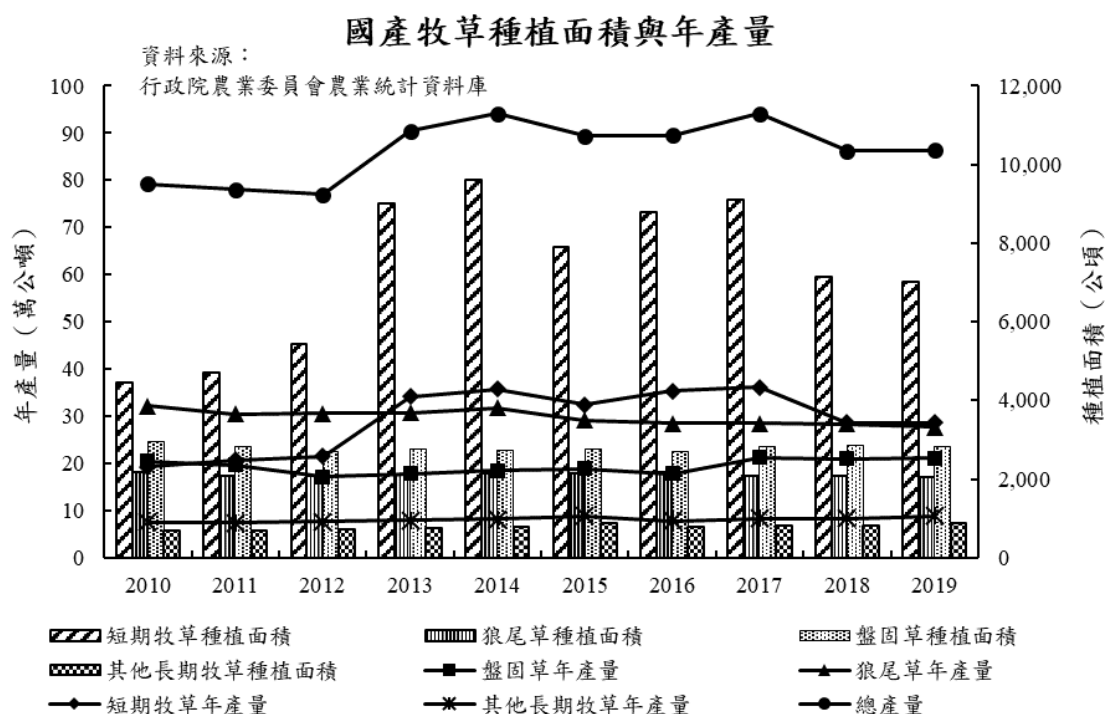


圖 1. 近十年國產牧草種植面積與鮮草年產量。

Figure 1. The planting area and yield of domestic fresh forage over the past decade.

期牧草作物在 102 年之後栽種面積與產量有明顯的上升（圖 1），但以現有國產牧草的總產量還是不足以滿足國內市場所需，而大型反芻獸的在養頭數卻逐年上升的情況下（圖 2），農民勢必要另尋出路，與之相應的就是進口芻料的總量逐年上升（圖 3）。

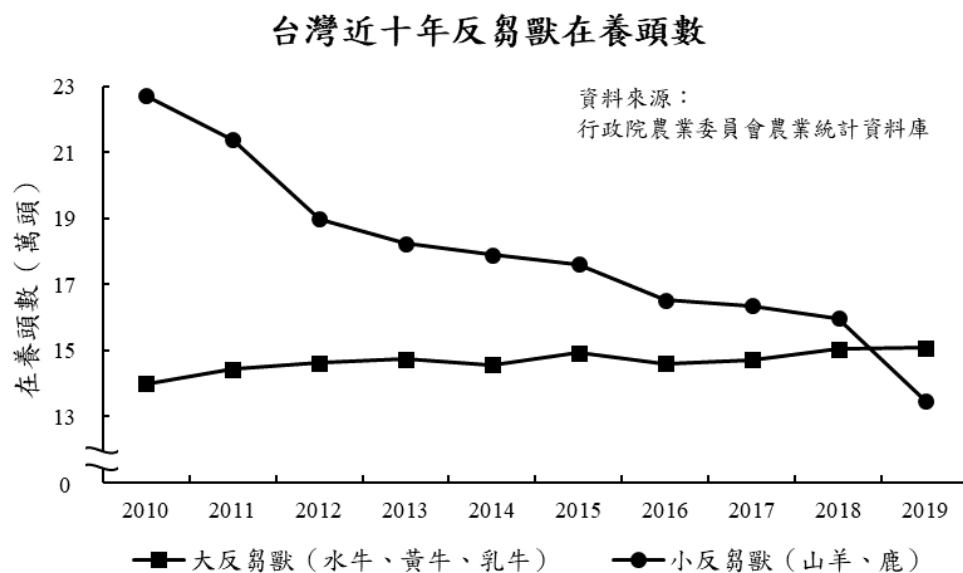


圖 2. 臺灣近十年反芻動物在養頭數。

Figure 2. Head of ruminants over the past decade in Taiwan.

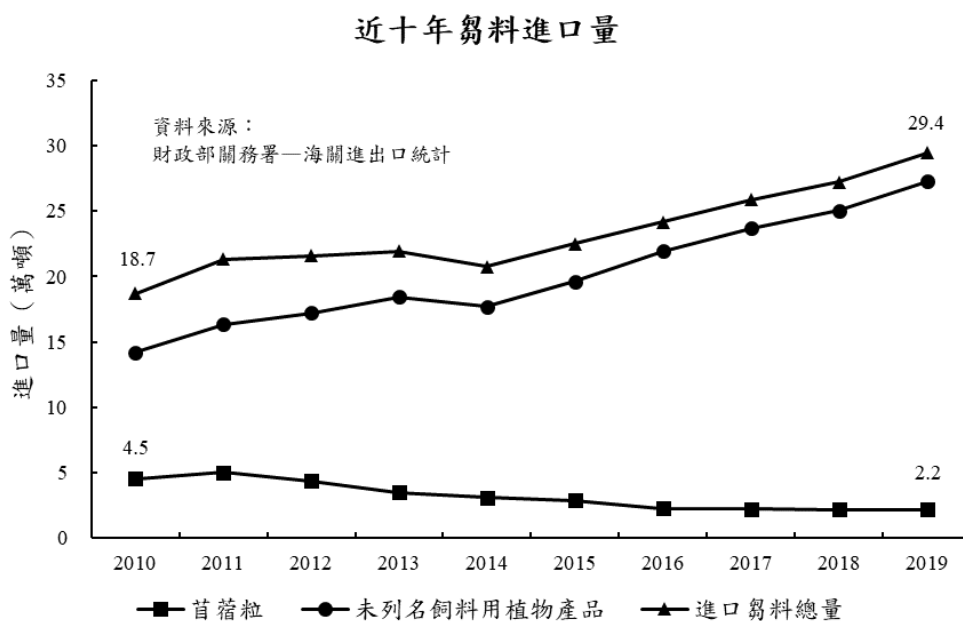


圖 3. 近十年臺灣芻料總進口量。

Figure 3. The amount of forages imported into Taiwan over the past decade.



(一) 調整耕作制度活化農地計畫

為因應國內休耕地面積逐年上升，農委會於 102 年起推動「調整耕作制度活化農地計畫」，鼓勵農民復耕種植具進口替代、外銷潛力之作物，或是種植地區特產與有機作物，並依照作物種類每期作每公頃給予 1.5 到 4.5 萬元不等之補貼，在推廣國產牧草種植上，農委會畜產試驗所亦針對不同地區規劃了適合種植之作物與時期供農民參考（表 1）。依據農委會所提供之資料，102 年所申報之休耕地面積，相較於 101 年減少了 8.8 萬公頃（行政院農業委員會，2014），而在這一年國產牧草的種植面積也有所提升（圖 2），可見在此項政策推動後，對於休耕地復耕與提高國產芻料自給率有很大的幫助。

表 1. 國內各地區適合栽種之芻料作物種類與栽種時期（盧啟信，2013）

Table 1. Recommended forage species and planting period for different area in Taiwan

區域	多年生品種	短期品種
北部地區 (台北、桃園、新竹、苗栗)	狼尾草、盤固草、 尼羅草(需有灌溉系統)	燕麥、埃及三葉草(10月後)
中部地區 (台中、彰化、南投)	狼尾草、盤固草、 尼羅草(需有灌溉系統)	埃及三葉草(10月後) 青割玉米：彰化地區 (春作：3月前、秋作：9月後)
雲嘉南地區 (雲林、嘉義、台南)	狼尾草、盤固草、 尼羅草(需有灌溉系統)	青割玉米 (春作：3月前、秋作：9月後)
高屏地區 (高雄、屏東)	狼尾草、盤固草、 尼羅草(需有灌溉系統)	青割玉米 (春作：3月前、秋作：9月後)
花東地區 (台東、花蓮)	狼尾草、盤固草、 尼羅草(需有灌溉系統)	



二、芻料的保存方式

芻料的利用可以分成青飼或調製成乾草、青貯與半乾青貯。以青飼方式於芻料收割後直接餵飼給反芻動物，雖然一樣能夠提供給動物足夠的營養需求且適口性也較佳，但芻料品質隨收割時間的變動較大、品質難以掌握，而臺灣又以種植熱帶牧草（如狼尾草、盤固草等）為主，品質及產量在季節上落差很大，無法全年穩定供應。為了要使全年度都有穩定的芻料供應給反芻動物，勢必得將收割下來的牧草調製成乾草、青貯或半乾青貯，以延長牧草的存放時間。

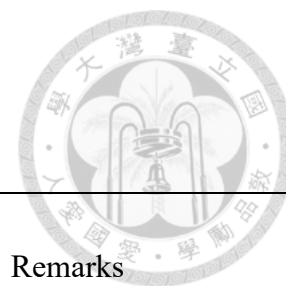
（一）乾草調製（Hay making）

乾草為保存芻料的方法之一，我國目前主要生產的乾草為盤固草，其次為尼羅草。乾草的調製主要分為六個步驟：割草、翻草、集草、捆包、裝運、儲存；在調製的過程中需經由日曬風乾待牧草含水量降至 20% 以下時，方可進行集草捆包，此過程約需 3 至 5 天的曝曬；但由於臺灣夏季多雨、植株生長速度快，若無法順利於牧草品質最佳時期進行乾草調製，容易導致植株過於老化、營養價值下降。在臺灣南部地區，則可利用冬季溫度尚高時進行乾草調製，此時期相對降雨機率較小，比較容易調製出品質優良的乾草。

乾草於調製的過程中約會造成 18 到 30% 的乾物質損失，這中間包含植物細胞於收割後繼續進行的呼吸作用與微生物的代謝作用，將牧草內的碳水化合物持續代謝成二氧化碳，直到含水量低於 20% 時才會停止代謝；除了生物性的原因之外，割草、翻草、集草與捆包的過程，皆會造成整體乾物質的損失，而良好的乾燥條件則可以減少調製過程中所造成的乾物質損失 (Rees, 1982)。表 2 整理了乾草調製過程中各階段所造成乾物質損失的比例。

表 2. 乾草調製過程中各階段所造成的乾物質損失

Table 2. Summary of dry matter losses at each stage of haymaking



Source of loss		Loss, % of original dry matter	Remarks
Respiration	Field	10	Affected by numerous factors. Figure could easily be much higher
	Storage	1	Assumes a storage moisture content of around 20% (w.b.)
Micro-organism	Field	2-4	Will only reach this level under very wet or humid conditions. Normally loss is negligible
	Storage	1	Could be much greater if stored at 40% ⁺
Cutting	Reciprocating type	2-4	Higher values have been quoted in extreme cases
	Flail type	3-8	
Turning		2-3	Values with moisture content
Tedding	Normal type	2-3	
	Spreading type	2-8	
Swath formation		1	Could be greater if the crop is very dry
Baling		1	
Leaching	Lacerated	5.5	Produced by the equivalent of 18 mm of rainfall
	Non-lacerated	3	
Overall total loss		18-30	Under excellent drying conditions, loss could be reduced by 15%

Reference: Rees, 1982



(二) 青貯調製 (Silage making)

青貯是利用厭氧發酵來保存芻料的一種方式。理想的青貯作物收割後水分含量應在 70% 上下，隨即將其壓實至密閉容器內，此時附著於芻料上的乳酸菌以厭氧發酵的方式代謝生成乳酸，降低芻料的 pH 值以抑制其他微生物的生長，達到保存芻料的效果。但並不是所有芻料皆適合調製成青貯，青貯的抑菌能力仰賴 pH 值的降低，當植體的酸鹼緩衝能力 (Buffering capacity) 過高時，環境中的酸鹼值不易下降，此時容易導致雜菌滋生；而植體本身水溶性碳水化合物 (Water soluble carbohydrate, WSC) 過低，也會使乳酸的產量不足，進而影響青貯的發酵狀態。若要調製出理想的青貯草，植物本身的酸鹼緩衝能力需小於 350 meq/kg of dry matter，WSC 含量需大於 12% (dry matter basis) (Kaiser et al., 2004)。如果不符合以上條件，則須考慮降低水分含量提高乾物率，改調製成半乾青貯，使發酵能夠更順利進行。常見不同芻料作物之酸鹼緩衝能力與 pH 值如表 3 所示，苜蓿就是屬於酸鹼緩衝能力偏高的芻料。

表 3. 不同芻料作物之酸鹼緩衝能力與 pH 值

Table 3. Buffering capacity and pH value of some herbage species

Species	pH value	Buffering capacity (meq/kg DM)
Ryegrass ¹	6.3	340
Clover ¹	5.7	510
Lucerne ¹	6.2	580
Cocksfoot ²	—	253
Perennial ryegrass ²	6.1	386
Red clover (wilted) ²	5.8	491
White clover ²	—	512

¹Reference: Greenhill, 1964.

²Reference: Playne and McDonald, 1966.




(三) 半乾青貯調製 (Haylage making)

半乾青貯與青貯保存牧草的機制類似，都屬於利用發酵來降低環境的 pH 值，達到延長牧草存放時間的效果，而兩者最大的差異在於半乾青貯的含水量約在 50% 上下 (Müller, 2005; Gordon et al., 1961)，相對於青貯草來說有較高的乾物率，適合用來調製水溶性碳水化合物含量較低的芻料，如盤固草 (3.5~6.3%; 王等, 2002) 等；而豆科作物在乾草打包的過程中容易造成葉片損失 (Collins, 1991)，若是調製成半乾青貯，因水分含量高於乾草，濕潤的葉片較不易粉碎散失，因此可以減少葉片損失的比例 (Han et al., 2004)。

我國目前半乾青貯的製作方式多以圓形打包機 (Round baler) 進行打包，打包完成後再以膠膜捆包以維持厭氧環境；然而表層膠膜有可能在儲藏堆放、搬運的過程中破損，因而造成半乾青貯表層霉斑的比例增加，若是將保存時間拉長，表層破損所造成的負面影響將會更嚴重 (McNamara et al., 2002)；O'Brien et al. (2008) 針對愛爾蘭島 180 家牧場進行調查，發現以膠膜捆包之青貯在長期保存之下 (大於五個月)，有高達 90% 之青貯表層有霉斑生長的情形出現；顯示若以膠膜捆包的形式來保存半乾青貯或青貯，在調製上必須要特別注意表層黴菌生長的情形。

1. 盤固草半乾青貯 (Pangolagrass haylage)

盤固草，學名 *Digitaria decumbens*，原產於南非 Pangola 河沿岸，屬於熱帶禾本科牧草 (Warm-season grass, C4 grass)，在熱帶禾草當中屬於品質尚佳的牧草。高溫下，盤固草生長迅速，植株不可消化部分隨生長時間迅速累積，因此夏季生長之盤固草必須盡早收穫 (六週之內)，然而臺灣夏季多雨，適逢收穫時在現場操作上非常不易，若萎凋時下雨則無法順利製成乾草，延後收割又會導致植株過於成熟，營養價值降低 (許福星, 2008)；因此減少萎凋時間，將盤固草調製成半乾青貯，不僅可以降低天氣之影響，也解決盤固草本身水溶性碳水化合物不足，不適合調製成青貯的問題。



將盤固草調製成半乾青貯能有效提高盤固草的適口性，而與進口百慕達乾草（Bermuda grass hay）進行比較，山羊更偏好採食盤固草半乾青貯，在採食次數與採食量上皆有顯著的差異（陳等，2018）；且盤固草半乾青貯在有使用添加物的情況下每公斤乾物質僅約 6.73 元（表 27），在價格上幾乎是進口百慕達乾草的一半（12.05 元/公斤乾物質），顯示盤固草半乾青貯具有取代進口百慕達乾草之潛力。

2. 苜蓿半乾青貯（Alfalfa haylage）

苜蓿，學名 *Medicago sativa*，原產於亞洲西南部，屬於多年生豆科牧草，具有較高的粗蛋白質含量與不錯的消化率，有「芻料之后」的美譽；苜蓿的溫度適應性廣，適合栽種於排水良好的地區，耐旱性強，但不耐濕，較適合臺灣冬季氣候，我國的苜蓿約在 9 到 10 月進行播種，每年只有一耕，通常在開花 1% 時收割，可以獲得較佳的產量與品質（許福星，2008）。苜蓿植體本身酸鹼緩衝能力強（580 meq/kg DM，表 3），且粗蛋白質含量較高（18.2%；蕭等，2003），要順利調製成半乾青貯難度較大，因此在調製上需額外借助添加物的幫忙，來平衡苜蓿的碳氮比與促進半乾青貯的發酵。

山羊對於苜蓿半乾青貯的接受度高，其採食量不低於進口苜蓿乾草，而與盤固草半乾青貯、進口百慕達乾草相比，羊隻更偏好苜蓿半乾青貯（王等，2018）；顯示只要能克服苜蓿半乾青貯先天在調製上的困難點，其後續在發展上非常具有潛力，尤其針對臺灣不易調製成乾草的氣候環境。

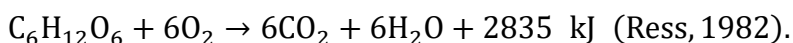


三、青貯的發酵模式 (Ensilage)

青貯的發酵包含一連串複雜的微生物消長與生化反應，可以將其視為一個不可攪動的固態厭氧發酵槽，其中青貯的發酵狀態受到許多因素影響，包含芻料的種類、作物收割的時間、表層附著的微生物等，都會影響到後續青貯的發酵狀態，以及發酵後的品質。一般可以將青貯的發酵分成四個階段：裝填（有氧期）、發酵（厭氧期）、儲存（穩定期）與開封（餵飼期）(Bolsen et al., 1996)。在不同的階段中有不同的環境條件，其 pH 值與乳酸菌含量的變化也會有所不同（圖 4）。

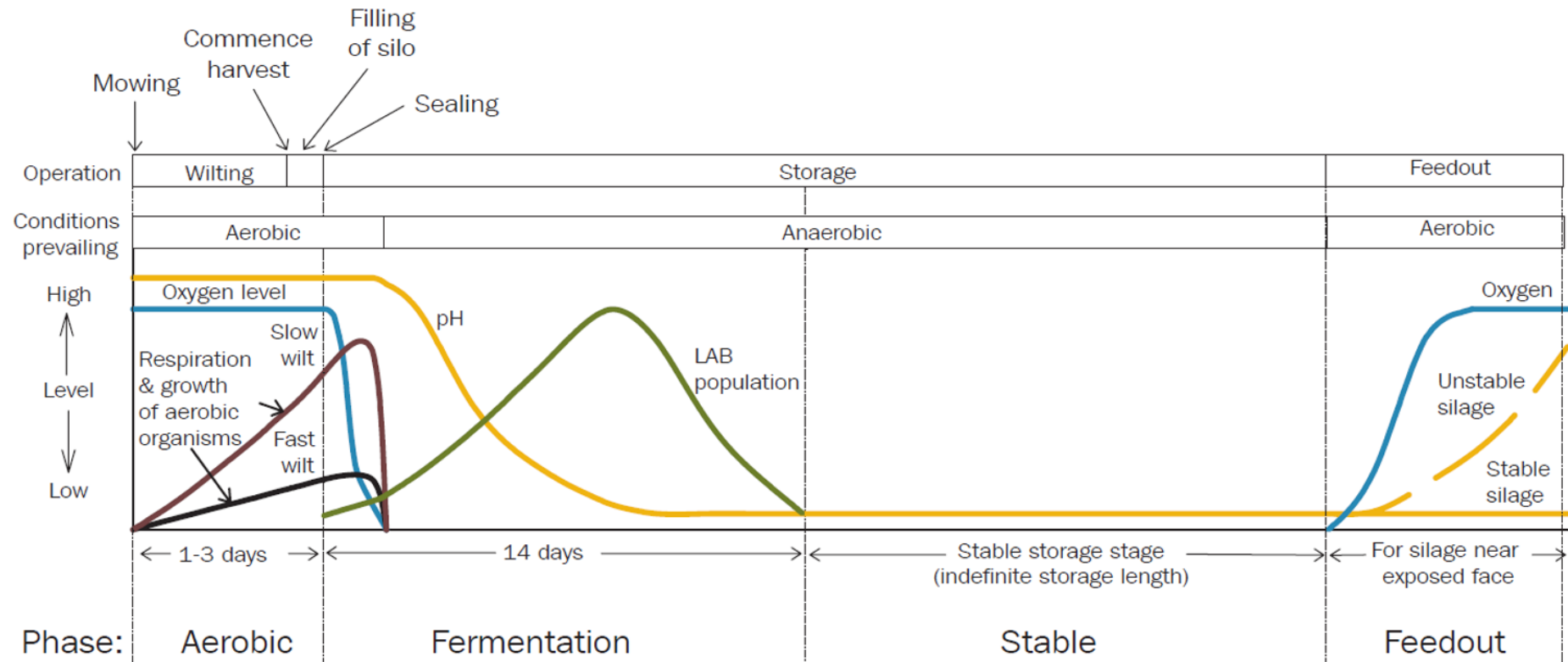
（一）有氧階段 (Aerobic phase)

此階段指的是從牧草收割後，經過萎凋一直到裝填初期，芻料均處在有氧的環境下；在這個階段植物細胞會行呼吸作用 (Respiration)，將芻料內含有的六碳糖代謝成二氧化碳及水，造成乾物質的損失：



雖然植物細胞此時仍具有光合作用之能力，能夠產生葡萄糖補足部分碳水化合物的損失，但整體而言呼吸作用的效率還是大於光合作用；除了碳水化合物的代謝之外，芻料中殘存的蛋白酶也會將蛋白質降解為胜肽與胺基酸，這些因酵素所造成的蛋白質水解 (Proteolysis) 會持續幾天，直到芻料 pH 值下降為止。

依照不同調製方式所需求水分含量的不同，整個有氧階段約會持續 1 到 3 天，一直到芻料裝填後氧氣被耗盡為止，在這個過程中所造成的部分水溶性碳水化合物的損失，會影響到後續發酵階段時乳酸菌 (Lactic acid bacteria) 的食物來源，進而去改變整體青貯的發酵品質；因此芻料收割後的萎凋時間須審慎評估，必須依照不同作物種類與當時的天氣狀況去做調整，不宜過長或太短。



Source: Kaiser et al., 2004

圖 4. 青貯調製不同階段中所發生的變化。(Kaiser et al., 2004)

Figure 4. Changes occurring during different phases for a well-preserved silage.



(二) 發酵階段 (Fermentation phase)

當青貯槽或是膠膜內的氧氣逐漸耗盡、厭氧環境被建立，而芻料內的厭氧微生物開始大量生長，此時即進入發酵階段。依照芻料含水量的不同，整個發酵階段所持續的時間也會有所差異，在芻料含水量較高時 (55~75%)，微生物的代謝作用會較旺盛，通常約 7 到 14 天即可完成發酵；在發酵後期，環境中累積大量乳酸，使得整體環境酸度足以抑制大部分的微生物生長，達到保存芻料的效果。

在青貯的發酵過程中有許多微生物參與反應，包含乳酸菌、腸桿菌 (*Enterobacteriaceae*)、梭狀芽孢桿菌 (*Clostridium*)、酵母 (Yeasts) 與黴菌 (Moulds)；而要達到保存芻料的效果，最關鍵還是在於產乳酸的乳酸菌，其餘的微生物不僅會與乳酸菌競爭可發酵的碳水化合物，在發酵的過程中所消耗的碳水化合物與能量皆高於乳酸菌代謝產生乳酸的損耗 (表 4) (Borreani et al., 2018)。

表 4. 青貯發酵中不同代謝路徑對乾物質及總能的損耗

Table 4. Losses of DM and gross energy from some silage fermentation pathways

Organism	Pathway	Substrate	Product	Loss (% substrate)	
				DM ²	GE ²
LAB ¹	Ho ¹	Glucose	2 lactate	0	0.7
LAB	He ¹	Glucose	1 lactate, 1 ethanol, 1 CO ₂	24	1.7
LAB	He	3 Fructose	1 lactate, 1 acetate, 2 mannitol, 1 CO ₂	4.8	1.0
LAB	Ho/He	2 Citrate	1 lactate, 3 acetate, 3 CO ₂	29.7	-1.5
LAB	Ho/He	Malate	1 lactate, 1 CO ₂	32.8	-1.8
<i>Enterobacteria</i>		2 Glucose	2 lactate, 1 acetate, 1 ethanol, 2 CO ₂	17	11.1
<i>Clostridium</i>		2 Lactate	1 butyrate, 2 CO ₂ , 2 H ₂	51.1	18.4
Yeast		Glucose	2 ethanol, 2 CO ₂	48.9	0.2

¹LAB = Lactic acid bacteria, Ho = Homofermentative, He = Heterofermentative.

²DM = dry matter, GE = gross energy.

Reference: Borreani et al., 2018.



(三) 穩定階段 (Stable phase)

隨著乳酸菌持續的生長，環境中的 pH 值逐漸下降至不適合微生物生長的狀態，此時即進入穩定階段；在這個階段中大部分的微生物無法進行生長代謝反應，而部分微生物如：*Clostridium* 與 *Bacilli* 形成內孢子休眠，只有極少部分的微生物像是 *Lactobacillus buchneri* 能夠以極緩慢的生長速率進行生長。除了微生物以外，耐酸性的蛋白酶與纖維分解酶在這個階段會持續作用，緩慢的釋出胺基酸與水溶性碳水化合物 (Oude Elferink et al., 1999)。

青貯進入穩定階段後，若因表層膠膜破損而導致空氣滲入，容易造成青貯內好氧菌的生長（黴菌與酵母），進而導致芻料乾物質的損失，並且使原先建立好的低 pH 值環境被破壞、降低青貯的發酵品質。

(四) 開封餵飼階段 (Feedout phase)

青貯開封後使得芻料再次暴露於好氧的環境之下，此時耐酸性的酵母與醋酸菌會將青貯中的有機酸代謝成二氧化碳與水，並伴隨著熱能的產生，而使青貯的溫度升高；在有機酸被代謝掉後，青貯的 pH 值轉折上升，這使得其他不耐酸的微生物得以大量生長並成為優勢菌群，如黴菌與 *Bacillus* 菌屬；在黴菌生長的過程中可能會伴隨著黴菌毒素的產生，進而對後續的餵飼產生安全的疑慮 (Oude Elferink et al., 1999)。

在開封餵飼的階段中，微生物生長的速率主要取決於：青貯中好氧微生物的數量、暴露在氧氣下的時間、環境溫度以及青貯中能夠被微生物利用的養分含量；在這個階段中，青貯每天約會損失 1.5 到 4.5% 的乾物質 (Honig and Woolford, 1980)；為了減少青貯開封後所造成的乾物質損失，除了可以加快餵飼的速率，在青貯調製的初期，若可以將青貯裝填的更緊密，在開封之後便可以減少氧氣的滲入，達到延長開封穩定性的效果。



四、參與青貯發酵之微生物

青貯主要藉由乳酸菌代謝產生之乳酸來降低作物 pH 值，以達到保存芻料的效果；但在發酵的過程中其餘的微生物如：腸桿菌、梭狀芽孢桿菌、酵母與黴菌皆會與乳酸菌競爭食物來源，因此在青貯的調製尚須特別注意厭氧條件的建立與芻料水分的調控，避免其他雜菌在發酵的過程中過度生長，影響青貯的品質。

(一) 乳酸菌 (Lactic acid bacteria)

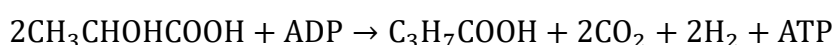
青貯發酵過程中主要包含六種乳酸菌屬：*Lactobacillus*、*Pediococcus*、*Enterococcus*、*Lactococcus*、*Streptococcus* 與 *Leuconostoc*，其中以 *Lactobacillus* 與 *Pediococcus* 最常見於青貯的發酵中，且大部分屬於嗜中溫菌 (Mesophilic bacteria)，能夠在 5 到 50°C 的區間生長，而最適生長溫度約在 25 至 40°C 之間 (Oude Elferink et al., 1999)。根據 Orla-Jensen (1919) 的定義，乳酸菌依照代謝路徑的不同可以將其分類為兩大類微生物：同質發酵乳酸菌 (Homofermentative LAB)，以六碳糖為主要食物來源，並能夠將其代謝成乳酸；異質發酵乳酸菌 (Heterofermentative LAB)，能夠將六碳糖代謝成乳酸並伴隨著乙醇與乙酸的生成 (圖 5)。而這兩大類乳酸菌皆能利用五碳糖如：木糖 (Xylose) 與阿拉伯糖 (Arabinose)，並將其代謝成乳酸與乙酸 (圖 6) (McDonald, 1981)。從發酵的模式來看，給予等量的葡萄糖，同質發酵乳酸菌相較於異質發酵乳酸菌能夠產出更多的乳酸，在青貯發酵前期能夠更迅速的降低環境的 pH 值，使青貯進入穩定的狀態。

而在後續的分類規則中，Sneath et al. (1986) 將同質發酵乳酸菌，依照是否具有醛縮酶 (aldolase) 與磷酸轉酮酶 (phosphoketolase) 再細分成完全同質發酵乳酸菌 (Obligate homofermentative LAB) 與兼性異質發酵乳酸菌 (Facultatively heterofermentative LAB)。前者能夠將六碳糖幾乎完全代謝成乳酸 (>85%)，但因缺少磷酸轉酮酶因此無法進行五碳糖的代謝；後者在六碳糖的代謝上與完全同質乳酸菌相同，但因其具有醛縮酶與磷酸轉酮酶因此能夠進行五碳糖的代謝，將木糖與阿拉伯糖代謝成乳酸與乙酸 (Pahlow et al., 2003)。



(二) 梭狀芽孢桿菌 (*Clostridia*)

梭狀芽孢桿菌生長於厭氧的環境中，屬於格蘭氏陽性菌，能夠形成內孢子，且通常具有鞭毛的構造；在青貯中有超過 60 種的梭狀芽孢桿菌，其中只有七種對於青貯的發酵有比較大的影響，而依照利用基質的不同可以再細分成三大類（表 5）(Gibson, 1965)。由於梭狀芽孢桿菌能夠利用碳水化合物與蛋白質，若其過度生長會造成乾物質大量損失與氨氣產生，進而影響青貯的發酵品質；而部分梭狀芽孢桿菌能夠將乳酸代謝成丁酸，使青貯的 pH 值上升，導致青貯無法穩定保存。



青貯中殘存梭狀芽孢桿菌，也會對後續的飼養產生安全上的疑慮；梭狀芽孢桿菌的內孢子能夠通過消化道，並藉由糞便排出，若在現場飼養管理上沒有特別注意牛舍的清潔，則有可能透過糞便感染牛隻的乳房，在現場使用上須特別注意。

典型的「clostridial silage」被定義為青貯內丁酸的濃度大於 0.5% (in dry matter basis)、過高的 pH 值 (大於 5) 與氨氣含量 (大於 25% total N) (McDonald, 1981)。然而，梭狀芽孢桿菌最適的生長條件約在 pH 值 7 至 7.4 之間，只要乳酸菌能夠在青貯的發酵前期穩定的產出乳酸，使 pH 值快速下降，即可有效的抑制梭狀芽孢桿菌的生長；另外梭狀芽孢桿菌相較於乳酸菌，需要更高的水活性 (Water activity, a_w) 才能生存 (Kleter et al., 1984)，因此將芻料調製成半乾青貯，也能有效限制梭狀芽孢桿菌的生長。

表 5. 青貯中重要的梭狀芽孢桿菌與其分類

Table 5. Classification of *Clostridia* important in silage

Lactate fermenters	Amino acid fermenters	Others
<i>Cl. butyricum</i>	<i>Cl. bifermentans</i>	<i>Cl. perfringens</i>
<i>Cl. paraputrificum</i>	<i>Cl. sporogenes</i>	<i>Cl. sphenoides</i>
<i>Cl. tyrobutyricum</i>		

Reference: Gibson, 1965.



(三) 腸桿菌 (*Enterobacteriaceae*)

腸桿菌為兼性厭氧之格蘭氏陰性菌，不會產生孢子，且大部分存在於青貯中的腸桿菌被視為非致病性的微生物；然而腸桿菌的存在會與乳酸菌競爭食物來源，並且會降解青貯中的蛋白質產生生物胺 (Biogenic amine)，進而影響芻料的適口性 (Van Os et al., 1997)。腸桿菌最適生長的 pH 值約為 7.0，隨著青貯發酵過程 pH 值逐漸下降，腸桿菌也隨之被抑制；因此只要青貯在發酵前期 pH 值能有效率的被降低，則不需要過度擔心腸桿菌對青貯所帶來的負面影響。

(四) 酵母 (Yeasts)

酵母為兼性厭氧之真核生物，能夠耐酸性，而部分的酵母菌株甚至能夠存活在 pH 值 2 以下的環境；在厭氧的環境下酵母能夠利用葡萄糖代謝生成酒精以獲取所需的 ATP，而在好氧的環境下，酵母則與高等植物一樣能利用粒線體行呼吸作用來產生 ATP，但由於酵母缺少部分 NADH 氧化所需之結合位，因此在氧化磷酸化 (Phosphorylation) 的效率上並不如高等植物 (White et al., 1978)。

青貯中的酵母最早在 1932 年被發現，但一直到 1964 年發現酵母對於青貯開封後之存放有很大的影響，此時青貯中的酵母才開始比較常被拿出來討論 (McDonald, 1981)。酵母能夠利用乳酸並將其代謝成二氧化碳及水，加上其耐酸的特性，青貯開封後若酵母的初始菌數很高，很容易導致大量的乳酸被酵母所代謝，一方面造成乾物質的損失，另一方面，乳酸被代謝掉後，青貯的 pH 值上升，這使得其他微生物得以在芻料上面生長，進一步導致更大量的乾物質損失與芻料的腐敗。因此在青貯開封後的對策上，除了加速餵飼速率，避免青貯在有氧的環境存放太久之外，在青貯調製的過程中額外添加有機酸 (乙酸、丙酸)，也有助於抑制酵母的生長，增加青貯的開封穩定性 (Moon, 1983)。



(五) 黴菌 (Moulds)

黴菌大部分為絕對好氧之真核生物，只有很少部分能夠在低氧或厭氧的環境下生長 (Hesseltine et al., 1985)；黴菌通常出現在青貯膠膜內表層氧氣滲入的地方，或是出現在開封餵飼階段，由於黴菌具有菌絲的構造，在外觀上可以很容易觀察青貯是否遭受汙染；黴菌不僅會降低青貯的營養價值與適口性，部分黴菌甚至會產生黴菌毒素 (Mycotoxin)，進而對動物的健康造成影響；當芻料中黴菌的濃度超過 10^4 cfu/g (鮮重)，不僅會對皮膚與眼睛造成刺激，更可能會進一步影響反芻動的瘤胃發酵、生殖表現與造成肝臟功能受損 (Scudamore and Livesey, 1998)。目前從青貯中分離出來的黴菌菌屬包含：*Penicillium*、*Fusarium*、*Aspergillus*、*Mucor*、*Byssoschlamys*、*Absidia*、*Arthrinium*、*Geotrichum*、*Monascus*、*Scopulariopsis* 與 *Trichoderma*，其中 *Penicillium*、*Fusarium* 與 *Aspergillus*，被視為對青貯品質影響最大，也最有可能產生黴菌毒素的菌屬 (Cheli et al., 2013)。

1. 青黴菌屬 (*Penicillium*)

青黴菌相對其他黴菌屬能夠生長在水活性較低的環境之下 ($0.79\sim 0.83 a_w$)，且可以在低氧 (oxygen concentration = 1%) 與低 pH 值 (pH = 3~6) 的環境之中生存 (O'Brien et al., 2006)；青貯中 *Penicillium roqueforti* 是最常被檢測出來之青黴菌，在德國的一項試驗中，有高達 75% 表層有明顯霉斑之青貯被檢測出有 *P. roqueforti* 的生長，而在表層沒有顯霉斑之青貯中，則有 65% 被檢測出有 *P. roqueforti* 生長的情況 (Auerbach et al., 1998)；這也顯示，即便開封後青貯表層沒有明顯霉斑生長，也不能保證青貯完全沒有受到黴菌的汙染，在使用上還是須儘速餵完，避免青貯在好氧的環境下存放太久。



2. 新月形黴菌屬 (*Fusarium*)

新月形黴菌屬也稱作镰孢菌屬，喜好生長在溫熱 (25~30°C)、潮濕 (humidity >70%) 的環境之下，且無法在酸性與厭氧的環境中存活，目前發現只有 *Fusarium oxysporum* 能夠在厭氧的環境下生長 (Gunner and Alexander, 1964)；因此藉由青貯發酵的過程能有效抑制幾乎所有的新月形黴菌生長；然而新月形黴菌所產生之黴菌毒素相對黴菌本身較穩定，無法藉由青貯的過程將其完全破壞 (Binder, 2007)，若在開封之後的青貯中檢測到新月形黴菌所產生之黴菌毒素，則可以推測是在青貯打包之前所受到的汙染，藉此反映芻料在田野中所受到汙染的程度。

要減低芻料受新月形黴菌汙染之影響，除了可以縮短萎凋時間，避免黴菌在這段時間大量生長之外；由於新月形黴菌的孢子廣泛地存在於土壤當中，適度的調整作物的收割高度，減少芻料受土壤微生物的汙染，也是一個很有效的方法 (Jouany, 2007)。

3. 麴菌屬 (*Aspergillus*)

麴菌屬與青黴菌屬一樣，皆能夠存活在水活性較低的環境裡，且對於 pH 值與溫度的適應性廣，因此較容易出現在芻料或是飼料的儲藏階段當中；然而相較於青黴菌屬，麴菌屬的汙染則較好發在氣候溫暖的條件之下 (Cheli et al., 2013)。目前在青貯當中所分離出來的麴菌包含：*Aspergillus flavus*、*A. parasiticus*、*A. fumigatus*、*A. terreus*、*A. ochraceus*、*A. versicolor*、*A. niger* 等 (Alonso et al., 2013)，其中 *A. ochraceus* 能夠生長於 8 到 37°C、pH 值 3 到 10 的環境當中，在 12 到 37°C 的條件之下，會代謝產生赭麴毒素 (Ochratoxin A, OTA)；而 *A. flavus* 與 *A. parasiticus* 能夠生長於 10 到 43°C、pH 值 2.1 到 11.2 的環境當中，在溫度 12 到 40°C、pH 值 3.5 到 8.0 的條件之下，能夠代謝產生黃麴毒素 (Aflatoxins) (Cheli et al., 2013)。

雖然大部分麴菌屬的汙染都發生在青貯的儲藏階段，然而在部分較乾燥的地區如：美國中西部，芻料可能在打包前就受到 *A. flavus* 的汙染，進而影響後續青貯的品質，因此在調製上需特別注意 (Storm et al., 2008)。



五、青貯中常見之黴菌毒素

青貯在調製的過程中若處理不當，可能會在不同的階段受到黴菌毒素的汙染，包含：作物尚未收割前、在田間萎凋的時間、發酵後的保存階段以及開封後與氧氣接觸的時間，若作物本身黴菌的含量原本就很高，再加上保存過程中氧氣的滲入，可能會加速黴菌的生長，進而導致青貯開封後無法使用；在愛爾蘭的一項調查當中發現，以膠膜捆包的方式所調製的青貯，有高達 90%在開封後表層有明顯霉斑生長的情形出現 (O'Brien et al., 2007)；而在另一項三年的調查研究當中，針對美洲、歐洲及亞洲之穀物飼料進行分析，發現有 81%之穀物飼料被檢測出至少含有一種黴菌毒素 (Rodrigues and Naehrer, 2012)；顯示黴菌與黴菌毒素在餵飼動物的芻料與飼料中是一項需要被重視的議題。

黴菌毒素是黴菌的二次代謝物 (Secondary metabolite)，在自然界中有超過 400 多種，大部分來自 *Aspergillus*、*Fusarium*、*Alternaria* 與 *Penicillium*；而青貯當中之黴菌毒素可能來自收穫前 *Fusarium* 與 *Aspergillus* 的汙染，或是收穫後 *Aspergillus* 與 *Penicillium* 的汙染。常見於青貯當中的黴菌毒素包含：新月毒素 (Trichothecenes)、伏馬鐮孢毒素 (Fumonisin)、黃麴毒素 (Aflatoxins)、玉米烯酮毒素 (Zearalenone)、黴酚酸 (Mycophenolic acid) 與 roquefortine C。由於黴菌毒素具有毒性、藥性，會對動物及人體造成健康上的影響，因此美國食品藥品監督管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 與歐盟各自針對不同種類之黴菌毒素，以及不同來源之飼料與食品，制定了不同濃度上限之標準，而表 6 列出了兩個機構針對反芻動物之飼料所訂定之黴菌毒素濃度上限。目前臺灣對飼料當中黴菌毒素濃度的規範，僅針對黃麴毒素進行制訂，且只包含雞、鴨、豬，而針對反芻動物則尚無限制。

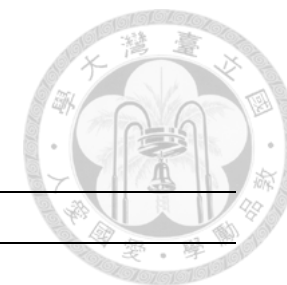


表 6. 反芻動物飼糧中各種常見黴菌毒素濃度上限規範

Table 6. Regulatory levels of common mycotoxins in ruminant feeds (feedingstuff with a moisture content of 12%)

Common mycotoxin	Agency	Ruminant feeding
Aflatoxins	U.S. FDA ¹	20 ppb for dairy animals
		100 ppb for breeding beef cattle
		300 ppb for finishing beef cattle
	European commission	5 ppb for dairy animals 20 ppb for all other ruminants
Deoxynivalenol	U.S. FDA	10 ppm for ruminating beef and feedlot cattle (>4 mo old) 5 ppm for ruminating dairy cattle older than 4 mo
	European commission	5 ppm for ruminants 2 ppm for calves (<4 mo old) and lambs
	Total Fumonisin	U.S. FDA
European commission		50 ppm for adult ruminants (>4 mo old) 20 ppm for calves (<4 mo old) and lambs
Zearalenone		U.S. FDA
	European commission	500 ppb for ruminants

¹U. S. Food and Drug Administration

²Dry matter basis

Reference: FDA, 2001; FDA, 2010; FDA, 2019; European commission, 2006; European commission, 2011; European commission, 2016.



(一) 黃麴毒素 (Aflatoxins)

黃麴毒素為 *Aspergillus* spp. 經由聚酮途徑 (Polyketide pathway) 代謝產生之二次代謝物，在結構上為兩個呋喃香豆素 (Difuranocoumarin) 之衍生物；常見於青貯中之 *A. flavus* 能夠代謝產生 AFB₁ 與 AFB₂；而 *A. parasiticus* 則會代謝生成 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 與 AFG₂ (圖 7) (Bennett and Klich, 2003; Hussein and Brasel, 2001)；在上述之黃麴毒素中以 AFB₁ 的毒性最強 (Squire, 1981)。

黃麴毒素在動物體內會被細胞色素 P-450 轉化成毒性更強的 8,9-epoxide 形式，並與 DNA 結合進而阻礙 DNA 的修復，黃麴毒素-8,9-epoxide 與 DNA 的結合物甚至會使 DNA 上的核苷酸組成改變 (嘌呤、嘧啶轉換)，使 DNA 無法正常轉錄出細胞所需之蛋白質，進而造成細胞凋亡 (Apoptosis) (Bennett and Klich, 2003)。而在反芻動物中，部分的黃麴毒素會先在瘤胃中被微生物降解成毒性更高的黃麴毒醇 (Aflatoxicol)，其餘未被降解的部分，則在消化道中藉由主動運輸吸收，並在肝臟中被代謝成 AFM₁ (Upadhaya et al., 2010)，最後送至乳汁中以 AFM₁ 的形式排出體外 (Diaz et al., 2004)。

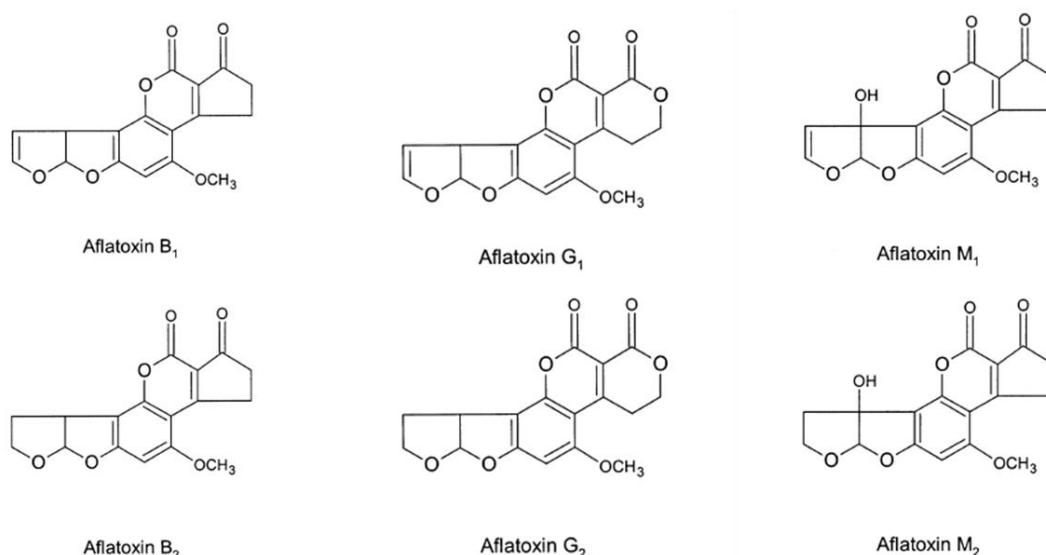


圖 7. 黃麴毒素 B、G、M 之化學結構。(Hussein and Brasel, 2001)

Figure 7. Chemical structure of aflatoxin B, G, and M.



(二) 赭麴毒素 (Ochratoxins)

赭麴毒素為 *P. verrucosum*、*A. ochraceus*、*A. niger* 與 *A. carbonarius* 的二次代謝物，其中赭麴毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 是赭麴毒素裡毒性最強的一個，具有致癌性、抑制免疫與抑制葡萄糖代謝的能力 (Ogunade et al., 2018)。赭麴毒素之毒性主要藉由抑制 aminoacyl-tRNA 之合成，使細胞轉譯出現問題，進而引起後續一連串細胞代謝異常的發生 (Bennett and Klich, 2003)。

反芻動物瘤胃裡的微生物能夠水解赭麴毒素 A 的醯胺鍵，將其代謝成毒性較低赭麴毒素 α ；在 Sreemannarayana et al. (1988) 的研究中，給予兩頭瘤胃尚未發育之小牛每公斤體重 1 毫克的 OTA，只有一隻存活下來；而給予四頭瘤胃發育健全之小牛每公斤體重 2 毫克的 OTA，四頭小牛均存活下來並且身體沒有任何異常，而在後續的分析中也發現，有 90% 的 OTA 是以 OTA α 的形式排出，且尿液中排出的量是糞便的 4 至 8 倍；然而赭麴毒素 A 在瘤胃中也可能被乙醯酯化形成相等毒性的赭麴毒素 C (Ochratoxin C) (Galtier and Alvinerie, 1976)。

(三) 新月毒素群 (Trichothecenes)

新月毒素為 *Fusarium*、*Myrothecium*、*Phomopsis*、*Stachybotrys*、*Trichoderma* 與 *Trichothecium* 之二次代謝物，而依照其化學結構上的差異可以分成 A、B、C、D 四型，其中 C、D 具有巨環 (Macrocyclic) 的結構，而 A、B 則無 (Nonmacrocyclic)。A 型的新月毒素包含：T-2 毒素與 HT-2 毒素，在第八號位置的碳上具有羥基或是醯基；B 型的新月毒素包含：嘔吐毒素 (Deoxynivalenol, DON) 與雪腐鐮刀菌烯醇 (Nivalenol)，在第八號位置的碳上具有酮基 (Ogunade et al., 2018)。

而在這上述的新月毒素當中，以 A 型之 T-2 毒素、HT-2 毒素與 B 型之嘔吐毒素較常見，他們都是 *Fusarium spp.* 的二次代謝物。



1. T-2 毒素與 HT-2 毒素

T-2 毒素與 HT-2 毒素主要由 *Fusarium sporotrichioides* 與 *Fusarium poae* 代謝產生，相較於草料青貯，這兩種毒素較常出現在穀物當中；在一家生技公司的調查報告裡，被檢測的 127 個玉米青貯樣品當中約有 1% 被檢測出 T-2 毒素的殘留，而被檢測出最高的濃度是 14 ppb (Biomin, 2016)。

T-2 毒素與 HT-2 毒素能夠藉由乙醯基 (acetyl group) 阻礙電子傳遞鏈上 F_1F_0 -ATP 的合成，進而影響細胞正常的生理代謝反應 (范與左, 2012)。T-2 毒素為水溶性，攝食後在動物體內很容易因水解作用、羥化作用與去環氧化作用，而被代謝成 HT-2 毒素、T-2 troil、T-2 tetraol 等多種代謝物 (Li et al., 2011)，若飼糧中 T-2 毒素含量輕微，則可經由代謝排出體外，但若給予牛隻單位體重 10 到 50 ppm 之 T-2 毒素，牛隻仍然會出現瘤胃絨毛脫落、皺胃損傷的狀況 (Cheeke, 1998)。

2. 嘔吐毒素 (Deoxynivalenol, DON)

嘔吐毒素其主要由 *F. graminearum*、*F. nivale*、*F. culmorum*、*F. poae*、*F. roseum* 與 *F. tricinctum* 代謝產生，其英文別名也稱作 vomitoxin，主要由於豬隻長期接受低劑量或是短期給予高劑量之嘔吐毒素，會引發豬隻採食下降、體重減輕、下痢、嘔吐與死亡等症狀 (Marpegan et al., 1988)。在 Kiessling et al. (1984) 的體外試驗中發現，嘔吐毒素無法有效的被瘤胃中的微生物代謝；而進入牛隻體內的嘔吐毒素，有部分會被代謝成 DOM-1，並從乳汁中排出，其餘部分則是以 DON 或 DOM-1 的形式從糞尿中排出 (Côté et al., 1986)。

在荷蘭的一項調查當中，針對玉米青貯、牧草青貯與小麥青貯中黴菌毒素之殘留進行檢測，發現嘔吐毒素在玉米青貯中出現的情形最嚴重 (71%)，其次為小麥青貯 (10%)，而在牧草青貯當中則沒有檢測出嘔吐毒素的殘留 (Driehuis et al., 2008)。

(四) 玉米烯酮毒素 (Zearalenone, F-2 toxin, ZEN)

玉米烯酮毒素是一個類雌性素的二次代謝物，主要由 *F. graminearum*、*F. roseum*、*F. culmorum* 與 *F. crookwellense* 代謝產生，較常出現於玉米、小麥、大麥等飼料原料當中；由於結構與雌性素類似（圖 8），在動物體內會引發與繁殖相關之疾病，包含：動情素濃度過高、陰道發炎、與乳腺異常肥大等 (Ogunade et al., 2018)。然而反芻動物相較於其他單胃動物較不受玉米烯酮毒素的影響，ZEN 在瘤胃中會被微生物代謝成 α -zearalenol 與 β -zearalenol，雖然 α -zearalenol 毒性較原本的 ZEN 強，但由於其吸收率較低，且在肝臟中會被轉換成毒性最低的 β -zearalenol 形式，因此較不需擔心 (Kennedy et al., 1998)；然而過高劑量的玉米烯酮毒素仍然會對反芻動物造成負面的影響，每日給予荷蘭女牛 250 毫克之 ZEN，相對於未攻毒組別，其受孕率有顯著的下降 (62 vs. 87%) (Weaver et al., 1986)。

在 Driehuis et al. (2008) 的調查當中，有 50% 的玉米青貯被檢測出玉米烯酮毒素的殘留，其中最高濃度達到 943 ppb，而有 6% 的牧草青貯被檢測出有 ZEN 殘留，最高濃度達到 308 ppb。在另一個澳洲的調查當中，苜蓿青貯之 ZEN 殘留最高被檢測出 79 ppm 最低則是 17 ppm (in DM basis)，而在禾本科牧草之青貯當中最高則是被檢測出 4.56 ppm 殘留 (Reed and Moore, 2009)。

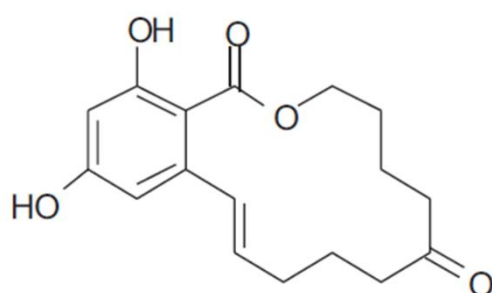


圖 8. 玉米烯酮毒素之化學結構。(Yiannikouris and Jouany, 2002)

Figure 8. Chemical structure of zearalenone.



(五) 伏馬鐮孢毒素 (Fumonisin)

伏馬鐮孢毒素最早在 1988 年被發現 (Bezuidenhout et al., 1988)，主要由 *F. proliferatum*、*F. verticillioides*、*F. anthophilum* 與 *F. nygamai* 藉由兩個丙胺酸之縮合反應代謝產生；目前已知有超過 28 種不同結構之伏馬鐮孢毒素存在，主要可以分成 A、B、C 與 P 四型，其中以伏馬鐮孢毒素 B₁ (FB₁) 毒性最強 (圖 9)。伏馬鐮孢毒素能夠阻斷神經鞘脂質之生合成，進而對動物產生負面的影響，對馬會產生腦白質軟化、對家豬會造成肺水腫、而對齧齒類動物則會造成肝毒性 (Ogunade et al., 2018)。在 Caloni et al. (2000) 的研究中，以體外發酵模型評估瘤胃微生物對 FB₁ 之代謝能力，結果發現無論有無額外添加碳源供微生物生長，瘤胃中之微生物均無法很有效的將 FB₁ 代謝掉 (12% 與 18%)；而在 Gurung et al. (1999) 的研究中，FB₁ 添加至 100 ppm 並不影響體外乾物質消化率 (In vitro dry matter digestibility; IVDMD)，顯示雖然瘤胃微生物無法有效將 FB₁ 代謝掉，但 FB₁ 之添加對於瘤胃正常之消化功能影響並不大。在動物試驗中，於分娩前七天添加 100 ppm FB₁ 至飼糧當中並持續到分娩後 70 天，會使荷蘭牛與娟珊牛產乳量下降 (Diaz et al., 2000)。

Rodrigues and Naehrer (2012) 針對亞洲、美洲與歐洲之飼料原料進行調查，發現平均有 65% 的飼料原料有被檢測出伏馬鐮孢毒素殘留；而在 González-Pereyra et al. (2008) 的實驗當中，發現在玉米青貯槽的頂端與牆壁等較容易與氧氣接觸的地方，FB₁ 的濃度範圍約在 340 到 2490 ppb 之間。

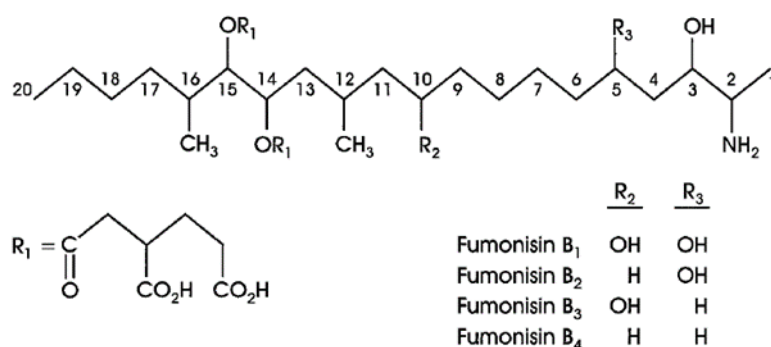


圖 9. 伏馬鐮孢毒素之化學結構。(Munkvold and Desjardins, 1997)

Figure 9. Chemical structure of fumonisin.



六、青貯添加物 (Silage additives)

青貯添加物的使用，最早的目的是要確保芻料中的乳酸菌為優勢菌種，使青貯可以順利發酵；而後續慢慢衍生出不同種類、不同目的之添加物，包含：抑制其他雜菌生長、促進開封穩定性以及增加營養物質等。青貯之添加物可以簡單分類成：發酵促進劑 (Fermentation stimulants)、發酵抑制劑 (Fermentation inhibitors)、好氧損壞抑制劑 (Aerobic deterioration inhibitors) 與營養物質 (Nutrients) (表 7) (McDonald, 1981)。以下將會針對添加物分類中之乳酸菌、有機酸類與碳源添加進行探討。

(一) 乳酸菌 (Lactic acid bacteria)

兼性異質發酵乳酸菌是目前最常見青貯添加物，在代謝生理上能夠代謝六碳糖形成乳酸，並且能夠將五碳糖代謝形成乳酸與乙酸 (圖 5)(圖 6)，*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus casei*、*Enterococcus faecium* 與大部分 *Pediococcus* spp.均屬於此類 (Muck et al., 2018)。於玉米青貯中添加 1×10^6 cfu/g (鮮重) 之 *L. plantarum*，能夠有效的改善青貯的發酵品質，在發酵後第七天有添加 *L. plantarum* 的組別乳酸產量顯著高於未使用添加物的組別，且乾物質損失也有顯著的下降 (Filya and Sucu, 2010)；顯示使用兼性異質發酵乳酸菌作為添加物能夠有效改善青貯前期的發酵品質，使青貯更快速的進入穩定狀態，減少發酵過程中其他雜菌代謝作用所造成的乾物質損失。然而大量的乳酸的產生會使青貯在開封餵飼階段較不穩定，酵母菌能夠在酸性的環境之下利用乳酸作為碳源並大量生長，進而使青貯的 pH 值上升；在 Filya (2003) 的研究當中，有添加 *L. plantarum* 的組別相較於未使用添加物的組別，在開封後 pH 值上升較快，於開封後第五天時 pH 值已顯著高於對照組，顯示 *L. plantarum* 的添加雖然能快速降低青貯的 pH 值，但對於青貯的開封穩定性也會造成一定程度的負面影響。




表 7. 青貯添加物的分類

Table 7. Classification of silage additives

Silage Additives					
Fermentation stimulants		Fermentation inhibitors		Aerobic deterioration inhibitors	Nutrients ¹
Bacterial cultures	Carbohydrate sources ¹	Acids	Others		
Lactic acid bacteria	Glucose	Mineral acids	Formaldehyde	Propionic acid	Urea
	Sucrose	Formic acid	Paraformaldehyde	Caproic acid	Ammonia
	Molasses	Acetic acid	Sodium nitrite	Sorbic acid	Minerals
	Cereals	Propionic acid	Sulphur dioxide	Pimaricin	
	Whey	Lactic acid	Sodium metabisulphite	Ammonia	
	Beet pulp	Benzoic acid	Ammonium bisulphate		
	Citrus pulp	Acrylic acid	Sodium chloride		
	Potatoes	Glycolic acid	Carbon dioxide		
	Cellulases	Sulphamic acid	Carbon bisulphide		
		Citric acid	Hexamethylenetetramine		
		Sorbic acid	Sodium hydroxide		

¹Most substances listed under carbohydrate sources can also be listed under nutrients.

Reference: McDonald, 1981



在青貯中添加異質發酵乳酸菌以提升青貯開封穩定性的概念，最早由 Weinberg and Muck (1996) 所提出，異質發酵乳酸菌能夠將六碳糖代謝產生乳酸並伴隨著乙酸與乙醇的產生，其中代謝產生的乙酸能夠抑制微生物的生長，進而達到延長青貯開封穩定性的目的，目前最常應用於青貯中的異質發酵乳酸菌為 *Lactobacillus buchneri* (Muck et al., 2018)。在玉米青貯中添加 1×10^5 cfu/g (鮮重) 之 *L. buchneri*，能夠有效提高青貯中乙酸的含量，而與未使用添加物的組別相比具有更好的開封穩定性 (Kleinschmit et al., 2005)。

兩種類型的乳酸菌均能在不同的面相提升青貯的品質，因此後續就有研究同時添加這兩種乳酸菌，希望能夠同時達到提升青貯發酵品質與提高開封穩定性的效果。在 Reich and Kung (2010) 的研究當中，以 *L. buchneri* 搭配三種不同的兼性異質發酵乳酸菌 (*P. acidilactici*、*L. plantarum*、*P. pentosaceus*) 添加於玉米青貯中，結果顯示有使用添加物的組別在黴菌與酵母菌的數量上均顯著低於對照組，且具有較高的開封穩定性，而在 pH 值與乳酸含量中，以 LBLP 的組別為最佳；表示同時使用兩種類型的乳酸菌能夠同時兼顧兩方的好處。在作用機制上，兼性異質發酵乳酸菌在發酵前期能夠快速產生乳酸，使青貯進入穩定狀態，而 *L. buchneri* 在青貯穩定階段後，能夠將乳酸代謝成乙酸進而抑制其他雜菌的生長，達到提高青貯開封穩定性的效果 (圖 10) (Kleinschmit and Kung, 2006)。

(二) 有機酸類 (Organic acids)

有機酸類與鹽類均屬於發酵抑制劑，能夠抑制青貯中雜菌的生長，目前被應用於青貯中之有機酸類包含：甲酸、山梨酸、苯甲酸、乙酸與丙酸等 (表 7)。游離態的有機酸能夠穿過細胞膜進入細胞內，並在細胞內釋出氫離子，改變細胞內的氫離子平衡，進而去影響到細胞整體的代謝作用，達到抑菌的效果 (Lambert and Stratford, 1999)。而針對酵母與黴菌，在 pH 值 4 到 5 的範圍區間內，丙酸相較於甲酸與乙酸，能夠最有效的抑制黴菌與酵母的生長 (Woolford, 1975)；顯示要應用於青貯中，並針對黴菌與酵母進行抑制，丙酸會是最佳的選擇。

在 Yu and Thomas (1975)的實驗當中，添加 0.8%的丙酸能夠有效抑制苜蓿半乾青貯表層霉斑的出現，且丙酸的添加並不會影響後續動物的採食量。然而丙酸具有腐蝕性，在現場使用上較為困難，因此改以丙酸鹽類的形式添加，可以增加其實用性，而在眾多的丙酸鹽類當中以丙酸銨（Ammonium propionate）的水溶性最好（90%），較適合作為青貯的添加物（Kung, 2001）。在梯牧草半乾青貯中添加 0.3%的丙酸（73% propionic acid、21% ammonium propionate），能夠有效的抑制酵母的數量並增加半乾青貯的開封穩定性，而對於乾物質的損失也能有效的降低，當劑量增加至 0.9%時，半乾青貯中酵母的數量與乾物質損失都有更進一步的降低（Särkijärvi et al., 2012）。

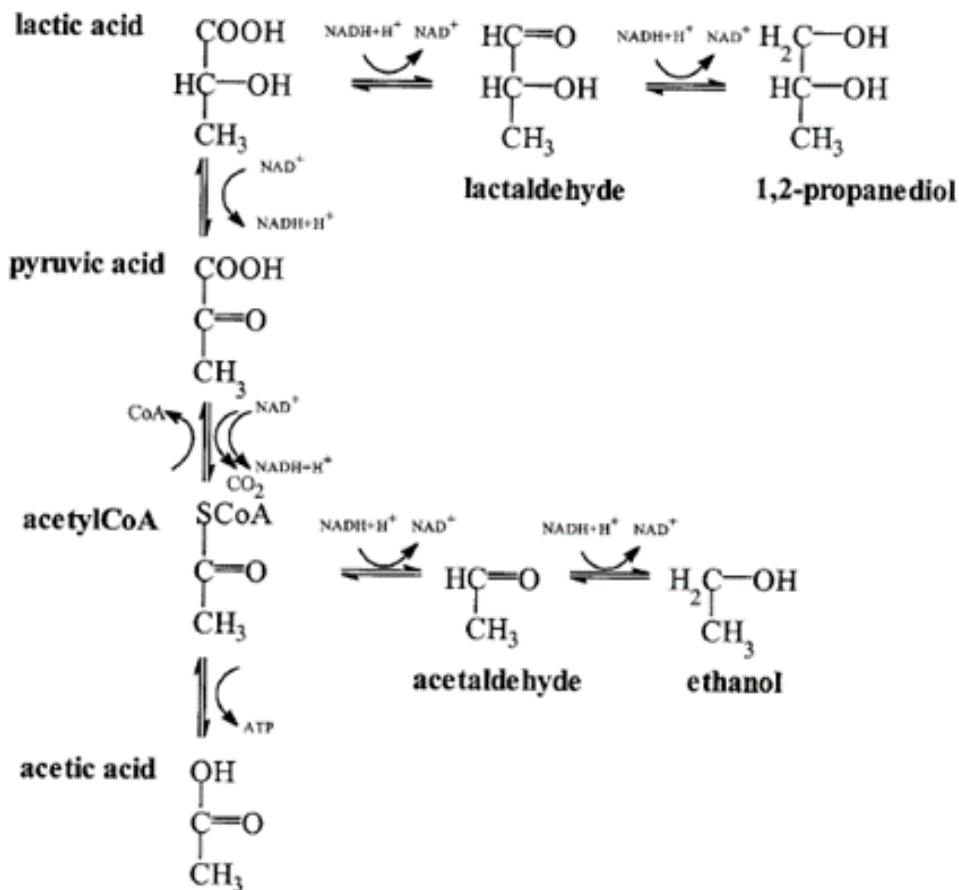


圖 10. 布氏乳酸桿菌在厭氧環境下代謝乳酸之途徑。(Oude Elferink et al., 2001)

Figure 10. Pathway for anaerobic degradation of lactic acid by *Lactobacillus buchneri*.



(三) 碳源添加 (Carbohydrate-rich materials)

在青貯或半乾青貯當中添加碳源能夠使乳酸菌在發酵過程中有更多的原料可以使用，進而加快青貯發酵速度，使 pH 值能夠更快下降至穩定的狀態；有許多物質都可以作為青貯碳源的添加，包含：葡萄糖、蔗糖、糖蜜、燕麥、大麥、小麥與乳清等 (McDonald, 1981)。在苜蓿青貯中額外添加葡萄糖或是果糖，能夠有效提高青貯中乳酸的含量 (Seale et al., 1986)；而在禾本科牧草的青貯當中添加 4%或是 8%的糖蜜，皆能有效改善青貯的發酵狀態，有添加糖蜜的組別具有較高的乳酸含量與較低的 pH 值 (Tjandraatmadja et al., 1994)。另外在部分糖蜜不易取的地區，含有高量乳糖的乳清則被用來取代糖蜜，作為青貯發酵過程中額外碳源的補充，在 Repetto et al. (2011)的實驗當中，額外添加 2%、5%與 10%的乳清於苜蓿青貯當中，在 60 天的發酵後均能有效降低苜蓿青貯的 pH 值，其中以添加 2%乳清的效果最好。

而本研究接續劉(2018)的研究成果，會在苜蓿半乾青貯的內部添加綜合乳酸菌 (*Pediococcus acidilactici*、*Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus plantarum*)與糖蜜，藉此改善半乾青貯的發酵狀態與開封穩定性，並且會在半乾青貯的表層添加丙酸銨，希望能夠有效降低青貯表層的發霉狀況；另外本研究也接續陳等(2019)的盤固草半乾青貯試驗，將利用其實驗當中所製作之盤固草半乾青貯搭配上本試驗所製作之苜蓿半乾青貯，共同作為泌乳羊之芻料來源，以評估半乾青貯對於泌乳羊生產表現之影響。

貳、材料與方法



本研究分成兩個階段，第一階段製作中型半乾青貯草捆，評估添加物於現場應用上之成效；第二階段以 *in vitro*、*in situ* 與 *in vivo* 三種方式，評估半乾青貯之營養價值，以及半乾青貯飼糧對泌乳羊生產表現之影響。

一、半乾青貯草捆製作（製作與開封時間如圖 11 所示）

（一）盤固草半乾青貯（Pangolagrass haylage）

試驗用盤固草來自行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所，為盤固草 A254 品系，於 107 年 7 月 18 日製作。收割後之盤固草於田間萎凋至水分接近 40%~50% 時開始進行半乾青貯製作，共分成四個組別，每組三重複（ $n=3$ ）。

- a. 對照組：不使用任何添加物。
- b. 表層 3%丙酸銨 + 內部 1.5%丙酸銨處理（in wet basis）。
- c. 表層 3%丙酸銨處理（in wet basis）。
- d. 表層 3%丙酸銨（in wet basis）+ 內部乳酸菌處理（*Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*，以 1：1：1 比例混合，總乳酸菌數達到每公克鮮草 10^6 菌落數）。

萎凋完成後，以圓形打包機（Round baler with bale wrapper, Midivario 85-100, AGRONIC, Finland）將盤固草打包成圓柱形草捆，並於打包過程中由機器噴灑溶液至草捆內部：(a)、(c) 6 至 7 公升 RO 水；(b) 4.29 公斤 70%丙酸銨飽和溶液；(d) 6 至 7 公升綜合乳酸菌溶液。草捆打包完成後 a 組直接進行膠膜捆包，其餘三個組別，先以人工方式噴灑 1.8 公斤 70%丙酸銨飽和溶液於草捆表層，完成後再進行膠膜捆包。

10 週開封資料如陳等(2019)所述，本論文將著重於 d 組 42 週之開封狀態。



(二) 苜蓿半乾青貯 (Alfalfa haylage)

試驗用苜蓿來自行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所，為紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)，於 108 年 3 月 18 日製作。收割後之苜蓿於田間萎凋至水分接近 35~40%時開始進行半乾青貯製作，共分成兩個組別，每組三重複 (n=3)。

- a 對照組：不使用任何添加物。
- b 表層 3%丙酸銨 (in wet basis) + 內部乳酸菌 (*Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*)，以 1 : 1 : 1 比例混合，總乳酸菌數達到每公克鮮草 10^6 菌落數) 與 3%糖蜜 (in wet basis) 處理。

萎凋完成後，以圓形打包機將苜蓿草打包成圓柱形草捆，並於打包過程中由機器噴灑溶液至草捆內部：(a) 6 至 7 公升 RO 水；(b) 6 至 7 公升綜合乳酸菌溶液，並於打包成圓形草捆前，先以攜帶式噴霧器噴灑 6 公斤糖蜜於苜蓿上。草捆打包完成後(a)組直接進行膠膜捆包，(b)組則先以人工方式噴灑 1.8 公斤 70%丙酸銨飽和溶液於草捆表層，完成後再進行膠膜捆包。

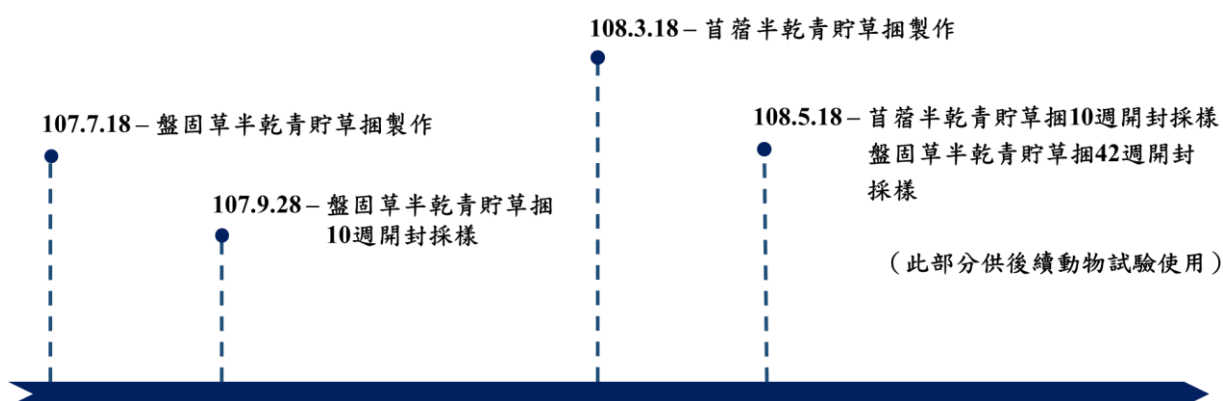


圖 11. 半乾青貯草捆製作、採樣時間軸。

Figure 11. The timeline for making and sampling haylages.

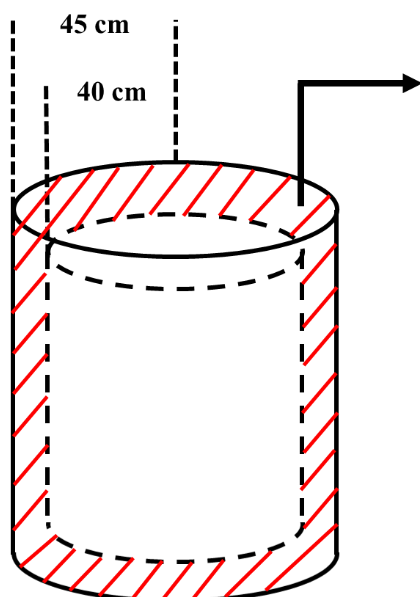


(三) 半乾青貯添加物製備

1. 丙酸銨

丙酸銨解離出之丙酸具有抑制微生物生長的能力，而丙酸銨相對於其他丙酸鹽類具有更高的水溶性，在現場應用上更為便利。為了減少過量水分噴灑而影響半乾青貯後續的發酵，因此本試驗使用 70%飽和丙酸銨溶液進行噴灑，且經現場測試，丙酸銨溶液足以滲入草捆表層 5 公分。為了達到表層 3%之丙酸銨濃度，每顆直徑 45 公分、200 公斤之草捆需噴灑 1.8 公升的 70%飽和丙酸銨溶液（圖 12）。

本試驗所使用之丙酸銨購自貿暉實業股份有限公司(嘉義，臺灣)。



1. 表層5公分草重：

$$\rightarrow 200 \times \left(1 - \frac{40^2 \times \pi \times 90}{45^2 \times \pi \times 90}\right) = 42 \text{ kg}$$

2. 噴灑3%丙酸銨所需丙酸銨重量：

$$\rightarrow 42 \times 3\% = 1.26 \text{ kg}$$

3. 70%丙酸銨飽和水溶液需要量：

$$\rightarrow 1.26 \div 0.7 = 1.8 \text{ L}$$

圖 12. 丙酸銨噴灑模式與劑量。

Figure12. Spraying model and quantity of ammonium propionate.



2. 乳酸菌

本試驗共使用三種乳酸菌，包含 *Lactobacillus buchneri* (SYNBIO TECH INC., 臺灣)、*Lactobacillus plantarum* (SYNBIO TECH INC., 臺灣) 與 *Pediococcus acidilactici* (臺灣亞芯公司)，並依照等菌落數的比例 (1:1:1) 將三種乳酸菌混合成綜合乳酸菌，其中 *Lactobacillus buchneri* 與 *Lactobacillus plantarum* 每克菌粉含有 10^{10} 菌落數，*Pediococcus acidilactici* 每克菌粉含有 10^{11} 菌落數。

經現場測試，在草捆打包過程中每顆草捆約可噴灑 6 到 7 公升之水量，因此以 20 公升水量作為製作三顆 200 公斤草捆所需水量。在草捆製作當天早上，預先秤好 *Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus plantarum* 各 20 g 菌粉與 *Pediococcus acidilactici* 2 g 菌粉，將其裝至保冷袋中攜帶到現場，等到實際製作前再將三種菌粉溶以少量 RO 水溶開，溶開後再混入 20 公升 RO 水中，以便噴灑。

3. 糖蜜

糖蜜為甘蔗或甜菜製糖後之副產物，糖類物質約占乾基的 60 到 70%，其中三分之二為蔗糖，其餘為果糖與葡萄糖 (Steg and van der Meer, 1985)，並且能有效促進青貯的發酵，提供微生物發酵所需的碳水化合物 (Li et al., 2014)。

在現場操作上，將 18 公斤糖蜜溶於 20 公升 RO 水中，並在草捆打包前以人工的方式噴灑於牧草上，使每顆草捆達到 3% 糖蜜濃度 (in wet basis)。



二、半乾青貯草捆開封採樣、分析

以劃十字方式將膠膜拆封後，利用描圖紙將表層發霉數量與面積畫下，後續以 Image J 軟體分析面積，記錄完成後將發霉部分取出秤重，並裝至夾鏈袋中待後續分析；剩餘未發霉部分則由外而內均勻採樣裝至夾鏈袋中，並於未發霉樣品中額外秤取 2.5 公斤半乾青貯至開封穩定性測試圓桶中，進行開封穩定性測試；所有草捆都處理完後，將剩餘未發霉部分裝至真空袋中，並以真空包裝機 (IPT520T, 慶通灣商有限公司, 臺灣) 抽真空後置於 4°C 冰箱保存，供後續動物試驗使用 (圖 13)。

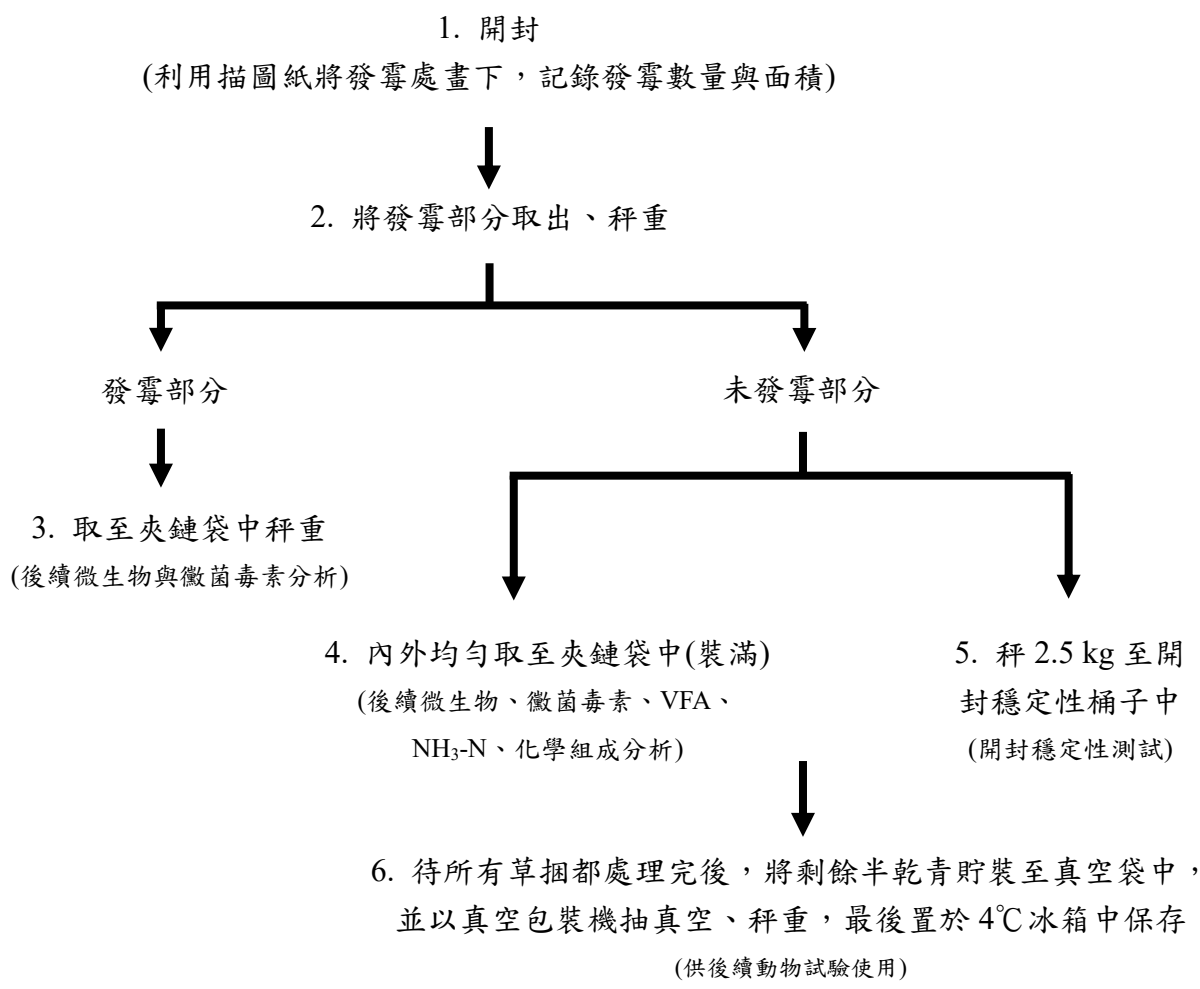


圖 13. 苜蓿、盤固草半乾青貯採樣流程。

Figure 13. Sampling process of alfalfa and pangolagrass haylage.



(一) 半乾青貯水分測定

秤取 150 g 半乾青貯樣品置於牛皮紙袋中，並放入 65°C 烘箱，烘乾 48 小時後取出秤重，散失重量即為牧草水分 (楊，2017)。烘乾後樣品以刀片粉碎機 (SW-2，祥泰精機股份有限公司，臺灣) 搭配 20 mesh 篩網研磨，以備後續化學分析用。

(二) 半乾青貯濾液備製

從半乾青貯樣品中秤取 10 g 並與 90 mL 無菌水混合，接著以均質機 (Oster Blender，德記儀器) 進行高速研磨 (Grind) 轉速均質 20 秒和高速碎冰 (Ice crash) 轉速均質 10 秒，將半乾青貯樣品與無菌水打成細泥狀，並用兩層紗布過濾，即完成草汁備製，供後續微生物、黴菌毒素、揮發性脂肪酸與氨態氮分析用。

(三) 乳酸菌、黴菌與酵母菌分析

1. 在無菌操作台中，將前述半乾青貯草汁以 phosphate buffered saline (PBS) 進行十倍序列稀釋 (乳酸菌測定稀釋倍數約在 10^3 到 10^7 ；黴菌/酵母菌測定稀釋倍數約在 10^2 到 10^4)。
2. 各取 1 mL 稀釋後濾液滴在乳酸菌測試片 (3M™ Petrifilm™，美國) 與黴菌/酵母菌測試片 (JNC Corporation，日本) 上。
3. 乳酸菌測試片以 37°C 培養 48 小時；黴菌/酵母菌測試片以 25°C 培養 48 小時。
4. 計數測試片上之菌落數 (黴菌呈現紅色至紫色之擴散斑點；酵母菌呈現明確圓形斑點；乳酸菌呈現紅色斑點)。



(四) 黴菌毒素分析

1. 取 10 mL 前述草汁濾液並加入 10 mL 萃取液 (乙酸乙酯：甲酸=95：5)，以震盪器搖晃 30 分鐘。
2. 震盪完成後再以 5000 x g 轉速離心，並抽取上清液。
3. 重複此上述步驟三次，即完成黴菌毒素萃取 (García-Moraleja et al., 2015)。
4. 萃取完之液體置入 15 mL 離心管中，並以減壓濃縮機 (Speed Vac SC 110, Thermo Savant, USA) 將液體濃縮。
5. 濃縮後樣品以 60% 甲醇回溶，並調整 pH 值至 6 以上。
6. 透過 Elisa kit (Cat#102020010, T-2 毒素；Cat#102020020, 玉米烯酮毒素；Cat#102020030, 伏馬鐮孢毒素；Cat#102020050, 黃麴毒素 B1；Cat#102020060, 嘔吐毒素；Cat#102020070, 赭麴毒素 A, 微杏基因生醫科技有限公司, 臺灣) 進行分析。

(五) pH 值檢測

1. 以 pH=4、pH=7 之標準液，依序校正 pH meter (F-71, HORIBA Scientific, Japan)。
2. 取 10 mL 濾液於 15 mL 離心管中，並將 pH meter 探針插入溶液中以測定 pH 值。



(六) 氨態氮分析 (Weatherburn, 1967)

A. 原理

樣品萃取液中的 NH_4^+ 與次氯酸鹽 (Hypochlorite) 反應形成氯胺 (Chloramine)，之後氯胺再與兩個苯酚反應，生成帶有藍色之靛酚 (Indophenol)，溶液中顏色的深淺與氨態氮含量成正比 (圖 14)。

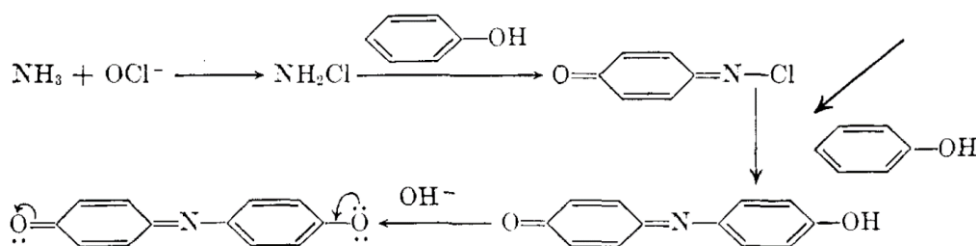


圖 14. 靛酚生成化學反應式。(Bolleter et al., 1961)

Figure 14. Chemical equations of indophenol generation by phenol-hypochlorite reaction.

B. 試劑配製與標準曲線

試劑 A：5 g Phenol, 0.25 g Sodium nitroprusside 溶於 1 L 之蒸餾水。

試劑 B：16.8 mL Sodium hypochlorite, 25 g NaOH 溶於 1 L 之蒸餾水。

(兩試劑均需避光冷藏保存)

標準曲線：先配製氨態氮 10 mg/mL 之標準品 (NH_4Cl 加水定量至 100 mL)，再將溶液配製成 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 之濃度。

C. 分析步驟

1. 取 25 μL 經適當稀釋之樣品液與 1 mL 試劑 A 混合後，再加入 1 mL 試劑 B。
2. 在 37°C 下避光反應 20 分鐘，呈色。
3. 反應完成後之液體以 Elisa reader 測定 625 nm 之吸光值，並與標準曲線對照計算氨態氮之濃度。



(七) 水溶性碳水化合物分析 (Water soluble carbohydrate, WSC)

A. 原理 (Dreywood, 1946)

蔥酮 (Anthrone) 於濃硫酸中會與碳水化合物反應呈色，而兩者反應後所呈現之綠色可藉由光譜儀進行測定。

B. WSC 萃取

1. 秤取 0.04 g 牧草樣品於 1.5 mL 微量離心管中 (青貯樣品可提高至 0.1~0.2 g)。
2. 於管中加入 1 mL 80%酒精，震盪後將微量離心管插上浮板並加上防爆夾，置於 80°C 水浴中 30 分鐘。
3. 以 22540 x g 離心 5 分鐘，並將上清液倒入 15 mL 離心管中。
4. 重複上述步驟(2)、(3) 4 到 5 次後，將離心管置於 70°C 烘箱中烘去酒精。
5. 烘完後 (勿蒸至乾) 以二次蒸餾水定量至 10 mL。

C. 試劑配製與標準溶液

80%酒精：取 400 mL 95%酒精加入 75 mL 蒸餾水。

0.2% anthrone reagent：秤取 0.2 g anthrone 溶於 100 mL 濃硫酸中 (避光保存)。

400 µg/mL 葡萄糖標準溶液：秤取 0.04 g 葡萄糖溶於 100 mL 蒸餾水中，再將溶液配製成 0、20、40、60、80 µg/mL 之濃度。

D. WSC 定量 (Morris, 1948)

1. 取 0.5 mL 葡萄糖標準溶液與樣品萃取液 (經適當稀釋) 置於 2 mL 微量離心管中。
2. 每管加入 1 mL 之 anthrone 試劑，震盪均勻後插入浮板並加上防爆夾，置於沸水浴中 7.5 分鐘。
3. 冷卻後測定 630 nm 之吸光值。



(八) 揮發性脂肪酸與乳酸分析

1. 樣品前處理

取 8 mL 草汁濾液與 2 mL 20% 偏磷酸混合後插冰靜置 30 分鐘。透過離心將草汁中固體沉澱 (5000 x g, 10 min, 4°C)，並以 1 mL 針筒吸取上清液過 0.22 μm 過濾膜至樣品瓶中，處理完後之樣品保存於 -20°C 冰箱中。

2. 揮發性脂肪酸分析

使用氣相層析儀 (Gas chromatography, 7820A, Agilent technologies, USA) 搭配火焰離子偵測器 (Flame ionization detector, FID) 與石英毛細管管柱 (Nukol™ fused silica capillary column, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness, Supelco, USA) 進行分析。設定進樣量 0.5 μL、進樣口及偵測器溫度為 250°C、攜帶氣體為 He、氣體均速為 1.5 mL/min、燃燒氣體為 H₂、烘箱起始溫度 75°C、並以 5°C/min 上升至 180°C，於 180°C 停留 10 分鐘、總運行時間 31 分鐘。

以 2.5% 巴豆酸 (Crotonic acid) 作為分析之內標準品 (Internal standard)。

3. 乳酸分析

使用高效能液相層析儀 (High performance liquid chromatography, Schambeck SFD GmbH, Germany) 搭配 UV/VIS detector (S4245, Schambeck SFD GmbH, Germany) 與離子交換管柱 (Rezex™ ROA-organic acid H+ 8%, Phenomenex®) 進行分析。移動相為 0.1 N H₂SO₄，進樣量為 10 μL，流速每分鐘 0.5 mL，管柱烘箱溫度 40°C，總運行時間 40 分鐘。



(九) 開封穩定性試驗

將開封後之未發霉部分樣品放入直徑 20 公分、高 100 公分之 PVC (Polyvinyl chloride) 管中 (圖 15)，並於樣品中央放置溫度探針 (Pt100，溫度感測器)，隨後於上端開口蓋上兩層紗布，避免水分散失，並透過監控儀 (VM700) 即時記錄溫度的變化。72 小時後將樣品取出，並檢測 pH 值、乳酸菌、黴菌/酵母菌數量。

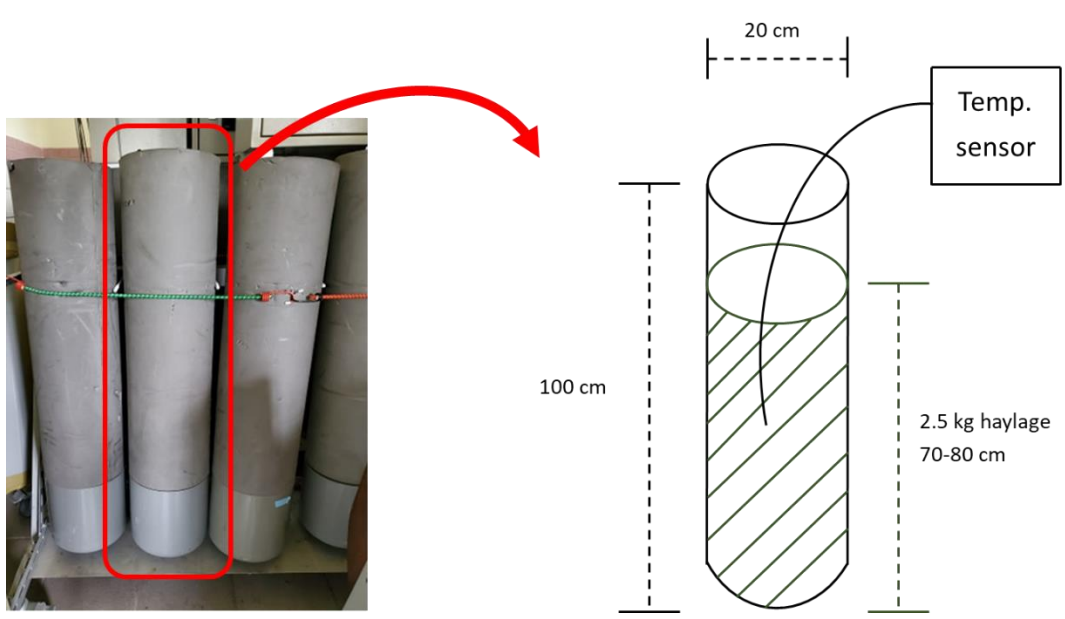


圖 15. 開封穩定性測試 PVC 管。

Figure 15. The PVC pipe for aerobic stability test.



三、體外乾物質消化率與原位消化試驗

本試驗藉由體外消化試驗之方式，評估上述試驗所製作出之苜蓿、盤固草半乾青貯與國產盤固乾草、進口苜蓿乾草在營養價值上之差異。

(一) 動物飼養

使用一頭瘤胃開窗牛，每日 0900 與 1800 餵飼精芻比 40：60 符合 NRC 營養需求之飼糧（苜蓿與百慕達草各占芻料的一半），經 14 天飼養以穩定瘤胃菌相。

(二) 體外乾物質消化率 (*In vitro* dry matter digestibility, IVDMD)

IVDMD 試驗以 Tilly and Terry (1963) 所提出之兩段式體外消化為基礎，並參考李與蕭 (2007) 所提出之修正方法，將蛋白酶濃度調整至 6%，使第二階段消化時間從原本的 48 小時縮短為 24 小時。

1. 於試驗開始前一天將人工唾液（表 8）配製完成，以二氧化碳打氣 20 分鐘後移至厭氧操作台中以平衡瓶內氣體。
2. 每個樣品瓶中添加 0.5 g 樣品，於接種前 12 小時加入 2 mL 人工唾液浸潤樣品，並移至厭氧操作台中平衡氣體。
3. 於早上餵飼後 2 小時採集瘤胃液，經果汁機高速攪打 1 分鐘後以 4 層紗布過濾，並與人工唾液依 1：4 (v/v) 比例混合成接種液。
4. 於待測樣品瓶中加入 48 mL 接種液，蓋上鋁蓋、插上針頭後，以石蠟膜纏繞接口處，並移至 39°C 培養箱中震盪培養 48 小時。
5. 經過 48 小時培養後，加入 1 mL 20% 鹽酸將樣品瓶的 pH 值降至約 1.2，後再加入 2 mL 胃蛋白酶溶液 (Pepsin, porcine, Sigma P-7000, 1:10,000)。
6. 置於 39°C 培養箱中持續消化 24 小時。
7. 消化完成後以纖維袋進行過濾，並以蒸餾水清洗後放置 105°C 烘箱中烘乾，秤重計算得 IVDMD。



表 8. 人工唾液組成 (Cooker et al., 1978)

Table 8. Composition of artificial saliva

藥品名稱	重量 (g / L dd water)
硫酸鎂 Magnesium sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.113
磷酸氫鈉 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	1.041
氯化鉀 Potassium chloride (KCl)	0.375
氯化鈉 Sodium chloride (NaCl)	0.375
碳酸氫鈉 Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	2.625
硫酸鈉 Sodium sulfate (Na_2SO_4)	4.570
硫酸鐵 Ferrous sulfate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.132
氯化鈷 Cobalt chloride ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.001
硫酸鋅 Zinc sulfate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.004
硫酸錳 Manganese sulfate ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.003
硫酸銅 Copper sulfate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.002
氯化鈣 Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.025

(三) 原位消化測定 (In situ degradation kinetics)

參考 Umucalilar et al. (2002) 消化袋取出之時間點，並額外增加 72 小時採樣時間點，以確保芻料在瘤胃中被降解之情況已達平緩。本試驗使用同一隻瘤胃開窗牛，在不同時間點重複兩次。

1. 秤取 5 g 樣品於 10 × 20 cm 之消化袋 (pore sizes: $53 \pm 10 \mu m$, R1020, ANKOM Technology) 中，並將消化袋以細線縫於粗棉繩上。樣品重量與消化袋表面積比為 12.5 mg/cm^2 ，在 Nocek (1988) 所建議之範圍內 $10 - 20 \text{ mg/cm}^2$ 。
2. 於早上餵飼後兩小時將前述樣品放入瘤胃中，並在放入瘤胃前先以 $39^\circ C$ 之自來水浸泡 15 分鐘，0 小時樣品不放入瘤胃中。
3. 依放置時間 2、4、8、16、24、48、72 小時，依序將消化袋從瘤胃中拿出。
4. 取出後的消化袋立即用冷水沖洗表面，直到瘤胃液的顏色退去。
5. 洗淨後，放入 $60^\circ C$ 烘箱中烘 48 小時。
6. 烘乾後記錄乾重，剩餘殘渣收集後分析各時間點 DM 的殘餘量。



四、泌乳羊試驗

本試驗旨在探討，依照上述添加物使用模式所製作出來之半乾青貯，在動物餵養上，是否具有取代乾草之能力。

(一) 試驗設計

本試驗使用 4 頭過產乳高峰之阿爾拜因 (Alpine) 乳山羊，並個別飼養於代謝籠中。採交叉試驗設計 (Crossover design)，分成兩組，每組各兩頭泌乳羊，一組餵飼以苜蓿、盤固草半乾青貯為基礎之飼糧；另一組餵飼以苜蓿、盤固草乾草為基礎之飼糧，精芻比控制在 50：50，並藉由調整精料中玉米粉、大豆粕之比例，使兩組飼糧達到等能量、等蛋白質之條件。在飼養期間每日清洗水槽並更換乾淨飲水，同時提供鹽磚任羊隻舔食，並於每日早晨 6 點與下午 4 點半各擠乳一次。

羊隻上代謝籠適應一週後即開始進行實驗，一期試驗為 21 天，包含前 17 天適應期與後 4 天採樣期。採樣期間每日早晨收集前一天剩料，並以全糞收集法計算泌乳羊對飼糧中各種營養成分之表面消化率；同時於採樣期最後兩天收集早晚之乳樣，並依照實際乳量混合後測定其乳組成。一期試驗結束後，兩組互換飼糧，並再進行一次為期 21 天之試驗。試驗從 108 年 8 月開始執行，於 108 年 10 月結束。

由於羊隻起始乳量差異較大 (表 9)，因此會將乳量相近之羊隻分到不同組，以降低個體差異對試驗之影響。

表 9. 試驗羊隻起始體重、採食量與乳產量

Table 9. Initial body weight, intake and milk yield of dairy goats

Goat number	Body weight (kg)	Intakes (g/d)	Milk yield (g/d)
202	60.5	1,959	2,184
203	61.5	1,744	2,161
204	44.0	1,760	1,131
205	38.5	1,629	1,221



(二) 飼糧配方

1. 飼糧原料

飼糧中之盤固草半乾青貯 (Pangolagrass haylage) 為 107 年 7 月 18 日所製作，在製作過程中有添加綜合乳酸菌 (10^6 cfu/g fresh grass, *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*)，與表層 3% 丙酸銨，並於存放 42 週時開封；苜蓿半乾青貯 (Alfalfa haylage) 為 108 年 3 月 18 日製作，在製作過程中有添加 3% 糖蜜、綜合乳酸菌 (10^6 cfu/g fresh grass, *Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*) 與表層 3% 丙酸銨，並於存放 10 週時開封；苜蓿乾草 (Alfalfa hay) 由臺大試驗農場提供，盤固乾草 (Pangolagrass hay) 購自欣野貿易有限公司；精料則於計算完飼料配方後自行配製；四種草料與兩組精料之化學組成如表 10。

2. 飼糧配方

依據 NRC (2007) 推薦泌乳中期乳山羊之營養需要量，以維持體重 60 公斤、每日泌乳量 1.84 公斤之營養需求為基準，並設定每日乾物質採食量為 1.6 公斤、精芻比 50：50，所計算出來之飼糧配方如表 11。

由於玉米烯酮毒素 (Zearalenone) 在苜蓿半乾青貯中所檢測出來之濃度 (1306 ppb in DM basis, 表 12) 高於歐盟之安全建議量 (500 ppb, moisture content of 12%)，因此在兩組飼糧配方中均會添加黴菌毒素吸附劑 Mycofix[®] Plus (Biomin, Austria)，以確保動物在試驗期間之安全。



表 10. 動物試驗中各原料之化學組成

Table 10. Chemical composition of different ingredients in animal experiments

Item	Forage				Concentrate	
	Alfalfa haylage ¹	Pangolagrass haylage ²	Alfalfa hay	Pangolagrass hay	Haylage diet	Hay diet
Dry matter (%)	62.84	49.31	89.33	87.02	93.21	91.32
Organic matter (% DM)	90.1	91.94	94.29	97.43	95.8	94.91
Crude protein (% DM)	24.08	8.11	16.6	4.62	20.53	26.21
Crude fiber (% DM)	20.56	39.69	35.05	35.87	3.75	4.07
Neutral detergent fiber (% DM)	28.96	73.6	47.63	77.32	8.74	9.21
Acid detergent fiber (% DM)	21.71	46.71	38.43	41.31	3.24	3.53
Acid detergent lignin (% DM)	4.28	5.89	7.47	4.09	-	-
Ether extract (% DM)	1.1	1.73	1.06	0.97	1.94	1.09
Non-fiber carbohydrate ³ (% DM)	35.96	8.5	29	14.52	64.59	58.4

¹Treated with lactic acid bacteria (*P. acidilactici* + *L. buchneri* + *L. plantarum*, 10⁶ cfu/g in fresh grass), 3% molasses and outer 3% ammonium propionate.

²Treated with lactic acid bacteria (*P. acidilactici* + *L. buchneri* + *L. plantarum*, 10⁶ cfu/g in fresh grass) and 3% ammonium propionate.

³Non-fiber carbohydrate = OM – (NDF + CP + EE).

表 11. 半乾青貯與乾草組之飼糧配方與營養組成

Table 11. Ingredients and nutrient composition of haylage group and hay group

Item	Diet	
	Haylage	Hay
Ingredient (% DM)		
Alfalfa haylage	25	—
Pangolagrass haylage	25	—
Alfalfa hay	—	25
Pangolagrass hay	—	25
Corn, ground	32.883	25.103
Soybean meal	16.37	24.15
Magnesium oxide	0.05	0.05
Calcium phosphate, dibasic	0.4	0.4
Salt	0.2	0.2
Mineral premix ¹	0.022	0.022
Vitamin premix ²	0.025	0.025
Mycofix [®] Plus	0.05	0.05
Chemical composition (% DM)		
ME ³ (Mcal/kg, calculated)	2.80	2.81
CP	18.31	18.41
NDF	30.01	35.84
ADF	21.48	24.54
ADL	2.54	2.89
EE	1.68	1.05
NFC ⁴	43.41	40.08
Ash	6.59	4.62

¹Mineral premix supplied (/kg of diet): MnSO₄·H₂O, 240 mg; CuSO₄·5H₂O, 60 mg; CoCO₃, 0.40 mg; Na₂SeO₃, 0.40 mg; ZnO, 140 mg.

²Vitamin premix supplied (/kg of diet): 8300 IU of Vitamin A; 3340 IU of Vitamin D; 71 IU of Vitamin E.

³ME: metabolizable energy. The calculation formulation for ME was from Moran (2005).


ME = 0.185 TDN – 1.89. TDN = 5.31 + 0.412 CP + 0.249 CF + 1.444 EE + 0.937 NFE.

NFE = 100 – (CP + EE + CF + Ash).

⁴NFC: non-fiber carbohydrate = OM – (NDF + CP + EE).

表 12. 動物試驗中半乾青貯與乾草之黴菌毒素含量

Table 12. Mycotoxins in haylage and hay of animal experiment (ppb in dry matter basis)



Mycotoxins	Ingredients ¹			
	Alfalfa haylage	Pangolagrass haylage	Alfalfa hay	Pangolagrass hay
AFB1*	N.D. ²	N.D.	10.1 ± 1.9	19.2 ± 0.7
ZEN*	1306 ± 18	91 ± 22	N.D.	N.D.
T2-toxin	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DON*	92 ± 68	417 ± 216	N.D.	N.D.
FB1*	N.D.	342 ± 25	N.D.	N.D.
OTA*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

¹All samples were from non-spoiled spots.

²N.D. = non-detected.

*AFB1 = Aflatoxin B1, ZEN = Zearalenone, DON = Deoxynivalenol, FB1 = Fumonisin B1, OTA = Ochratoxin A.



(三) 樣品收集與前處理

1. 剩料與全糞收集

於試驗最後 4 天之採樣期，每日早晨餵飼前收集飼料槽中所有的剩料，與早晚收集代謝籠上所有糞便，並記錄剩料與糞便之重量；收集後之剩料與糞便以 65 °C 烘乾 4 天，並記錄殘餘乾重。烘乾後樣品以刀片粉碎機 (SW-2, 祥泰精機股份有限公司, 臺灣) 搭配 20 mesh 篩網研磨，已備後續分析化學組成與計算採食量與表面消化率。

化學組成分析項目包含：乾物質、灰分、粗蛋白、粗脂肪、粗纖維、中洗纖維、酸洗纖維與酸洗木質素。

2. 乳樣收集

於採樣期最後兩天，收集每日早晚之乳樣於樣品瓶中，並依照實際乳量比例將早晚乳樣混合，收集完之乳樣先保存於 4°C 冰箱中，待最後兩日採樣完成後，隨即以冷藏宅配送至行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所，委託進行乳組成分析。

分析項目包含：乳糖 (Lactose)、乳脂 (Milk fat)、乳蛋白 (Milk protein)、無脂固形物 (Solid-non-fat, SNF)、總固形物 (Total solid, TS)、體細胞數 (Somatic cell count, SCC) 等。



五、樣品分析方法

(一) 乾物質 (Dry matter, DM) (AOAC, 1984, Methods 7.003)

A. 分析步驟

1. 秤量瓶預先以 105°C 烘乾秤重。
2. 秤取 2 g 樣品於秤量瓶中，若樣品體積過大，可適度減少樣品量。
3. 將秤量瓶放入 105°C 烘箱中，並將上蓋斜放，以確保水分得以散失。
4. 2 小時後，將秤量瓶取出置於乾燥器中，放涼後秤重。
5. 同上述步驟，並將置於烘箱時間改為 30 分鐘，取出放涼後秤重。
6. 重複步驟 5，直到前後兩次重量差異小於 0.003 g (樣品重量 0.15%)，或是秤重重量比前一次增加 (脂肪氧化)，此時即達到重量恆定。

B. 計算公式

$$\text{乾物質(\%)} = \frac{\text{烘乾後樣品重}}{\text{樣品重}} \times 100$$

C. 操作注意事項

1. 秤量瓶上層內壁有磨砂，應確保樣品粉末沒有沾在磨砂上，以避免在開關蓋子時樣品散落，導致乾物質被低估。
2. 隨時注意乾燥器中乾燥劑之有效性，若乾燥劑變為紅褐色，應重新加熱乾燥才可繼續使用。

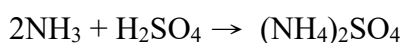
(二) 粗蛋白質 (Crude protein, CP) (AOAC, 1984, Methods 7.033-7.037)

A. 原理

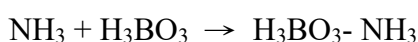
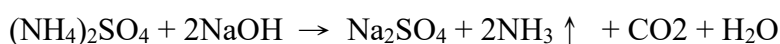
樣品中之含氮物質在濃硫酸、催化劑與高溫的作用下，反應形成硫酸銨 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ；之後硫酸銨再與氫氧化鈉 (NaOH) 反應使氨 (NH_3) 游離釋出，蒸餾出之氨以硼酸 (H_3BO_3) 接收後，再以 0.1 N 硫酸滴定，最後計算粗蛋白質含量。

其反應方程式如下：

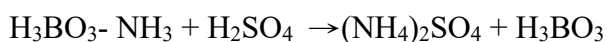
1. 分解



2. 蒸餾



3. 滴定



B. 指示劑配製

1. 溴甲酚綠 (Bromocresol green, BG)

取 0.1 g BG 溶於 90 mL 95%酒精當中並定量至 100 mL。(需避光冷藏保存)

2. 甲基紅 (Methyl red, MR)

取 0.1 g MR 溶於 90 mL 95%酒精當中並定量至 100 mL。(需避光冷藏保存)

3. 酚酞 (Phenolphthalein)

取 1 g 酚酞溶於 90 mL 95%酒精當中並定量至 100 mL。(需避光低溫保存)



C. 溶液配製

1. 4%硼酸溶液

取 80 g 硼酸加入定量蒸餾水中，加熱攪拌至硼酸完全溶解；取 20 mL BG 與 14 mL MR 加入硼酸溶液中混合均勻，之後以 1 N 氫氧化鈉溶液將 pH 值調整至接近 7，最後再以蒸餾水定量至 2 L。

2. 0.1 N 硫酸溶液

取 5.6 mL 98%濃硫酸以 RO 水定量至 2 L。

3. 0.1 N 氫氧化鈉溶液

取 8 g 氫氧化鈉以 RO 水定量至 2 L。

D. 分析步驟

1. 秤取 0.3 g 樣品與標準品 (Ammonium(II) sulfate hexahydrate, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$, MW=392.14, Merck 1.03792, Germany) 分別置於凱氏氮消化管內。
2. 於各別消化管中加入 1 顆催化錠 (Kjeldahl tablets, Merck 1.10958, Germany) 與 10 mL 98%濃硫酸。(預留一組只加催化錠與濃硫酸作為空白組)
3. 將消化管置於加熱裝置上，加熱樣品至呈透明綠色後，再加熱一小時則可以取出放涼。
4. 將消化管置於凱氏氮蒸餾裝置 (Kjelflex K-360, BÜCHI, Switzerland) 進行蒸餾，並以 25 mL 4%硼酸接收蒸餾出之蒸氣。(蒸餾條件：40 mL RO 水、60 mL 33% 氫氧化鈉溶液)
5. 以 0.1 N H_2SO_4 滴定含有氮之硼酸溶液，溶液由綠色轉變至粉紅色及達到滴定終點，並記錄 0.1 N H_2SO_4 使用量。
6. 依照公式計算含氮量，再乘上係數 (6.25)，即可獲得粗蛋白質含量。



E. 0.1 N H₂SO₄ 當量校正

1. 取 0.5 g 預先烘乾之 KHP (KHC₈H₄O₄, potassium hydrogen phthalate) 於 250 mL 錐形瓶中，再加入 50 mL RO 水與 1 到 2 滴酚酞。
2. 取 50 mL 0.1 N H₂SO₄ 於 250 mL 錐形瓶中，加入 1 到 2 滴酚酞。
3. 取 50 mL RO 水於 250 mL 錐形瓶中，加入 1 到 2 滴酚酞，當作空白組。
4. 以 0.1 N NaOH 滴定(1.)、(2.)、(3.)步驟。

F. 硫酸當量計算

$$\text{NaOH(N)} = \frac{\text{KHP(g)} \times 1000}{[\text{NaOH(mL)} - \text{Blank(mL)}] \times 204.2212}$$

$$\text{H}_2\text{SO}_4(\text{N}) = \frac{\text{NaOH(N)} \times \text{NaOH(mL)}}{\text{H}_2\text{SO}_4(\text{mL})}$$

G. 含氮量計算

標準品回收率(%)

$$= \frac{[\text{標準品滴定量(mL)} - \text{空白組滴定量(mL)}] \times \text{硫酸當量} \times 14.01}{\text{標準品重量(g)} \times 1000 \times \text{標準品含氮量(0.07142)}}$$

$$\text{N(\%)} = \frac{[\text{樣品滴定量(mL)} - \text{空白組滴定量(mL)}] \times \text{硫酸當量} \times 14.01}{\text{樣品乾重(g)} \times 1000 \times \text{標準品回收率}} \times 100$$

$$\text{CP(\%)} = \text{N(\%)} \times 6.25$$



(三) 粗脂肪 (Ether extract, EE) (AOAC, 1984, Methods 7.060)

A. 分析步驟

1. 鋁杯事先烘乾，並記錄重量。
2. 秤取樣品 2 g，以濾紙包覆後至於脫脂棉筒中，棉筒開口再以脫脂棉覆蓋。
3. 開啟脂肪萃取機 (Soxtec system HT 1043 extraction unit, Tecator, Denmark)，預熱至 100°C。
4. 將脫脂棉筒放入脂肪萃取機當中，下方再裝上含有 40 mL 石油醚 (Petroleum ether) 之鋁杯，進行加熱循環萃取 65 分鐘。
5. 萃取完後，回收石油醚，並將鋁杯至於抽氣櫃中，待石油醚完全揮發後，將鋁杯放入 105°C 烘箱 30 分鐘，完成後將鋁杯取出後放涼秤重。

B. 計算公式

$$\text{粗脂肪(\%)} = \frac{\text{脂肪萃取後鋁杯重} - \text{鋁杯重量}}{\text{樣品乾重}} \times 100$$

(四) 灰分 (Ash) (AOAC, 1984, Methods 7.101)

A. 分析步驟

1. 陶瓷坩堝洗淨後，先以 600°C 灰化，放涼後秤重，避免先前樣品殘留。
2. 秤 1 g 樣品於坩堝中，蓋上上蓋後放入灰化爐 (Maxthermo MC-2838，登盈儀器有限公司，臺灣)，以 600°C 灰化 8 小時。
3. 取出坩堝，放涼後秤重。

B. 計算公式

$$\text{灰分(\%)} = \frac{\text{灰化後坩堝重} - \text{坩堝重}}{\text{樣品乾重}} \times 100$$



(五) 粗纖維 (Crude fiber, CF) (AOAC, 1984, Methods 7.074-7.077)

A. 分析步驟

1. 預先將纖維濾袋 (Fiber bag, C. Gerhardt, Germany) 以 105°C 烘乾後秤重。
2. 秤取 0.5 g 樣品於纖維濾袋中，並套入玻璃製纖維隔片管。
3. 將套好之纖維濾袋放入含有 350 mL 1.25% 硫酸之燒杯中，加熱煮沸 30 分鐘。
4. 煮完後以熱蒸餾水清洗至無泡沫。
5. 後續再將纖維濾袋放入含有 350 mL 1.25% 氫氧化鈉之燒杯中，加熱煮沸 30 分鐘。
6. 煮完後以熱蒸餾水清洗至無泡沫，並以丙酮浸洗至脫色。
7. 待丙酮揮發後放入 105°C 烘箱，烘乾後記錄乾重。
8. 將烘乾之纖維濾袋放入預先準備好之陶瓷坩堝中，以灰化爐 600°C 灰化 8 小時，以校正殘餘之灰分。

B. 計算公式

$$\text{粗纖維(\%)} = \frac{\text{處理後纖維濾袋重} - \text{纖維濾袋重} - \text{灰分}}{\text{樣品乾重}} \times 100$$



(六) 中洗纖維 (Neutral detergent fiber, NDF) (Fettweis and Kühl, 2013; Van Soest et al., 1991)

A. 分析步驟

1. 預先將纖維濾袋 (Fiber bag, C. Gerhardt, Germany) 以 105°C 烘乾後秤重。
2. 秤取 0.5 g 樣品於纖維濾袋中，並套入玻璃製纖維隔片管。
3. 將套好之纖維濾袋放入含有 350 mL 中性洗劑 (表 13) 與 1.75 g Na₂SO₃ 之燒杯中，並於燒杯中滴入 1 到 2 滴 decalin。
4. 將燒杯至於加熱器上加熱，並加入 100 μL 耐熱性澱粉酶 (heat-stable α-amylase, Sigma A3306, USA)，加熱至沸騰後再持續加熱 1 小時。
5. 煮完後以熱蒸餾水清洗至無泡沫，並以丙酮浸洗至洗出液無色。
6. 待丙酮揮發後放入 105°C 烘箱，烘乾後記錄乾重。
7. 殘餘灰分待後續 ADF、ADL 處理完成後再進行分析。

表 13. 中性洗劑配方

Table 13. Neutral detergent formula for 1 liter

Item	Weight/Volume
Sodium lauryl sulfate	30 g
Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA)	18.6 g
Sodium tetraborate decahydrate	6.81 g
Disodium hydrogen phosphate dihydrate	4.56 g
2-ethoxyethanol	10 mL

B. 計算公式

$$\text{NDF}(\%) = \frac{\text{中洗後纖維濾袋重} - \text{纖維濾袋重} - \text{灰分}}{\text{樣品乾重}} \times 100$$



(七) 酸洗纖維 (Acid detergent fiber, ADF) (Fettweis and Kühl, 2013; Van Soest et al., 1991)

A. 分析步驟

1. 將中洗後含有樣品之纖維濾袋套入玻璃製纖維隔片管中。
2. 將套好之纖維濾袋放入含有 350 mL 酸性洗劑 (表 14) 之燒杯中，並於燒杯中滴入 1 到 2 滴 decalin。
3. 將燒杯置於加熱器上加熱，沸騰後再持續加熱 1 小時。
4. 煮完後以熱蒸餾水清洗至無泡沫，並以丙酮浸洗至洗出液無色。
5. 待丙酮揮發後放入 105°C 烘箱，烘乾後記錄乾重。
6. 殘餘灰分待後續 ADL 處理完成後再進行分析。

表 14. 酸性洗劑配方

Table 14. Acid detergent formula for 1 liter

Item	Weight/Volume
N-Cetyl-N, N-trimethylammonium bromide (CTAB)	20 g
98% Sulfuric acid	28 mL

B. 計算公式

$$\text{ADF}(\%) = \frac{\text{酸洗後纖維濾袋重} - \text{纖維濾袋重} - \text{灰分}}{\text{樣品乾重}} \times 100$$



(八) 酸洗木質素 (Acid detergent lignin, ADL)

A. 分析步驟

1. 將酸洗過後之樣品浸泡於 78% H₂SO₄ 中 4 小時。(每小時換一次硫酸)
2. 以煮沸之熱水將纖維濾袋與樣品洗淨至 pH 值為中性。
3. 以丙酮清洗纖維濾袋浸泡至完全脫色。
4. 待丙酮揮發後放入 105°C 烘箱，烘乾後記錄乾重。
5. 將纖維濾袋放入預先秤重之坩堝中，以 600°C 灰化 8 小時，剩餘部分為酸洗不溶灰分。

B. 計算公式

$$\text{ADL}(\%) = \frac{\text{浸泡硫酸後纖維濾袋重} - \text{纖維濾袋重} - \text{灰分}}{\text{樣品乾重}} \times 100$$



六、統計模式

添加物應用於中型半乾青貯之成效、*In vitro* 試驗與 *In situ* 試驗中各時間點分解速率，利用 SAS 統計軟體 (SAS Institute Inc., SAS Campus Drive Cary, NC) 採一般線性模式 (General linear model, GLM) 進行統計分析，若 p 值 < 0.05，則進一步使用最小顯著差異檢驗法 (Least significant difference test, LSD) 進行平均值之比較 (沈，2014)。

芻料原位消化測定試驗中各參數之計算，利用 SAS 統計軟體之非線性模式 (Nonlinear model, NLIN) 進行分析，以 Maquardt method 搭配 Ørskov and McDonald (1979) 提出之模式，求出符合模式中，各參數 (快速可分解部分，a；在瘤胃中緩慢能分解部分，b；b 之分解速率，kd) 之估值，使回歸模式中的剩餘平方總和 (Residual sums of square) 最小。

動物試驗之統計分析參考沈 (2014) 針對 2x2 交叉設計所提出之統計模型，以一般線性模式搭配最小平方均值檢定法 (Least squares mean) 進行統計分析。數學模式如下：

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + P_j + S_{ik} + \tau_{l(ij)} + \epsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} ：觀測值

μ ：總平均

G_i ：組效應， $i = 1, 2$

P_j ：時期效應， $j = 1, 2$

S_{ik} ：第 i 組第 j 個個體 (羊隻) 效應， $k = 1, 2$

$\tau_{l(ij)}$ ：處理 (飼糧) 效應， $l = 1, 2$ ，由第 i 組與第 j 時期中求得

ϵ_{ijk} ：試驗誤差效應

參、結果討論



本論文之結果討論將分為兩個部分：第一部分討論綜合乳酸菌、糖蜜與丙酸銨應用於中型膠膜半乾青貯草捆上之成效；第二部分討論後續所調製出的半乾青貯在營養價值與對泌乳羊生產表現上之差異。

一、添加物於中型半乾青貯膠膜草捆應用上之成效

(一) 盤固草半乾青貯

1. 盤固草半乾青貯 10 週開封性狀

盤固草半乾青貯 10 週開封性狀如陳等(2019)所述。在表層霉斑的抑制效果上，有額外表層噴灑 3% 丙酸銨的三個處理組，其表層霉斑數量均顯著低於對照組 (a: 14.7 ± 11.0 ; b: 3.7 ± 1.7 ; c: 3.7 ± 2.1 ; d: 1.0 ± 1.7)，顯示表層 3% 丙酸銨的添加對於表層霉斑的控制有一定的效果；然而單獨於表層噴灑 3% 丙酸銨的處理組，相較於內部有額外再添加 1.5% 丙酸銨與綜合乳酸菌的兩個處理組，在表層霉斑的面積 (b: 43.4 ± 75.1 ; c: 213.6 ± 124.6 ; d: $13.6 \pm 23.6 \text{ cm}^2$) 與發霉的比例 (b: 1/3; c: 3/3; d: 1/3) 上均有顯著較高的趨勢，顯示光靠表層 3% 丙酸銨的處理，在抑制黴菌的生長上仍有其限制，須適度搭配內部添加物的處理來提高整體抑制霉斑生長與擴散的效果。在半乾青貯的發酵品質上，單獨表層噴灑 3% 丙酸銨與內部綜合乳酸菌搭配表層 3% 丙酸銨的兩個處理組，相較於其餘兩個組別在 pH 值 (a: 5.04 ± 0.23 ; b: 5.04 ± 0.10 ; c: 4.72 ± 0.02 ; d: 4.53 ± 0.07) 與氨態氮占總氮的比例 (a: 35.4 ± 0.5 ; b: 31.7 ± 3.5 ; c: 21.7 ± 0.4 ; d: $22.9 \pm 4.68 \%$ Total N) 上均顯著較低。


綜合上述盤固草半乾青貯表層霉斑與發酵品質的結果，以內部添加綜合乳酸菌 (*P. acidilactici* + *L. buchneri* + *L. plantarum*) 再搭配表層 3% 丙酸銨的處理組表現最好，而後續的動物試驗將以此處理組作為飼糧中盤固草半乾青貯之來源，並前後比較此處理組 42 週與 10 週開封性狀之差異。



2. 盤固草半乾青貯 42 週與 10 週開封比較


表 15 為內部添加綜合乳酸菌搭配表層 3%丙酸銨處理之盤固草半乾青貯，在 42 週與 10 週表層發霉狀況上之比較。在外觀上，42 週與 10 週開封之半乾青貯在各別之三顆草捆中均有一顆出現表層霉斑的生長，其餘四顆草捆則是由外至內均無肉眼可見之霉斑出現，而六顆草捆之表層膠膜均無破損之情形，僅在 42 週所開封之發霉草捆的膠膜表層上有觀察到紅色霉斑的出現(圖 16)。從上述結果當中可以得知，半乾青貯之發霉比例並未隨著儲存時間的延長額而增加，然而從發霉草捆的表層霉斑總面積結果當中可以推知，在受到黴菌汙染的狀況之下，隨著儲藏時間的增加，表層霉斑的面積也有逐漸擴大的趨勢。在劉(2018)第一年盤固草半乾青貯的試驗當中，不論在包材有無破損的情況之下，3%丙酸銨的添加均能使盤固草半乾青貯在 20 週的儲存時間下維持零霉斑生長之情形；而將此使用劑量放大應用至中型膠膜草捆(200 kg)後，雖無法像前述小型真空袋試驗表現如此完美，但仍可看出 3%丙酸銨在表層霉斑的抑制上具有一定的效果。Yitbarek and Tamir (2014)針對丙酸在半乾青貯的使用上，其建議劑量為牧草乾基重之 1.5 至 2%，而本試驗之丙酸銨添加物量為牧草鮮重之 3%，若依照本試驗之實際乾物率與丙酸占丙酸銨之比例進行計算，本試驗之丙酸添加量約為牧草乾重之 4.8%，高於 Yitbarek and Tamir (2014)之建議劑量，且在陳等(2019)的山羊採食偏好試驗當中也證實，具有丙酸銨氣味之盤固草半乾青貯不是山羊優先採食之對象，需搭配調製過程中之乳酸菌的添加，才能使盤固草半乾青貯風味更好；而隨著丙酸銨濃度的上升，延緩盤固草半乾青貯發酵速度的效果也越明顯(劉，2018)；因此在未來盤固草半乾青貯中型膠膜草捆的研究上，或許可以考慮下修丙酸銨之使用劑量，看是否在較低的丙酸銨濃度下，也具有相等抑制黴菌的效果。

表 16 為內部添加綜合乳酸菌搭配表層 3%丙酸銨之盤固草半乾青貯，在 42 週與 10 週發酵品質上之比較。在 pH 值、乳酸菌數量、黴菌數量與酵母數量上，前後兩個開封時間均無顯著差異；在揮發性脂肪酸的濃度上，儲存 42 週相較於儲存 10 週有較高的乳酸、乙酸含量與較低的丁酸含量，在丙酸的含量上則無顯著差異



(表 16)。乳酸含量在 10 週後仍持續增加，此結果與劉(2018)第二年盤固草半乾青貯的試驗結果相似，在其試驗當中四種處理之盤固草半乾青貯，在第 20 週之乳酸含量均高於 10 週，顯示盤固草半乾青貯在 10 週後其乳酸菌的代謝作用仍未停止；而此現象可能與 pH 值有關，在青貯發酵的過程中，當 pH 值低於 4.0 至 4.2 時乳酸菌的生長及代謝即會受到抑制 (Bolsen et al., 1996)，而本研究與劉(2018)之盤固草半乾青貯 pH 值均維持在 4.4 以上，顯示在後期半乾青貯的保存階段當中仍然提供了可以讓乳酸菌產酸的環境；若將盤固草半乾青貯 42 週的發酵品質跟其他文獻進行比對 (表 17)，可以發現 5.36% (DM) 的乳酸含量是有比較高的趨勢，只有在少數水分含量較高的盤固草青貯內，才有高於 5% (DM) 的乳酸含量，然而其發酵時間都在 120 天以下，而本試驗所開封之盤固草半乾青貯已經存放較長一段時間 (294 天)，推測可能是因存放時間較長的緣故，而使 42 週開封之盤固草半乾青貯有相對較高之乳酸含量。

盤固草半乾青貯 42 週之乙酸含量高於 10 週，推測可能與添加物中 *L. buchneri* 或 *L. plantarum* 這兩株菌作用有關，在 Oude Elferink et al. (2001) 的研究當中發現，*L. buchneri* 在 pH 值低於 5.8 之厭氧環境下能夠將乳酸代謝成乙酸與 1,2-丙二醇 (1,2-propanediol)；而在現場的實際應用上，在玉米青貯、黑麥草青貯、高粱青貯與苜蓿青貯的研究當中均發現，在單獨添加 *L. buchneri* 的情況下，青貯中之乙酸含量相較於對照組，均有隨著存放時間延長而增加的趨勢 (Driehuis et al., 2001; Filya, 2003; Kung et al., 2003; Li and Nishino, 2011; Nishino et al., 2003)，顯示 *L. buchneri* 可能是造成本試驗盤固草半乾青貯 42 週之乙酸含量高於 10 週的原因之一；在 Lindgren et al. (1990) 的研究中發現，在缺乏葡萄糖且有檸檬酸鹽存在的厭氧環境之下，*L. plantarum* 能夠將乳酸代謝生成甲酸與乙酸，然而本試驗之盤固草半乾青貯在存放 42 週後，其水溶性碳水化合物的含量仍有 0.54 ± 0.12 (% DM)，也無法確定半乾青貯內是否有檸檬酸鹽的存在，因此 *L. plantarum* 造成盤固草半乾青貯內乙酸含量上升的說法較為存疑。在劉(2018)第二年的盤固草半乾青貯試驗當中，在綜合乳酸菌 (*L. plantarum*, *L. buchneri*, and *P. acidilactici*; total 3×10^6 cfu/g in fresh



grass) 的處理之下，盤固草半乾青貯在 10 週與 20 週乙酸的含量皆明顯的高於乳酸，此結果與本試驗有些許不同，本試驗之盤固草半乾青貯在存放 42 週後，乳酸含量仍高於乙酸，推測可能與綜合乳酸菌使用的劑量與是否有添加丙酸銨有關，在劉(2018)的試驗當中，綜合乳酸菌使用的劑量是本試驗的三倍且沒有與丙酸銨共同使用，然而實際的原因還有待後續的研究來釐清。

在開封穩定性的測試結果中，盤固草半乾青貯在好氧環境下存放 72 小時後，兩者在乳酸菌與黴菌的數量上均無顯著差異，而在酵母菌的數量上 10 週則是顯著低於 42 週。青貯中心溫度是否高於室溫攝氏兩度，是常用來判別青貯開封穩定性的方式，若其中心溫度高於室溫攝氏兩度，可能表示青貯因好氧菌（如：酵母菌、乳酸菌等）作用而導致溫度上升 (Kleinschmit et al., 2005; Wilkinson and Davies, 2012); 從盤固草半乾青貯在好氧環境下存放 72 小時的結果中可以發現，不論是 10 週或是 42 週開封的盤固草半乾青貯，其中心最高溫度均未超過室溫攝氏兩度，顯示兩個時間點開封的半乾青貯均可以在好氧的環境下穩定存放 3 天。

綜合上述表層發霉狀況、半乾青貯品質與開封穩定性測試的結果，盤固草半乾青貯在內部綜合乳酸菌 (*P. acidilactici* + *L. buchneri* + *L. plantarum*, 10^6 cfu/g fresh grass) 與表層 3% 丙酸銨的處理之下，能夠穩定的存放 42 週，並且維持良好的青貯品質；而在盤固草半乾青貯開封之後，其在好氧環境下也能夠穩定的存放三天；若每顆草捆以鮮重 200 公斤、乾物質比率 50%、占飼糧乾基 25% 進行計算，在 150 頭泌乳羊的羊場中（乾物質採食 2.0 公斤），一顆 200 公斤的盤固草半乾青貯，約一天半即可使用完畢，顯示在此調製模式之下，盤固草半乾青貯應用於現場上的可行性。



表 15. 盤固草半乾青貯 10 週與 42 週發霉狀況之比較

Table 15. Comparison of pangolagrass haylage spoilage condition after 10 and 42 weeks storage

Item	Pangolagrass haylage ¹		SEM	P value
	42 weeks	10 weeks		
Surface spoiled rate	1/3	1/3	-	-
Numbers of spoilage spot	1.0	1.0	1.0	-
Surface spoilage area (cm ²)	143.9	13.6	102.2	-
Spoiled haylage weight (kg)	3.5	0.3	2.5	-

¹Treated with inner lactic acid bacteria (*Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*, 10⁶ cfu/g in fresh grass) and outer 3% ammonium propionate.



圖 16. 盤固草半乾青貯之表層霉斑 (d 組, 42 週)。

Figure 16. Mould on pangolagrass haylage surface (group d, 42 weeks).



表 16. 盤固草半乾青貯 10 週與 42 週發酵品質之比較

Table 16. Comparison of pangolagrass haylage fermentation quality after 10 and 42 weeks storage

Item	Pangolagrass haylage ¹		SEM	P value
	42 weeks	10 weeks		
pH	4.41	4.53	0.07	-
LAB ² (log cfu/g)	7.85	8.48	0.33	-
Moulds (log cfu/g)	3.34	3.59	2.06	-
Yeast (log cfu/g)	3.04	4.19	1.98	-
Lactic acid (g/kg DM)	53.6 ^a	17.9 ^b	4.2	*
Aectic acid (g/kg DM)	18.8 ^a	6.7 ^b	2.2	*
Propionic acid (g/kg DM)	7.0	6.1	3.3	-
Butyric acid (g/kg DM)	1.1 ^b	3.5 ^a	0.8	*
after 72 hours aerobic stability test				
LAB (log cfu/g)	7.68	7.32	0.36	-
Moulds (log cfu/g)	1.15	N.D. ⁴	1.41	-
Yeast (log cfu/g)	2.69 ^a	N.D. ^b	0.25	*
MTA ⁵ (°C)	1.5	1.4	0.2	-

¹Treated with inner lactic acid bacteria (*Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*, 10⁶ cfu/g in fresh grass) and outer 3% ammonium propionate.

²LAB = lactic acid bacteria.

³WSC = water soluble carbohydrate.

⁴N.D. = non-detected.

⁵MTA = Maximum temperature above the ambient.

^{ab}Different superscripts indicate that values differ.

* Represents P<0.05. n = 3.



表 17. 其他研究之盤固草青貯與半乾青貯發酵品質

Table 17. Summary of pangolagrass silage and haylage fermentation quality from other studies.

Dry matter*	Storage period	pH	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	WSC ¹ *	Additives	Reference
——%——			————— % DM —————					
55.9	60 days	4.68	0.99	0.19	0.11	-	<i>L. plantarum, L. casei</i>	陳等(2019)
50.8	60 days	5.24	1.07	0.37	0.57	-	non	
23.5	100 days	3.70	6.60	2.23	0.88	7.10	molasses	Tjandraatmadja et al. (1994) ²
38.8	44 days	3.90	3.1	0.64	-	2.77	Sil-All	Meeske et al. (1999) ²
38.8	44 days	4.87	1.0	0.99	-	2.77	non	
20.5	120 days	4.25	2.78	0.40	-	5.30	non	
24.0	120 days	3.90	5.90	1.16	-	4.30	non	
25.2	120 days	4.62	0.24	0.82	-	3.67	non	Niekerk et al. (2008) ²
30.9	120 days	4.32	3.21	0.91	-	5.10	non	
33.0	120 days	4.33	2.41	0.53	-	4.00	non	
34.0	120 days	4.61	1.85	0.91	-	3.43	non	

¹WSC = water soluble carbohydrate.

²Laboratory silo.

*Before ensiling.




(二) 苜蓿半乾青貯

1. 苜蓿半乾青貯之化學組成

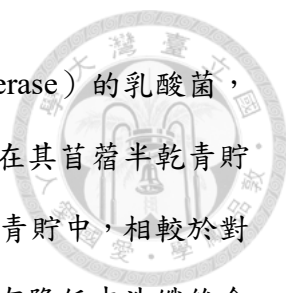
表 18 為苜蓿半乾青貯 10 週開封與苜蓿草調製前之樣品在化學組成與 pH 值上之比較。在 pH 值的結果當中，苜蓿半乾青貯在 10 週發酵後 pH 值皆顯著低於調製前之狀態，表示兩組苜蓿半乾青貯皆有發酵成功；而在綜合乳酸菌、糖蜜與丙酸銨添加的情況之下，苜蓿半乾青貯之 pH 值又較對照組來的低，然而改善幅度不像劉(2018)第二年的苜蓿半乾青貯試驗來的大，在其試驗中添加綜合乳酸菌 (*P. acidilactici* + *L. buchneri* + *L. plantarum*) 的組別在 10 週開封時 pH 值為 4.92，對照組則為 5.42，而本試驗則分別為 5.34 與 5.54，造成此結果的原因，推測可能與苜蓿草的含水量有關；在 Ohshima et al. (1997) 的研究當中，苜蓿青貯隨著乾物質比例的增加，pH 值在開封後也有較高的趨勢，顯示水分的含量會影響苜蓿青貯的發酵狀態，而本試驗之苜蓿草在調製前的乾物率為 63.86%，明顯高於劉(2018)的 40% 至 55%，很可能是導致本試驗苜蓿半乾青貯在 10 週開封時 pH 值較高的原因之一。另外半乾青貯在製作方式與規模上的差異也可能是影響兩次實驗效果有落差的原因之一；雖然在 Johnson et al. (2005) 的研究當中已經指出，利用真空包裝來模擬青貯的發酵是一個有效且實際的方式，然而從 Naoki and Yuji (2008) 的試驗當中可以發現，以真空包裝方式所製作的黑麥草半乾青貯，並沒有辦法完全反映膠膜草捆之間與各別膠膜草捆內變異的情形，顯示實驗室規模之青貯模擬試驗與現場應用之草捆仍有其差異存在，也因此彰顯本研究存在之價值。

在化學組成上，不論有沒有額外使用添加物，苜蓿半乾青貯在粗蛋白、粗脂肪、灰分、氨態氮與酸洗纖維上均無顯著差異；而在有額外添加綜合乳酸菌、糖蜜與丙酸銨的情況之下，苜蓿半乾青貯在 10 週開封後具有比較低水溶性碳水化合物含量 (表 18)，此結果跟 Huisden et al. (2009) 與 Man and Wiktorsson (2002) 之研究有些許差異，在上述兩篇研究當中，在單獨添加糖蜜的情況之下，玉米青貯與樹薯青貯在發酵 135 天與發酵 90 天後開封，其水溶性碳水化合物含量均高於對照組；然而




本試驗所使用之添加物並非只有糖蜜而已，還包含了綜合乳酸菌與丙酸銨，而丙酸銨的噴灑僅侷限在草捆表層，因此水溶性碳水化合物含量的下降應該與綜合乳酸菌的添加較有關係；而在 Huisden et al. (2009)的研究中也發現，在起始水溶性碳水化合物的含量沒有差異的情況之下，有額外使用乳酸菌 (*Pedococcus pentosaceus* + *L. buchneri* or *L. plantarum* + *L. buchneri* + *Enterococcus faecium*) 的玉米青貯，其水溶性碳水化合物含量在開封後顯著低於對照組；因此可以推論出，本試驗之處理組水溶性碳水化合物含量較對照組低，應與綜合乳酸菌的添加較有關係；而且從揮發性脂肪酸的含量當中也可以發現，在有使用添加物的情況之下，苜蓿半乾青貯具有比較高的乳酸含量 (表 19)，顯示在添加綜合乳酸菌與糖蜜的情況之下相較於對照組，其乳酸菌代謝的情形較旺盛，即使在糖蜜添加下提高起始的水溶性碳水化合物含量，其仍然能代謝掉更多的水溶性碳水化合物產生乳酸，進而使苜蓿半乾青貯的 pH 值下降。

在綜合乳酸菌、糖蜜與丙酸銨的處理之下，苜蓿半乾青貯在 10 週開封時相較於對照組有顯著較低的中洗纖維含量 (表 18)；而造成中洗纖維的含量下降，一部分可能跟糖蜜與丙酸銨的添加，進而稀釋中洗纖維在乾物質中的占比有關，在苜蓿半乾青貯的處理組中，額外添加了乾重 1.26 公斤的丙酸銨與乾重 6 公斤的糖蜜，若以每顆草捆 200 公斤、乾物率 63.86%進行計算，額外使用的添加物會使中洗纖維在乾物質中的占比從 29.58%下降至 27.98%，然而處理組與對照組在中洗纖維含量上的差異 (Ck: 32.89; T: 28.96 % DM)，高於添加物稀釋所造成的影響，顯示還有其他原因造成處理組中洗纖維含量的下降；在 Hetta et al. (2003)的試驗中，苜蓿青貯在乳酸菌 (*P. acidilactici* + *L. plantarum*) 與糖蜜的共同處理之下，其中洗纖維的含量在 90 天的發酵後均顯著低於對照組，且在兩個割期的試驗當中均有一樣的結果；然而在另外兩篇苜蓿青貯的研究當中，不論是單獨添加 *L. plantarum* 或是 *P. acidilactici*，苜蓿青貯在開封後其中洗纖維的含量相較於對照組均沒有顯著差異 (Ilavenil et al., 2014; Silva et al., 2016)，顯示乳酸菌的添加對於中洗纖維含量的影響並沒有一致的效應；在 Ding et al. (2019)的研究當中，從垂穗披鹼草 (*Elymus nutans*)



的青貯當中篩出了幾株能夠分泌阿魏酸酯解酶 (Ferulic acid esterase) 的乳酸菌，並將其應用在苜蓿半乾青貯當中，其中包含一株 *L. plantarum*，在其苜蓿半乾青貯的試驗當中，在自家實驗室找到的 *L. plantarum* 添加於苜蓿半乾青貯中，相較於對照組確實能降低中洗纖維的含量，然而商用 *L. plantarum* 的則沒有降低中洗纖維含量的效果，顯示乳酸菌的添加造成苜蓿青貯中洗纖維含量下降，其效果可能來自阿魏酸酯解酶；阿魏酸酯解酶能夠切斷木質素中，阿拉伯糖與阿魏酸連結的酯鍵 (Ester bond)，使其釋放阿魏酸 (Ferulic acid)，進而增加植物細胞壁被水解之可能性 (De Vries et al., 1997)；若要確認本試驗處理組在發酵後中洗纖維含量下降的原因之一，是來自於乳酸菌所分泌的阿魏酸酯解酶的作用，可能要將本試驗所使用到的三種乳酸菌各別培養，並參考 Ding et al. (2019) 材料方法中所描述的方法測定各別乳酸菌的酵素活性，確認其是否會產生阿魏酸酯解酶；然而在 Ding et al. (2019) 與 Nsereko et al. (2008) 研究當中均發現，並非所有被檢測到有阿魏酸酯解酶活性的乳酸菌，應用在青貯後均會造成中洗纖維含量的下降；因此若要再更進一步確認其原因，可能要在檢測出酵素活性後，再以真空包裝試驗各別檢測添加三種乳酸菌後是否會造成中洗纖維含量下降。另外同質發酵乳酸菌對於乾物質回收率 (Dry matter recovery) 的提升，也可能是造成對照組中洗纖維在乾物質中的占比下降的原因之一，在 Muck (2010) 的文獻回顧當中提到，在大部分的狀況下均可以預期同質發酵乳酸菌的添加，對於乾物質的回收率能夠提升二至三個百分點，而在 Reich and Kung (2010) 的研究當中也發現，不論是同時添加 *P. acidilactici* 與 *L. buchneri*，或是同時使用 *L. plantarum* 與 *L. buchneri*，均能夠提升玉米青貯的乾物質回收率，顯示同質與異質發酵乳酸菌的搭配，對於乾物質回收率也有提升的效果，然而本試驗並沒有實際乾物質回收率的數據，因此此部分推論仍有待後續研究證實。

若將本試驗所製作之苜蓿半乾青貯與其他研究進行比對 (表 20)，雖然每個研究之苜蓿草在調製前的狀況都不盡相同，但仍可以發現在乙酸與丁酸的含量上其數值不會落差太大，乳酸的含量則隨著水分含量的變動有比較大的差異，含水量較高之苜蓿青貯，在乳酸的產量上明顯有較高的趨勢 (Ohshima et al., 1997; Kung et



al., 2010)；而本試驗所製作之兩組苜蓿半乾青貯在乳酸的含量上分別為 1.18%與 3.31% (DM)，若與含水量較接近之試驗進行比對 (王等, 2018)，可以發現其數值沒有太大的落差，且本研究有略高的趨勢。綜合上述與其他文獻比對之結果，可以發現本試驗所製作之兩組苜蓿半乾青貯，在揮發性脂肪酸的含量上均落在正常的範圍，並沒有哪一項數值特別突出或低落。在青貯品質評分 (Fleig's score) 上，雖然有額外使用添加物的組別相較於對照組具有顯著較高的乳酸含量，然依據其乳酸、乙酸與丁酸占總酸之百分比換算成青貯評分後 (附表 1)，兩組反而沒有顯著差異 (表 19)；而會造成此結果，主要是由於處理組相較於對照組在乙酸與丙酸的含量上有較高的趨勢，在總酸的含量被乙酸與丙酸提高的狀況之下，稀釋掉了乳酸在整體揮發性脂肪酸中的占比，因而造成最終青貯品質評分沒有差異的結果。

綜合上述 pH 值與化學組成的結果，苜蓿半乾青貯在綜合乳酸菌 (*P. acidilactici* + *L. buchneri* + *L. plantarum*)、糖蜜與丙酸銨的處理之下，能夠有效提高苜蓿半乾青貯的乳酸含量，並且具有降低中洗纖維含量與 pH 值的效果，然而在 pH 值的變動幅度上則不若劉(2018)第二年之苜蓿半乾青貯試驗來的大。在本試驗與劉(2018)的試驗當中，均未針對綜合乳酸菌的使用劑量進行探討，雖然在 Kung et al. (2003) 的試驗當中指出，*L. buchneri* 在 1×10^5 cfu/g (in fresh grass) 的劑量之下，對於苜蓿青貯有最好的使用效果，而在 Yang et al. (2019)與 Zhang et al. (2009)的研究當中也顯示，*L. plantarum* 不論在 1×10^6 cfu/g 或 2×10^6 cfu/g (in fresh grass) 的使用之下，對於苜蓿青貯均有正向的效果，然而上述研究均只針對單一乳酸菌的添加進行探討，而本研究同時使用了三種乳酸菌；因此在未來的研究上，或許可以針對綜合乳酸菌的使用劑量與比例進行調整，上下調整乳酸菌使用的劑量與改變三種乳酸菌混合的比例，看其對於苜蓿半乾青貯草捆的發酵是否會有更好的效果。



表 18. 苜蓿半乾青貯與原始苜蓿草之化學組成與 pH 值

Table 18. Chemical composition and pH value of alfalfa haylage and alfalfa before ensiling

Item	Alfalfa haylage		Alfalfa before ensiling	SEM	P value
	Ck ¹	T ²			
pH	5.54 ^b	5.34 ^c	6.02 ^a	0.08	*
DM (%)	62.84	64.14	63.86	3.30	-
CP (% DM)	22.75	24.08	24.55	0.96	-
EE (% DM)	1.14 ^{ab}	1.10 ^b	1.31 ^a	0.09	*
Ash (% DM)	9.19 ^{ab}	9.90 ^a	8.75 ^b	0.44	*
NDF (% DM)	32.09 ^a	28.96 ^b	29.58 ^{ab}	1.59	*
ADF (% DM)	23.21 ^a	21.7 ^a	18.07 ^b	1.24	*
WSC ³ (% DM)	5.58 ^b	4.57 ^c	6.39 ^a	0.34	*
NH ₃ -N ⁴ (% total N)	16.33 ^a	18.67 ^a	4.67 ^b	3.97	*

¹Ck = control group, without additives.

²T = treatment group, treated with lactic acid bacteria (*Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*, 10⁶ cfu/g in fresh grass), 3% molasses and outer surface sprayed with 3% ammonium propionate.

³WSC = water soluble carbohydrate.

⁴NH₃-N = ammonia nitrogen.

^{abc}Different superscripts indicate that values differ in the same row.

* Represents P<0.05.

n = 3.

表 19. 綜合乳酸菌、糖蜜與丙酸銨對於苜蓿半乾青貯揮發性脂肪酸與青貯評分之影響

Table 19. The effect of lactic acid bacteria, molasses and ammonium propionate treatment on volatile fatty acids and Fleig's score of alfalfa haylage

Item	Alfalfa haylage		SEM	P value
	Ck ¹	T ²		
Acetic acid (g/kg DM)	4.8	13.3	6.3	-
Propionate acid (g/kg DM)	1.8	7.9	3.8	-
Butyric acid (g/kg DM)	0.9	1.3	0.5	-
Lactic acid (g/kg DM)	18.8 ^b	33.1 ^a	2.0	**
Fleig's score	85.7	81.7	8.3	-
% total VFA				
Acetic acid	18.2	22.3	4.7	-
Butyric acid	3.5	2.3	0.5	-
Lactic acid	71.7	62.3	7.6	-

¹Ck = control group, without additives.

²T = treatment group, treated with lactic acid bacteria (*Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*, 10⁶ cfu/g in fresh grass), 3% molasses and outer 3% ammonium propionate.

^{ab}Different superscripts indicate that values differ in the same row.

** represents P<0.01.

n = 3.

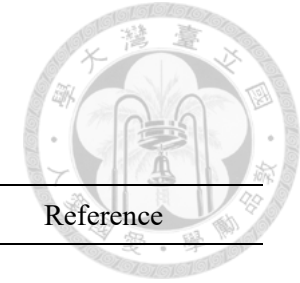


表 20. 其他研究之苜蓿青貯與半乾青貯發酵品質

Table 20. Summary of alfalfa silage and haylage fermentation quality from other studies

Dry matter*	Storage period	pH	Lactic acid	Acetic acid	Butyric acid	WSC ^{1*}	Additives	Reference
——%——			————— % DM —————					
19.0	45 days	4.95	11.0	1.49	0.57	-	non	
27.0	45 days	4.67	9.67	1.14	0.08	-	non	Ohshima et al. (1997) ²
31.0	45 days	5.26	6.99	1.26	0.56	-	non	
42.0	45 days	5.50	4.12	0.48	0.00	-	non	
44.0	65 days	4.66	4.18	1.51	0.05	3.7	non	Kung et al. (2010)
45.3	65 days	4.58	4.28	1.41	0.02	5.1	non	
54.8 [§]	60 days	5.42	0.28	0.56	0.00	-	non	
55.2 [§]	60 days	4.77	2.47	0.45	0.06	-	<i>L. plantarum</i>	王等(2018)
55.6 [§]	60 days	4.93	0.98	0.41	0.01	-	<i>L. plantarum, L. casei</i>	
35.6	55 days	5.30	3.51	0.39	-	-	non	
35.6	55 days	4.80	5.54	0.71	-	-	<i>P. acidilactici, L. plantarum, Streptococcus faecium</i>	Tengerdy et al. (1991) ²

¹WSC = water soluble carbohydrate.

²Laboratory silo.


*Before ensiling. §After ensiling.



2. 黴菌抑制效果與開封穩定性

在苜蓿半乾青貯表層發霉的狀況上，兩個組別的三顆草捆中均有兩顆表層出現霉斑生長的情形，而在這六顆草捆的表層膠膜上均沒有發現明顯的破損；雖然從現場的觀察上可以發現，在表層 3%丙酸銨的處理之下，苜蓿半乾青貯表層的霉斑數量與面積是有比較小的趨勢（圖 17），然而在最終的統計結果上，兩個組別在表層霉斑數量與發霉總面積的比較中均沒有顯著性的差異（表 21）；會造成最終在統計結果上沒有顯著性的差異，推測可能與兩個組別中均有一顆草捆是保存良好的狀態，因而拉大了標準偏差有關。從劉(2018)第一年的丙酸銨試驗當中可以得知，在真空包裝沒有破損的狀況之下，不論有沒有額外使用添加物，在 20 週的存放時間內半乾青貯均不容易出現明顯外觀發霉的情況；而本研究表層丙酸銨的添加，主要就是希望能在表層膠膜沒有那麼完整的狀況之下，有效的去限制表層黴菌的生長，因此將儲存狀況良好的草捆放入統計內，或許沒有辦法很確切的反應丙酸銨在空氣有滲漏的情況之下，對於半乾青貯保護的效果；因此後續本研究也將儲存狀況良好的草捆移除，只用剩下四顆表層有發霉的草捆去進行統計分析，其結果如下，在表層霉斑數量上兩個組別分別為，對照組： 11.0 ± 2.8 ，處理組： 2.5 ± 2.1 ，P 值 0.07；而表層發霉總面積則為，對照組： 932.34 ± 759.89 ，處理組： 120.42 ± 12.72 ，P 值 0.26；雖然仍沒有達到 0.05 的顯著差異，但可以發現處理組在表層霉斑的數量上有顯著較低的趨勢，顯示表層 3%丙酸銨的噴灑，對於苜蓿半乾青貯表層霉斑的抑制仍有其效果存在。

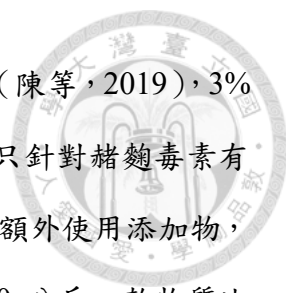
在苜蓿半乾青貯發霉部位黴菌毒素的含量上，兩個組別均有被檢測出黃麴毒素 B1、嘔吐毒素、伏馬鐮孢毒素與玉米烯酮毒素的殘留，並且在統計上無顯著差異，而處理組相較於對照組則是沒有被檢測出赭麴毒素的殘留（表 22）；其中值得注意的是兩個組別的玉米烯酮毒素含量均超過歐盟針對反芻動物所制定之最高限量（500 ppb, moisture content of 12%）；玉米烯酮毒素主要是 *Fusarium graminearum*、*F. roseum*、*F. culmorum* 與 *F. crookwellense* 的二次代謝物，而大部分新月形黴菌屬（*Fusarium*）的黴菌均無法在酸性與厭氧的環境中存活（Ogunade et



al., 2018), 顯示玉米烯酮毒素的殘留較不可能出現在半乾青貯的發酵跟保存階段當中；而在 Jouany (2007) 的文獻當中指出新月形黴菌屬的孢子廣泛的存在於土壤當中，也較容易於田野間污染植株；因此本研究中玉米烯酮毒素的殘留，推測可能是由於苜蓿在生長的過程或是在萎凋的階段中受到新月形黴菌屬的黴菌污染所導致，而在苜蓿草的原始草樣當中也確實發現到有高量的玉米烯酮毒素殘留 (1197 ppb in DM basis)，顯示本研究之玉米烯酮毒素污染很可能是發生在苜蓿半乾青貯調製之前。

在開封穩定性的測試結果當中，兩個組別之苜蓿半乾青貯在 72 小時的好氧環境中存放後，其 pH 值分別為 5.51 與 5.33 (表 21)，而與兩組開封當下的狀態相比 (5.54; 5.34) 並沒有明顯的差異；在黴菌與酵母菌的數量上，開封 72 小時後之數值也未較開封當下來的低 (表 21)，顯示本研究之兩組苜蓿半乾青貯並沒有因為好氧微生物的作用，而導致明顯 pH 值上升的狀況出現；此結果與 Kung et al. (1991) 與 Yuan et al. (2018) 之苜蓿青貯試驗類似，在上述兩篇試驗當中不論有沒有使用添加物，苜蓿青貯在開封後二至三天其 pH 值均沒有明顯的變動，分別到了開封後第四天與第七天時，沒有使用添加物之苜蓿青貯其 pH 值才開始有了明顯的上升；顯示在本試驗中若要看到 pH 值在開封後有明顯的變動，可能要將開封穩定性測試的時間至少拉長為 96 小時以上，才較有可能看出添加物對於開封後苜蓿半乾青貯 pH 值的影響。另外在 72 小時內的溫度變化中可以發現，兩個組別之中心溫度在前 48 小時均隨著室溫的上升跟下降而波動，然而在第三天下午六點時可以看到兩組苜蓿半乾青貯之中心溫度，並不像前兩天一樣隨著室溫的下降而跟著降低，反而有略為升高的趨勢，顯示兩組之苜蓿半乾青貯，在 72 小時的好氧環境中存放，其中心溫度雖然均未超過室溫 2°C，但是在開封穩定性試驗的末期，兩組之苜蓿半乾青貯均有蓄熱的現象出現；推測可能跟酵母菌與黴菌代謝產熱有關，但其代謝作用可能才剛開始，因此對於 pH 值的影響並沒有很大。

綜合上述表層發霉與開封穩定性試驗結果，在草捆表層之環境有利於黴菌生長的情況之下，3%丙酸銨的添加能夠限制苜蓿半乾青貯表層霉斑的生長，然而在



黴菌毒素的抑制上，則與盤固草半乾青貯 10 週開封的結果類似(陳等, 2019), 3% 丙酸銨的添加並沒有辦法有效的改善大部分黴菌毒素的含量, 只針對赭麴毒素有比較一致性抑制的結果; 而在苜蓿半乾青貯開封後, 不論有沒有額外使用添加物, 都可以在好氧的環境中穩定的存放兩天; 若每顆草捆以鮮重 200 公斤、乾物質比率 50%、占飼糧乾基 25% 進行計算, 在 150 頭泌乳羊的羊場中(乾物質採食 2.0 公斤), 一顆 200 公斤的苜蓿半乾青貯, 約一天半即可使用完畢, 顯示開封後兩天的保存期限, 對於現場的應用上來講已綽綽有餘。

本研究只針對 3% 丙酸銨的劑量進行探討, 雖然在劉(2018)的研究當中已經探討過 1.5% 丙酸銨的使用效果, 但是小型的真空包裝試驗與現場的膠膜草捆之間仍存在其差異性 (Naoki and Yuji, 2008), 且在劉(2018)的試驗當中, 丙酸銨與綜合乳酸菌的使用均是個別探討, 而本研究雖有內外之分, 但綜合乳酸菌與丙酸銨仍是應用在同一顆草捆當中, 因此在未來的研究上或許可以參考盤固草半乾青貯段落中之敘述(第 62 頁), 下修丙酸銨之使用劑量, 看其是否能夠達到與 3% 丙酸銨相等之效果。



表 21. 苜蓿半乾青貯之表層發霉狀態與微生物數量

Table 21. Surface mouldy condition and microbial population of alfalfa haylage

Item	Alfalfa haylage		SEM	P value
	Ck ¹	T ²		
at opening of haylage				
Surface spoiled rate	2/3	2/3	-	-
Numbers of spoilage spot	7.3	1.7	4.9	-
Surface spoilage area (cm ²)	621.56	80.28	540.08	-
Microbial population (log cfu/g)				
LAB ³	3.46	6.07	2.25	-
Moulds	3.72	4.00	1.37	-
Yeast	1.79	4.48	2.35	-
after 72 hours aerobic stability test				
pH	5.51 ^a	5.33 ^b	0.05	*
Microbial population (log cfu/g)				
LAB ³	4.39	5.32	1.19	-
Moulds	1.71	N.D. ⁴	1.07	0.12
Yeast	4.11	1.43	1.52	0.09

¹Ck = control group, without additives.

²T = treatment group, treated with lactic acid bacteria (*Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*, 10⁶ cfu/g in fresh grass), 3% molasses and outer 3% ammonium propionate.

³LAB = lactic acid bacteria.

⁴N.D. = non-detected.

^{ab}Different superscripts indicate that values differ in the same row.

* Represents P<0.05.

n = 3.



表 22. 苜蓿半乾青與原始苜蓿草之黴菌毒素含量

Table 22. Mycotoxins of alfalfa haylage and alfalfa before ensiling

Mycotoxins ¹	Alfalfa haylage		Alfalfa before ensiling	SEM	P value
	Ck ²	T ³			
ppb in DM basis					
Aflatoxin B1	5.8	5.1	N.D. ⁴	1.5	-
Deoxynivalenol	417	334	N.D.	130	-
Fumonisin B1	165	220	N.D.	71	-
T-2 toxin	N.D.	N.D.	N.D.	-	-
Zearalenone	1373	1277	1197	233	-
Ochratoxin A	6.2	N.D.	N.D.	2.0	-

¹Haylage samples were from mouldy spots.

²Ck = control group, without additives.

³T = treatment group, treated with lactic acid bacteria (*Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*, 10⁶ cfu/g in fresh grass), 3% molasses and outer 3% ammonium propionate.

⁴N.D. = non-detected.

Control group n = 2 (1 haylage bale did not have any mouldy spot outer or inner), others n = 3



圖 17. 苜蓿半乾青貯表層霉斑生長情形。(左：對照組；右：處理組)

Figure 17. Surface mouldy spoilage of alfalfa haylage. (left: control group; right: treatment group)

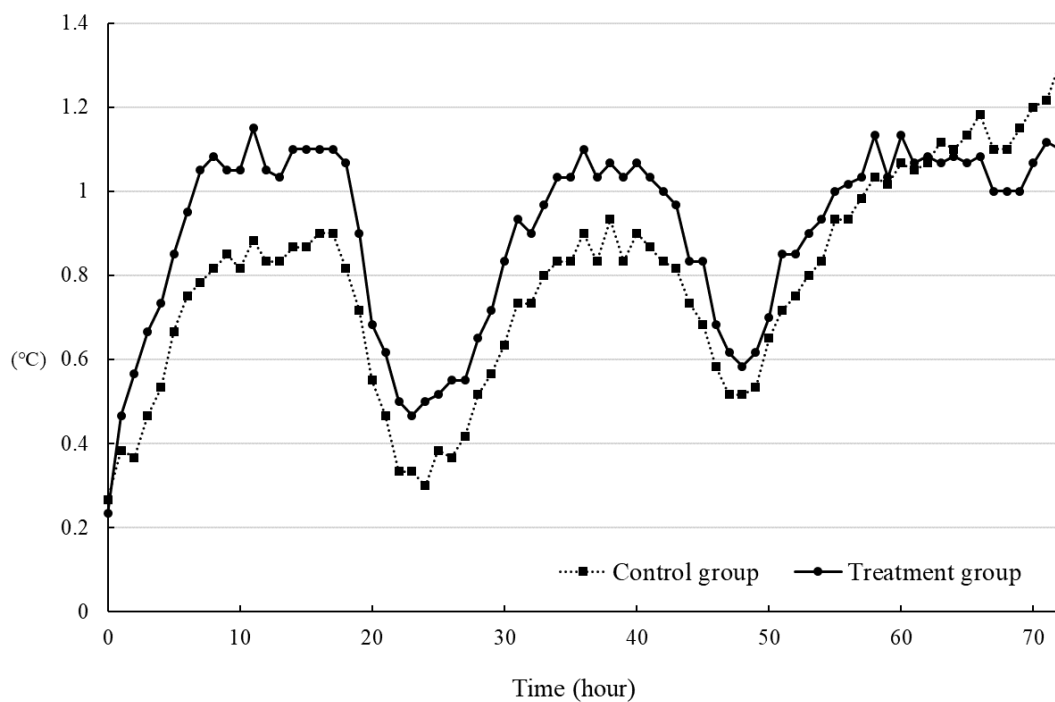


圖 18. 苜蓿半乾青貯開封穩定性測試。

Figure 18. Aerobic stability test of alfalfa haylage. Control group: without additives. Treatment group: treated with lactic acid bacteria (*Pediococcus acidilactici* + *Lactobacillus buchneri* + *Lactobacillus plantarum*, 10^6 cfu/g in fresh grass), 3% molasses and outer 3% ammonium propionate. All temperature here were standardize with ambient temperature.



二、盤固草與苜蓿半乾青貯營養價值評估


(一) 泌乳羊試驗

1. 各組成分日採食量

表 23 為泌乳羊對於半乾青貯飼糧或是乾草飼糧之各組成分日採食量的結果，兩個組別在乾物質、有機物質與粗蛋白質的採食量上均無顯著差異，而吃半乾青貯的組別相較於乾草組，具有比較高的粗脂肪與非纖維碳水化合物採食量，與較低的纖維採食量；若將上述的結果與兩組飼糧配方之化學組成（表 11）進行比對，可以發現在粗蛋白質含量上兩組之飼糧無明顯差異，在粗脂肪與非纖維碳水化合物的含量上，半乾青貯組之飼糧則明顯高於乾草組之飼糧，而在纖維的含量上，不論是中洗纖維、酸洗纖維還是酸洗木質素，半乾青貯組之飼糧均低於乾草組之飼糧，顯示在乾物質採食量沒有差異的情況之下，兩組飼糧配方在化學組成上的差異就造成了最終各組成分採食量差異的結果。

本研究在飼糧配方的組成上有刻意將兩組飼糧調整成等能量與等蛋白質之條件，然而在纖維的含量上，半乾青貯組之飼糧明顯低於乾草組，會造成此差異主要是由於，本試驗所選用之進口苜蓿乾草在纖維的含量上(NDF:47.63; ADF:38.43; ADL:7.47, % DM) 明顯高於苜蓿半乾青貯 (NDF:28.96; ADF:27.71; ADL:4.28, % DM, 表 10)；而從 Clancy et al. (1977)與 Gordon et al. (1961)的研究當中均可以發現，以同一個割期的苜蓿草所製作之乾草、半乾青貯與青貯，其化學組成並不會有太大的差異；顯示本研究所選用之進口苜蓿乾草與國產苜蓿半乾青貯並非為同一個時期所收割，因而造成品質上較大的落差。

由於中洗纖維在瘤胃中消化較緩慢，且在瘤胃中停留時間較久，因此容易造成乾物質採食量較低的現象 (Yang and Beauchemin, 2007)；在 West et al. (1999)的試驗當中發現，在等精芻比的條件之下，飼糧中之中洗纖維含量由 30.2%逐步上升至 42.0% (in DM basis)，泌乳牛之乾物質採食量會隨著纖維含量的上升而逐漸下降



(從日採食 23.3 公斤下降至 19.0 公斤)；而本試驗兩組飼糧之中洗纖維含量分別為 30.01 與 35.84% (in DM basis)，若依照上述之模式理應在乾物質採食量上造成差異，但在本試驗中並沒有發現此現象，中洗纖維含量較高之乾草飼糧與中洗纖維含量較低之半乾青貯飼糧在乾物質採食量上並無顯著差異 (表 23)，然而影響乾物質採食量的因子並非只有中洗纖維而已；在 Lahr et al. (1983) 的研究當中發現，餵飼泌乳牛水分含量不同之混合飼糧，隨著飼糧中含水量的上升，泌乳牛之乾物質採食量也隨之下降，而在 Jackson and Forbes (1970) 的研究中也發現，隨著青貯中水分含量的上升，牛隻的乾物質採食也有下降的趨勢，顯示飼糧中水分含量的差異會影響牛隻的乾物質採食量；另外在其他的文獻當中也指出，乙酸含量與 pH 值的差異會影響反芻動物之乾物質採食量，在 Buchanan-Smith (1990) 的研究當中發現，隨著苜蓿青貯中乙酸含量的上升，閩綿羊之乾物質採食量也隨之下降，而在 Shaver et al. (1985) 的研究當中，以碳酸氫鈉校正玉米青貯與苜蓿半乾青貯的 pH 值，發現隨著 pH 值的上升，荷蘭閩公牛的乾物質採食也有增加的趨勢；而本研究之兩組飼糧在 pH 值、乙酸與水分的含量上均有明顯的差異，因此推測乾物質採食量沒有差異的結果，可能與中洗纖維、pH 值、乙酸與水分含量等四個因子的共同影響有關。

表 23. 不同飼糧組成對於阿爾拜因泌乳羊各組成分日採食量之影響

Table 23. Effect of different diets on daily feed intake of nutrients by lactating Alpine goats



Item	Diet		SEM	P value
	Haylage ¹	Hay ²		
	g/d			
Dry matter intake	1619.9	1608.7	19.5	-
OM intake	1513.4	1511.2	17.1	-
CP intake	324.2	317.5	4.6	-
CF intake	222.7 ^b	292.5 ^a	8.4	*
NDF intake	382.3 ^b	555.8 ^a	32.6	*
ADF intake	242.7 ^b	329.0 ^a	10.6	*
ADL intake	34.2 ^b	42.1 ^a	1.3	*
EE intake	26.7 ^a	16.4 ^b	0.3	*
NFC ³ intake	780.3 ^a	621.6 ^b	33.2	*

¹Haylage diet have 50% forage which consists of alfalfa haylage and pangolagrass haylage in equal proportions.

²Hay diet have 50% forage which consists of alfalfa hay and pangolagrass hay in equal proportions.

³NFC: non-fiber carbohydrate = OM – (NDF + CP + EE).

^{ab}Different superscripts indicate that values differ in the same row.

* Represents P<0.05.

n = 4.



2. 不同飼糧中各組成分之表面消化率

表 24 為不同飼糧之表面消化率，兩個組別在粗蛋白質、粗脂肪與各項纖維的消化率當中均沒有顯著性的差異，而在乾物質、有機物質與非纖維碳水化合物消化率上，半乾青貯飼糧則顯著高於乾草飼糧。會造成半乾青貯飼糧具有比較好的乾物質與有機物質消化率，推測與兩個組別所使用的首蓆草在化學組成上差異較大有關（表 10），本研究所使用之首蓆半乾青貯在粗纖維、中洗纖維與酸洗纖維的含量上均較進口首蓆乾草低很多，而在粗蛋白質的含量上則有明顯較高的趨勢；在 Weir et al. (1960) 的研究當中發現，隨著首蓆草成熟度的增加（纖維比例上升、粗蛋白質比例下降），其有機物質的消化率也隨之下降，顯示造成本研究動物試驗在消化率上的差異，很可能與首蓆草在化學組成上的差異有關；而從後續體外乾物質消化率與原位消化試驗的結果當中，也可以驗證此推論，本研究所使用之首蓆半乾青貯在 IVDMD 與瘤胃中有效可降解的部分（Effective degradability, passage rate: 5%/h）分別為 83.66%與 73.09%，明顯高於進口首蓆乾草的 71.62%與 61.34%（表 31），更加確認首蓆草選用上的差異，是造成半乾青貯飼糧具有較高的乾物質與有機物質表面消化率的原因之一。另外從非纖維碳水化合物採食量與其表面消化率的差異，也可以解釋為什麼以半乾青貯為主之飼糧具有較高的乾物質與有機物質消化率；半乾青貯飼糧相較於乾草飼糧具有較高的非纖維碳水化合物採食量與表面消化率，且其在整體乾物質採食中的占比快接近一半，因此在非纖維碳水化合物的採食量與消化率都較高，而其他組成分的消化率均沒有差異的情況之下，半乾青貯飼糧自然有比較高的乾物質消化率。

綜合上述採食量與消化率的結果，以國產半乾青貯為主之飼糧相較於乾草，能夠給予反芻動物更多的非纖維碳水化合物，且在消化率更佳的情況下，提供反芻動物更多的能量。然而本研究所使用之首蓆半乾青貯品質明顯較高，若改以成熟度較高之首蓆草來進行半乾青貯製作實驗，其是否仍能維持此效果，還有待後續研究進行探討。

表 24. 不同飼糧組成對於阿爾拜因泌乳羊各組成分表面消化率之影響

Table 24. Effect of different diets on apparent digestibility of lactating Alpine goats

Item	Diet		SEM	P value
	Haylage ¹	Hay ²		
	%			
Dry matter digestibility	76.4 ^a	73.2 ^b	0.4	*
OM digestibility	79.0 ^a	74.8 ^b	0.4	*
CP digestibility	77.9	75.5	1.1	-
CF digestibility	63.1	59.5	1.6	-
NDF digestibility	59.9	59.3	2.1	-
ADF digestibility	65.1	61.7	2.4	-
ADL digestibility	35.9	27.5	4.0	-
EE digestibility	77.9	62.6	7.3	-
NFC ³ digestibility	89.1 ^a	86.8 ^b	0.6	*

¹Haylage diet have 50% forage which consists of alfalfa haylage and pangolagrass haylage in equal proportions.

²Hay diet have 50% forage which consists of alfalfa hay and pangolagrass hay in equal proportions.

³NFC: non-fiber carbohydrate = OM – (NDF + CP + EE).

^{ab}Different superscripts indicate that values differ in the same row.

* Represents P<0.05.

n = 4.



3. 乳產量與泌乳效率

表 25 為阿爾拜因泌乳羊之乳產量與泌乳效率，在泌乳量與泌乳效率上，兩個組別均無顯著差異，而將泌乳量校正成 4%脂肪校正乳後，兩個組別依然沒有顯著差異，且兩個組別相差的數值較校正前更為接近；顯示半乾青貯飼糧雖然能提供更多非纖維碳水化合物給羊隻，並且具有更好的表面消化率，然而此效果並未反映在羊隻的泌乳量上，而會造成此結果，推測可能與泌乳羊的泌乳量有關；從 Hussain et al. (1996)與 Kawas et al. (1991)的研究當中可以發現，不論是給予不同種類芻料（乾草、青貯）或是改變飼糧中的精芻比，對於乳產量較低的泌乳羊，其泌乳量的改變不是差異不大不然就是沒有顯著差異；而本試驗所選用之泌乳羊，有兩頭其起始泌乳量均較低（1.131；1.221 g/d，表 9），因此推測雖然半乾青貯飼糧能夠提供更多非纖維碳水化合物給予羊隻，然而在泌乳量較低的情況之下，並沒有辦法完全的將半乾青貯飼糧的優勢反映在乳量上面。

綜合上述採食量、消化率與乳產量之結果，雖然在本研究當中半乾青貯飼糧並沒有辦法有效的提高阿爾拜因泌乳羊的乳產量，但是在以國產半乾青貯為主要芻料來源之飼養模式之下，仍舊能夠使阿爾拜因泌乳羊維持與乾草飼養模式之下相等的乾物質採食量，並保持相等的泌乳表現。

表 25. 不同飼糧組成對於阿爾拜因泌乳羊乳產量與飼糧利用效率之影響

Table 25. Effect of different diets on milk yield and feed efficiency of lactating Alpine goats



Item	Diet		SEM	P value
	Haylage ¹	Hay ²		
Milk yield (kg/d)	1.815	1.716	0.140	-
4% fat corrected milk ³ (kg/d)	1.474	1.481	0.071	-
Milk efficiency ⁴	1.11	1.05	0.03	-

¹Haylage diet have 50% forage which consists of alfalfa haylage and pangolagrass haylage in equal proportions.

²Hay diet have 50% forage which consists of alfalfa hay and pangolagrass hay in equal proportions.

³4% fat corrected milk = milk yield × 0.4 + milk fat yield × 15. (NRC, 1989)

⁴Milk efficiency = daily milk yield/daily dry matter intake.

n = 4.



4. 乳組成

表 26 為在不同飼糧處理之下乳組成之差異，在大部分的乳組成當中（乳脂、乳蛋白、乳糖、無脂固形物、總固形物、酪蛋白、脂肪酸、檸檬酸、 β -羥基丁酸）兩個組別均無顯著差異。而在體細胞數的含量上，半乾青貯飼糧組顯著高於乾草飼糧組，其中編號 502 之試驗羊隻其體細胞數（第一期： $1954 \times 10^4/\text{mL}$ ；第二期： $1755 \times 10^4/\text{mL}$ ）明顯高於其他羊隻，且高於正常羊隻之體細胞數範圍 (Hunter, 1984)；因此將其剔除後，將剩餘數值再重新跑一次統計分析，所得到之新體細胞數均值為：半乾青貯飼糧組 $278 \times 10^4/\text{mL}$ 、乾草飼糧組 $158 \times 10^4/\text{mL}$ ，兩組在統計上無顯著差異 ($P=0.13$)。

在乳中尿素氮的結果當中，半乾青貯飼糧組顯著低於乾草飼糧組，然而兩個組別在蛋白質的採食量與消化率上均沒有顯著差異，顯示並不是因為氮源攝取不足而造成乳中尿素氮含量的下降；從本試驗中碳水化合物的攝取上可以發現，半乾青貯飼糧組相較於乾草飼糧組具有較高的非纖維碳水化合物採食量與消化率，此結果跟 Higgs et al. (2013)與 Staerfl et al. (2012)的研究結果類似，在上述兩篇研究當中不論是於飼糧中直接補充糖蜜或是給予泌乳牛含糖量較高之黑麥草，其生乳中尿素氮的含量均顯著低於對照組，顯示碳源的添加能夠降低生乳中尿素氮的含量；而在 Whitelaw et al. (1991)的研究當中指出，額外注射葡萄糖於瘤胃中，能夠促進瘤胃微生物對於氮的利用效率，降低血液與尿中尿素的含量；綜合上述研究之結果，推測本研究半乾青貯飼糧組相較於乾草飼糧組具有較低的乳中尿素氮含量，可能是由於半乾青貯飼糧能夠提供較多的非纖維碳水化合物，進而促進瘤胃微生物對於氮的利用效率，降低血液中尿素的濃度，最終導致乳中尿素氮含量的下降。

綜合上述乳組成之結果，以半乾青貯飼餵泌乳羊相較於乾草飼養模式，並不會改變羊乳之乳組成，然而在瘤胃微生物有更多的能量可以利用的條件之下，飼糧中之氮能夠以更有效率的方式被利用。



表 26. 不同飼糧組成對於阿爾拜因泌乳羊乳組成之影響

Table 26. Effect of different diets on milk composition of lactating Alpine goats

Milk composition	Diet		SEM	P value
	Haylage ¹	Hay ²		
Fat (%)	2.71	2.99	0.11	-
Protein (%)	2.98	2.98	0.07	-
Lactose (%)	4.09	4.04	0.04	-
SNF ³ (%)	7.77	7.71	0.08	-
Total solid (%)	10.48	10.69	0.09	-
Casein (%)	2.24	2.22	0.07	-
Saturated fatty acid (%)	2.04	2.22	0.09	-
Unsaturated fatty acid (%)	0.57	0.60	0.01	-
NEFA ⁴ (mmol/100g fat)	1.31	1.34	0.19	-
Somatic cell count (10 ⁴ /mL)	697 ^a	557 ^b	198	*
Urea nitrogen (mg/dL)	28.9 ^b	32.2 ^a	1.1	*
Citric acid (mg/dL)	126	131	12	-
β-hydroxybutyrate (mmol/L)	0.04	0.05	0.01	-

¹Haylage diet have 50% forage which consists of alfalfa haylage and pangolagrass haylage in equal proportions.

²Hay diet have 50% forage which consists of alfalfa hay and pangolagrass hay in equal proportions.

³SNF = solid non-fat.

⁴NEFA = non-esterified fatty acid.

^{ab}Different superscripts indicate that values differ in the same row.

*Represents P<0.05.

n = 4.



5. 經濟效益評估

表 27 為本動物試驗所使用之半乾青貯與乾草在市場上之價格。乾草價格取自中央畜產會，半乾青貯價格之計算則依乾草價格加上各添加物使用之價格與膠膜捆包製作之成本 (卜, 2007)，其中苜蓿半乾青貯雖為國產，但因無國產苜蓿乾草之價格，因此以美國當地苜蓿乾草之價格作為基底來計算 (5.8 元/公斤乾物質，美國農業部)，不以市場上進口苜蓿乾草之價格作為基底來計算，主要是考量到進口乾草價格受到運輸與經銷商的影響，沒有辦法適當的反應本地生產之作物的價格；在添加物的價格上，乳酸菌菌粉與丙酸銨之價格取自網路價格之均值，而糖蜜價格則取自台糖公司，丙酸銨每公斤 6 元、乳酸菌菌粉每公克 68.1 元 (2×10^{11} cfu/g)、糖蜜每公斤 6 元，最後再將所有的價格轉換為乾基表示 (半乾青貯以 50% DM 計算；乾草以 88% DM 計算)。結果顯示，盤固草半乾青貯每公斤乾物質之價格會高於盤固乾草 0.93 元，而國產苜蓿半乾青貯每公斤乾物質之價格則低於進口苜蓿乾草 8.82 元。

表 28 為半乾青貯與乾草飼糧在 TMR 價格上之計算。其中大宗飼料原料之價格取自中央畜產會，玉米粉每公斤 7.2 元、大豆粕每公斤 12.6 元，而小宗飼料原料之價格則取自網路價格之均值，氧化鎂每公斤 12.0 元，磷酸氫鈣每公斤 6.4 元，食鹽每公斤 2.0 元，礦物質預混物每公斤 11.8 元，維生素預混物每公斤 44.2 元；另外考量到半乾青貯黴菌毒素出現的比率高於乾草，因此在半乾青貯飼糧的成本當中額外再加入黴菌毒素吸附劑之成本 (每公斤 300 元)。結果顯示，半乾青貯飼糧每公斤乾物質約 8.08 元，而乾草飼糧每公斤乾物質則約為 10.24 元；在現場的飼養管理上，若以半乾青貯飼糧取代乾草飼糧餵飼反芻動物，其每公斤乾物質的飼料成本約可以下降 21.1%，顯示若以半乾青貯完全取代乾草，約可使酪農戶的飼料成本降低五分之一。

綜合上述結果與泌乳羊生產之表現，半乾青貯飼糧能夠在維持泌乳羊生產表現的情況下，使酪農戶整體的飼料成本降低 21.1%。

表 27. 添加物使用成本與各蜀料之價格

Table 27. Costs of using additives and the prices of forage (NT\$/kg DM)


	Haylage		Hay	
	Pangolagrass ¹	Alfalfa ²	Pangolagrass	Alfalfa
Ammonium propionate	0.08	0.08	-	-
Lactic acid bacteria	0.68	0.68	-	-
Molasses	-	0.36	-	-
Total additives	0.76	1.12	-	-
Manufacture cost	0.17	0.17	-	-
Price	6.73	7.09	5.8	15.55

¹per kilogram fresh grass needs 10⁹ cfu/g lactic acid bacteria and 6.3 g ammonium propionate.

²per kilogram fresh grass needs 10⁹ cfu/g lactic acid bacteria, 6.3 g ammonium propionate and 30 g molasses.

表 28. TMR 價格之計算

Table 28. Prices of TMR (NT\$/kg DM)



Item	Diet	
	Haylage	Hay
Ingredient (NT\$/kg DM)		
Alfalfa haylage ¹	1.77	—
Pangolagrass haylage ²	1.68	—
Alfalfa hay	—	3.89
Pangolagrass hay	—	1.45
Corn, ground	2.37	1.81
Soybean meal	2.06	3.04
Magnesium oxide	0.006	0.006
Calcium phosphate, dibasic	0.03	0.03
Salt	0.004	0.004
Mineral premix ³	0.003	0.003
Vitamin premix ⁴	0.01	0.01
Mycofix [®] Plus	0.15	—
Total	8.083	10.243

¹per kilogram fresh grass needs 10⁹ cfu/g lactic acid bacteria, 6.3 g ammonium propionate and 30 g molasses.

²per kilogram fresh grass needs 10⁹ cfu/g lactic acid bacteria and 6.3 g ammonium propionate.

³Mineral premix supplied (/kg of diet): MnSO₄·H₂O, 240 mg; CuSO₄·5H₂O, 60 mg; CoCO₃, 0.40 mg; Na₂SeO₃, 0.40 mg; ZnO, 140 mg.

⁴Vitamin premix supplied (/kg of diet): 8300 IU of Vitamin A; 3340 IU of Vitamin D; 71 IU of Vitamin E.



6. 黴菌毒素殘留估測

由於在本實驗當中並沒有直接去檢測生乳中黴菌毒素的殘留量，因此在這部分參考 Alexandros and Jouany (2002)中各種黴菌毒素可能會轉移至生乳中的比率 (DOM1: 0.05%; ZEN: 0.48%; α -zearalenol: 0.51%; β -zearalenol: 0.50%)，並依照本試驗飼糧配方當中實際黴菌毒素的含量 (表 12)，去計算最終可能殘留於生乳中的黴菌毒素。結果顯示 (表 29)，嘔吐毒素的殘留量約為 0.06 ppb，而玉米烯酮毒素與其代謝物的殘留量約為 1.7 ppb，如果再計算上黴菌毒素吸附劑的吸附效率，玉米烯酮毒素與其代謝物的殘留量均不到 1 ppb。

從估算出來的結果當中可以得知，以本試驗所調製出來的半乾青貯飼料給反芻動物，即便在佔整體飼糧 50%的情況之下，也不需要去擔心黴菌毒素殘留於生乳當中的問題。

表 29. 生乳中可能殘留之黴菌毒素濃度預估

Table 29. Mycotoxins in raw milk (Prediction)

	Concentration in raw milk (ppb)	
	non ¹	with Mycofix [®] Plus ²
Aflatoxin M1	-	-
Deepoxy-deoxynivalenol	0.06	0.05
Ochratoxin	-	-
Ochratoxin- α	-	-
Zearalenone	1.68	0.74
α -zearalenol	1.78	0.78
β -zearalenol	1.75	0.77

¹Without mycotoxin adsorbents.

²The adsorption rates of adsorbent is calculated by Avantaggiato et al. (2005).




(二) 體外乾物質消化率與原位消化

苜蓿草與盤固草在瘤胃中解的情形均符合 Ørskov and McDonald (1979)所提出之瘤胃動力模型 $p = a + b(1 - e^{-kdt})$ ，其 R^2 均大於 0.99 (圖 19)。在上述之方程式中 p 為每個時間點飼料被降解的比例； t 為其所對應到的時間； a 為瘤胃中快速可分解的部分； b 為瘤胃中緩慢可以分解的部分而 kd 則為 b 在瘤胃中被降解的速率；瘤胃中無法消化的部分則依照 $100 - a - b$ 進行計算，迴歸分析後在最小剩餘平方和情況下所求得之數值如表 30 與 31。

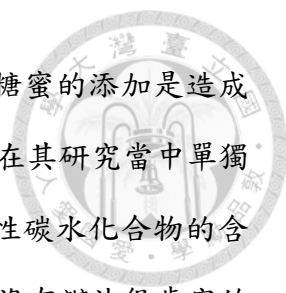
表 30 為盤固草半乾青貯與乾草在體外乾物質消化率與原位消化各項參數之比較。然而本試驗所使用之盤固草半乾青貯與乾草其來源不同，且從表 10 當中可以得知兩者在粗蛋白質上有明顯差異 (Haylage: 8.11%; Hay: 4.62 % DM)，若與 Assoumaya et al. (2007)之研究進行比對，可以推測兩者之生長期至少差了 28 天以上，因此並不適合直接比較兩者之消化性狀；另外從 Poppi et al. (1981)的研究當中也可得知，成熟度不同之盤固草在瘤胃內停留的時間也不同，因此其過瘤胃速率也不宜用同數值帶入。雖然兩者並不適合直接比較，但 IVDMD 之結果仍可作為動物試驗之一項參考依據；本試驗所使用之盤固草半乾青貯與乾草在 IVDMD 之結果上並沒有顯著差異，顯示動物試驗當中半乾青貯飼糧與乾草飼糧在乾物質消化率上的差異，較不可能是盤固草選用上之差異所造成的。

表 31 為苜蓿半乾青貯與乾草在體外乾物質消化率與原位消化各項參數之比較。從表 10 當中可以得知，本試驗所使用之苜蓿半乾青貯與乾草在化學組成上差異極大，顯示兩者並非為同一個時期所收割；而從 Blade et al. (1993)、Griffin et al. (1994)與 Nelson and Satter (1990)的研究當中可以得知，苜蓿草隨著成熟度的增加 (纖維含量上升、粗蛋白質下降)，其在瘤胃中停留的時間會逐漸上升，有效可降解之乾物質 (Effective DM degradability) 則呈現逐漸下降的趨勢，因此本試驗所使用之苜蓿半乾青貯與乾草較不宜直接比較，而後續將著重針對苜蓿半乾青貯在是否有使用添加物的狀況下進行探討。



從表 31 可以發現，苜蓿半乾青貯在有使用添加物的情況之下，其 IVDMD 與瘤胃中有效可降解之乾物質均較沒使用添加物的苜蓿半乾青貯來的高，其中有效可降解之乾物質不論是用低 (2%/h)、中 (5%/h) 或是高 (8%/h) 的過瘤胃速率去計算，其結果均相同；而從原位消化的各項參數中可以得知，兩者只在快速可分解的部分上有顯著差異 (Rapidly degradable fraction, a)，顯示在添加物的處理之下，苜蓿半乾青貯在進入瘤胃後能夠較快的溶出水溶性的物質，供瘤胃微生物使用；若從兩者的化學組成上來看，苜蓿半乾青貯在有使用添加物的情況之下，具有較低的中洗纖維含量 (表 18)，而在 Kamalak et al. (2005) 的研究當中也指出，隨著中洗纖維含量的下降，瘤胃中有效可降解之乾物質也隨之上升 ($R^2 = 0.987$)；將本研究半乾青貯與乾草之中洗纖維含量與有瘤胃中有效可降解之乾物質進行線性迴歸分析後，其 R^2 為 0.9897 (圖 20)，顯示在添加物的處理之下，苜蓿半乾青貯的瘤胃中有效可降解之乾物質比例上升，很可能與中洗纖維含量的下降有關。

接下來從添加物的角度探討此現象。在 Risk et al. (2005) 的研究當中發現，添加 *L. plantarum* 於苜蓿半乾青貯當中，並不會影響到苜蓿半乾青貯在 45 天開封後的瘤胃中有效可降解乾物質，而在 Zhang et al. (2009) 的研究當中也發現，不論是單獨添加 *L. plantarum*、*L. buchneri* 或同時添加 *L. plantarum* 與 *L. buchneri* 於苜蓿青貯當中，均沒有提升苜蓿青貯中瘤胃有效可降解乾物質的效果；在玉米、高粱與大麥青貯的試驗當中也發現類似的結果，不論是單獨添加 *L. plantarum*、*L. buchneri*、同時添加 *L. plantarum* 與 *L. buchneri* 或是與其他乳酸菌搭配使用，均無法有效改變青貯中瘤胃有效可降解乾物質 (Filya, 2003; Hristov and McAllister, 2002; Kang et al, 2009)；然而在 Hashemzadeh-Cigari et al. (2011) 的研究當中發現，添加商用菌劑 Ecosyl (*L. plantarum* MTD-1) 於苜蓿青貯中，或是添加商用菌劑 Lalsil (*L. plantarum* MA-18, *Propionibacterium acidipropionici*) 於苜蓿半乾青貯中，均能提升其瘤胃中有效可降解乾物質；顯示乳酸菌的添加對於苜蓿半乾青貯消化性狀的影響並沒有一致性。在 Abbasi et al. (2018) 的研究當中發現，單獨添加 *L. plantarum* 並不會改變青貯的消化性狀，而單獨添加 5% 糖蜜或是糖蜜與 *L. plantarum* 同時使用，均能夠



提升青貯的瘤胃中快速可分解部分與有效可降解乾物質，顯示糖蜜的添加是造成青貯消化性狀改變的主要因素；此結果與本研究非常相似，然而在其研究當中單獨添加糖蜜或是糖蜜與乳酸菌搭配使用的組別，在發酵後其水溶性碳水化合物的含量仍高於對照組，此部分與本研究有明顯的不同（表 18），因此沒有辦法很肯定的說糖蜜的添加就是造成本研究首蓆半乾青貯，在瘤胃中快速可分解部分與有效可降解乾物質上升的主因。

綜合上述研究與推論，在綜合乳酸菌、糖蜜與丙酸銨的處理之下，能夠提升首蓆半乾青貯在瘤胃中的消化性狀，而造成此結果的原因之一，可能與中洗纖維含量的下降有關；然而目前沒有辦法確定是本研究中所使用的那一種添加物造成此結果，抑或是在三種添加物共同使用之下才有此效果，此部分仍有待後續研究進行探討。

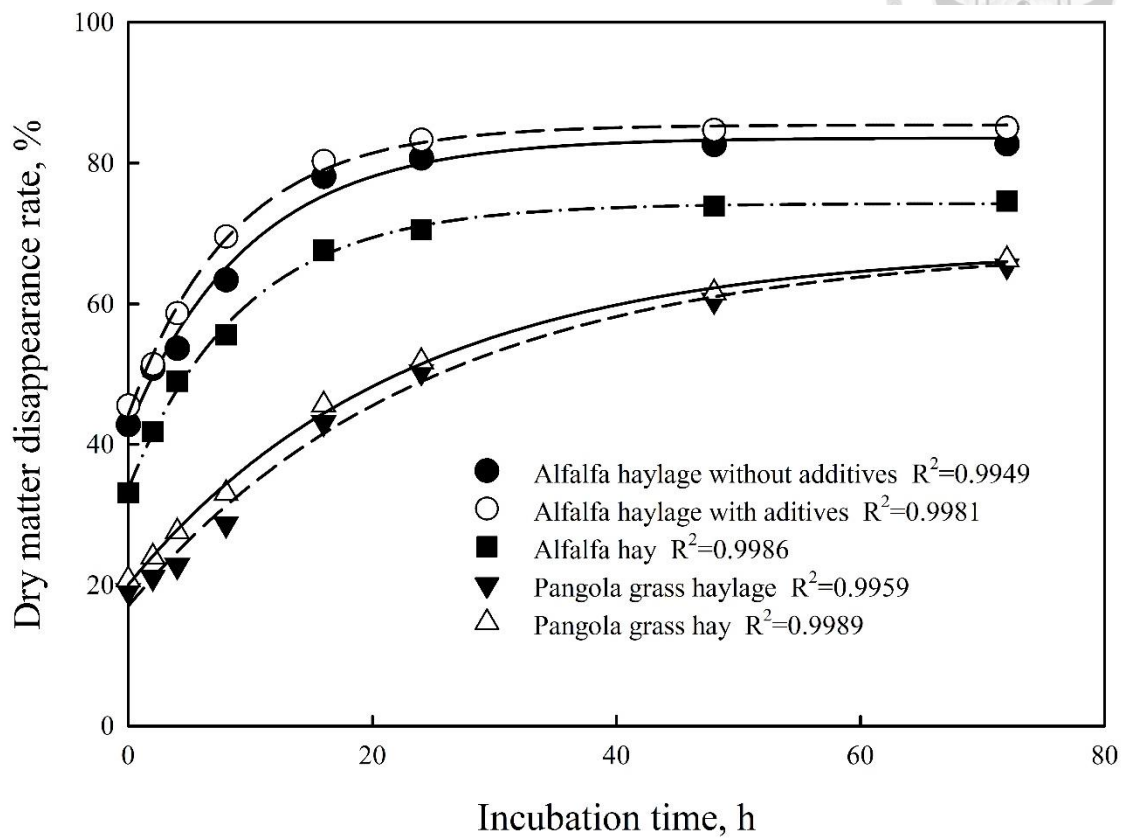


圖 19. 半乾青貯與乾草乾物質在瘤胃裡消失的情形。

Figure 19. *In situ* dry matter disappearance rate of haylages and hays. ○, Alfalfa haylage treated with lactic acid bacteria (*P. acidilactici* + *L. buchneri* + *L. plantarum*, 10^6 cfu/g in fresh grass), 3% molasses and 3% ammonium propionate. ▼, Pangolagrass haylage treated with lactic acid bacteria (*P. acidilactici* + *L. buchneri* + *L. plantarum*, 10^6 cfu/g in fresh grass) and 3% ammonium propionate. Smooth lines are calculated based on the equation proposed by Ørskov and McDonald (1979). Each point represents mean of 3 samples.



表 30. 盤固草半乾青貯與乾草之體外乾物質消化率與瘤胃乾物質分解性狀

Table 30. *In vitro* dry matter digestibility (IVDMD) and *in situ* rumen dry matter degradation kinetics of pangolagrass haylage and hay

	Haylage ¹	Hay	SEM	P value
	%			
IVDMD	52.44	52.21	0.60	-
Rapidly degradable fraction (a)	17.06 ^b	19.98 ^a	0.28	**
Slowly degradable fraction (b)	51.30	48.05	1.76	-
Rate of degradation (kd, %/h)	4.06	4.55	0.42	-
Indigestible fraction ²	31.64	31.97	1.49	-
Effective degradability-lp ³	51.42 ^b	53.11 ^a	0.40	*
Effective degradability-mp ³	40.04 ^b	42.63 ^a	0.57	*
Effective degradability-hp ³	34.33 ^b	37.21 ^a	0.76	*

¹Treated with lactic acid bacteria (*P. acidilactici* + *L. buchneri* + *L. plantarum*, 10⁶ cfu/g in fresh grass) and 3% ammonium propionate.

²Indigestible fraction = 100 – a – b.

³Effective degradability = a + (b × kd) / (kd + kp). kp is feed particle passage rate out of the rumen fixed at 2%/h for lp: low passage rate, 5%/h for mp: medium passage rate, and 8% for hp: high passage rate.

^{ab}Different superscripts indicate that values differ in the same row.

*Represents P<0.05, **Represents P<0.01.



表 31. 苜蓿半乾青貯與乾草之體外乾物質消化率與瘤胃乾物質分解性狀

Table 31. *In vitro* dry matter digestibility (IVDMD) and *in situ* rumen dry matter degradation kinetics of alfalfa haylage and hay

	Haylage		Hay	SEM	P value
	non	additives ¹			
	%				
IVDMD	80.54 ^b	83.66 ^a	71.62 ^c	0.54	**
Rapidly degradable fraction (a)	42.12 ^b	44.19 ^a	33.67 ^c	0.52	*
Slowly degradable fraction (b)	41.48	41.26	40.59	0.66	-
Rate of degradation (kd, %/h)	10.13	11.75	10.79	0.58	-
Indigestible fraction ²	16.40 ^b	14.55 ^b	25.74 ^a	0.71	**
Effective degradability-lp ³	76.75 ^b	79.42 ^a	67.87 ^c	0.57	*
Effective degradability-mp ³	69.87 ^b	73.09 ^a	61.34 ^c	0.57	**
Effective degradability-hp ³	65.27 ^b	68.70 ^a	56.91 ^c	0.60	**

¹Treated with lactic acid bacteria (*P. acidilactici* + *L. buchneri* + *L. plantarum*, 10⁶ cfu/g in fresh grass), 3% molasses and outer 3% ammonium propionate.

²Indigestible fraction = 100 – a – b.

³Effective degradability = a + (b × kd) / (kd + kp). kp is feed particle passage rate out of the rumen fixed at 2%/h for lp: low passage rate, 5%/h for mp: medium passage rate, and 8% for hp: high passage rate.

^{abc}Different superscripts indicate that values differ in the same row.

*Represents P<0.05, **Represents P<0.01.

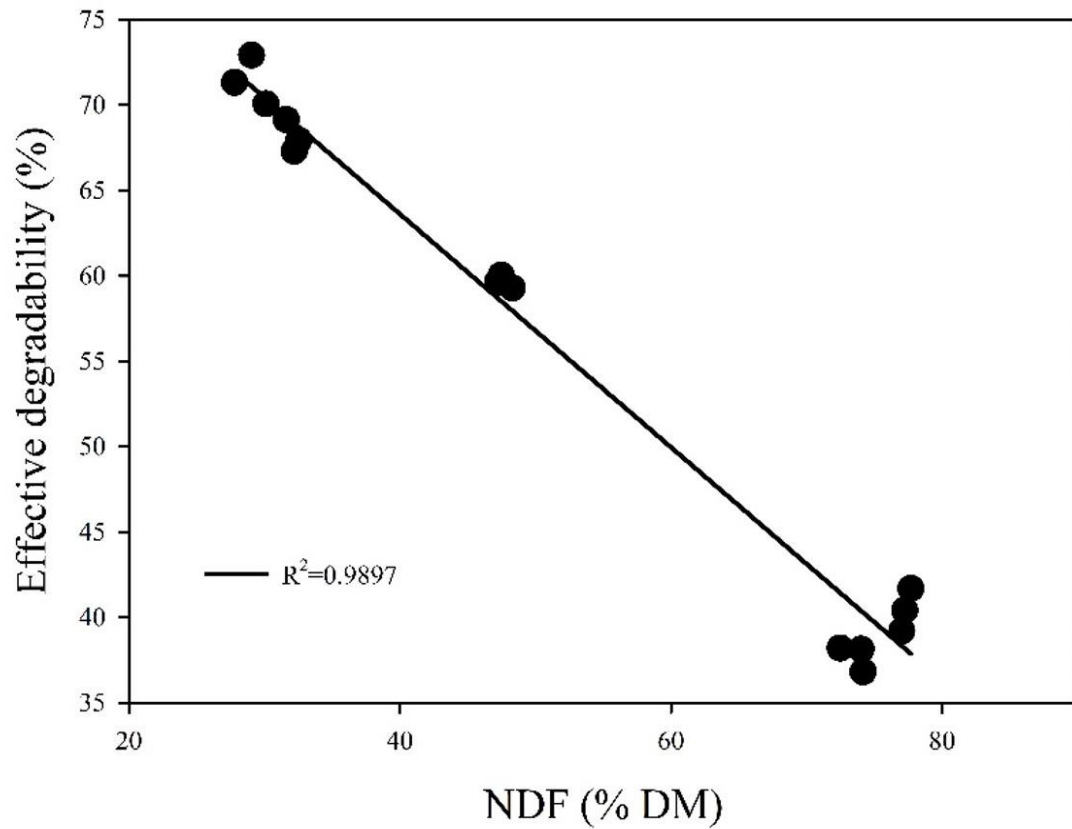


圖 20. 中洗纖維含量與瘤胃中有效可消化乾物質之關係。

Figure 20. Relationship of neutral detergent fiber and effective DM degradability in rumen. Data comes from alfalfa haylage, alfalfa hay, pangolagrass haylage and pangolagrass hay of *in situ* experiment.

肆、結論



盤固草半乾青貯在內部綜合乳酸菌與外部 3%丙酸銨的處理之下，能夠穩定的存放 42 週；而 3%丙酸銨添加於苜蓿半乾青貯草捆的表層，雖然其抑制黴菌的效果不如盤固草半乾青貯，但仍可使苜蓿半乾青貯表層霉斑的數量下降 77%；在發酵品質上，綜合乳酸菌搭配糖蜜添加於苜蓿半乾青貯當中，能夠提升其乳酸含量與降低 pH 值，並且具有更好的消化性狀，然而對於 pH 值雖然有降低的效果 (5.54→5.34)，但下降的幅度則不若盤固草半乾青貯來的大。

在實際的飼養管理上，本試驗所調製出之半乾青貯，能夠促進泌乳羊瘤胃中蛋白質利用的效率；並且相較於以乾草飼養，餵飼半乾青貯能夠在維持相等乾物質採食與泌乳量的條件之下，使酪農戶的飼料成本降低五分之一。

伍、參考文獻

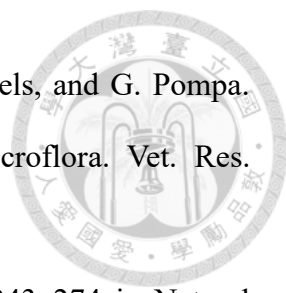


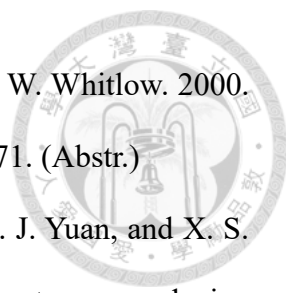
- 卜瑞雄。2007。盤固草之營養價值與利用方式。飼料營養雜誌 2：94-105。
- 王紓愨、陳嘉昇、成游貴。2002。熱帶牧草水溶性碳水化合物含量的日變化研究。畜產研究 35：69-75。
- 王紓愨、游翠鳳、陳嘉昇。2018。接種菌株對苜蓿半乾青貯適口性的影響。畜產研究 51：286-292。
- 行政院農業委員會。2014。2013 年行政院農業委員會年報。行政院農業委員會。臺北市。
- 行政院農業委員會。2019。農業統計年報(107 年)。行政院農業委員會。臺北市。
- 沈明來。2014。試驗設計學。第五版。九州圖書文物有限公司。臺北市。
- 李春芳、蕭宗法。2007。反芻動物飼料試管乾物質消化率 (IVDMD) 方法之修改。畜產研究 40：59-65。
- 范揚廣、左克華。2012。飼料黴菌毒素防治之基礎學理。飼料黴菌毒素防治手冊。行政院農業委員會。臺北市。
- 陳筱薇、黃孝義、張友義、白崇智、史歲元、李婕伶、石芳其、林佑諭、劉智宏、丘昀融、陳莘惠、游翠鳳、劉信宏、王紓愨、陳嘉昇、王翰聰、陳靜宜、徐濟泰。2019。添加乳酸菌複方與丙酸銨抑制盤固草半乾青貯草捆製作過程發霉之效果。中畜會誌 48：1-15。
- 陳嘉昇、王紓愨、游翠鳳、李璟妤。2018。牧草適口性探討：II. 草種、乾燥度與調製法對山羊適口性的影響。中畜會誌 47：197-207。
- 陳嘉昇、王紓愨、游翠鳳。2019。盤固草半乾青貯開封後數日對山羊適口性的影響。中畜會誌 48：47-57。
- 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。

- 
- 許福星。2008。芻料作物。畜牧要覽—草食家畜篇。中國畜牧學會。臺北市。
- 楊倩如。2017。探討添加 *Lactobacillus formosensis* S215T 對半乾盤固草與尼羅草青貯料品質與泌乳羊泌乳性能之影響。國立中興大學動物科學系碩士論文。
- 劉智宏。2018。評估添加丙酸銨或接種乳酸菌對國產芻料半乾青貯草製備之成效。國立臺灣大學動物科學技術學系碩士論文。
- 蕭素碧、林正斌、許進德。2003。臺灣引進豆科牧草產量與品質之評估。畜產研究 36；45-52。
- 盧啟信。2013。國內酪農產業降低生產成本的新契機~活化休耕地轉作牧草及青割玉米。臺南區農業專訊第 83 期。行政院農業委員會臺南區農改場。臺南市。
- Abbasi, M., Y. Rouzbehan, J. Rezaei, and S. E. Jacobsen. 2018. The effect of lactic acid bacteria inoculation, molasses, or wilting on fermentation quality and nutritive value of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) silage. *J. Anim. Sci.* 96:3983-3992.
- Alexandros, Y., and J. P. Jouany. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. *Anim. Res.* 51:81-99.
- Alonso, V. A., C. M. Pereyra, L. A. M. Keller, A. M. Dalcerro, C. A. R. Rosa, S. M. Chiacchiera, and L. R. Cavaglieri. 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J. Appl. Microbiol.* 115:637-643.
- A.O.A.C. 1984. Official methods of analysis, 14th edition. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.
- Assoumaya, C., M. Boval, D. Sauvant, A. Xandé, C. Poncet, and H. Archimède. 2007. Intake and digestive processes in the rumen of rams fed with *Digitaria decumbens* harvested at four stages of grass regrowth age. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20:925-932.
- Auerbach, H., E. Oldenburg, and F. Weissbach. 1998. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silages. *J. Sci. Food Agric.* 76:565-572.



- Avantaggiato, G., M. Solfrizzo, and A. Visconti. 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Addit. Contam.* 22:379-388.
- Bennett, J. W., and M. Klich. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:497-516.
- Bezuidenhout, S. C., W. C. A. Gelderblom, C. P. Gorst-Allman, R. M. Horak, W. F. O. Marasas, G. Spiteller, and R. Vlegaar. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 11:743-745.
- Binder, E. M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 133:149-166.
- Biomin. 2016. Mycotoxin survey 2016 third quarter (July to Sept, 2016). Retrieved from <https://nutricionanimal.info/wp-content/uploads/2016/11/Mycotoxin-Survey-Presentation-Q3-2016-1.pdf> (accessed on 18 July 2020).
- Blade, A. T., J. H. Vandersall, R. A. Erdman, J. B. Reeves III, and B. P. Glenn. 1993. Effects of stage of maturity of alfalfa and orchardgrass on *in situ* dry matter and crude protein degradability and amino acid composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 44:29-43.
- Bolleter, W. T., C. J. Bushman, and P. W. Tidwell. 1961. Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. *Anal. Chem.* 33:592-594.
- Bolsen, K. K., G. Ashbell, and Z. G. Weinberg. 1996. Silage fermentation and silage additives - Review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 9:483-494.
- 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.
- Buchanan-Smith, J. G. 1990. An investigation into palatability as a factor responsible for reduced intake of silage by sheep. *Anim. Prod.* 50:253-260.

- 
- Caloni, F., M. Spotti, H. Auerbach, H. Op den Camp, J. F. Gremmels, and G. Pompa. 2000. *In vitro* metabolism of fumonisin B1 by ruminal microflora. *Vet. Res. Commun.* 24:379-387.
- Cheeke, P. R. 1998. Mycotoxins associated with forages. Pages 243–274 in *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*. P. R. Cheeke, ed. Interstate Publishers Inc., Danville, IL.
- Cheli, F., A. Campagnoli, and V. Dell’Orto. 2013. Fungal populations and mycotoxins in silage: From occurrence to analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 183:1-16.
- Clancy, M., P. J. Wangsness, and B. R. Baumgardt. 1977. Effect of conservation method on digestibility, nitrogen balance, and intake of alfalfa. *J. Dairy Sci.* 66:572-579.
- Collins, M. 1991. Hay curing and water soaking effects on composition and digestion of alfalfa leaf and stem components. *Crop Sci.* 31:219-223.
- Cooker, B. A., C. J. Sniffen, W. H. Hoover, and L. L. Johnson. 1978. Solvents for soluble nitrogen measurements in feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 61:437-447.
- Côté, L. M., A. M. Dahlem, T. Yoshizawa, S. P. Swanson, and B. Buck. 1986. Excretion of deoxynivalenol and its metabolite in milk, urine, and feces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69:2416-2423.
- De Vries, R. P., B. Michelsen, C. H. Poulsen, P. A. Kroon, R. H. H. Van Den Heuvel, C. B. Faulds, G. Williamson, J. P. T. W. Van Den Hombergh, and J. Visser. 1997. The *faeA* genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* encode ferulic acid esterases involved in degradation of complex cell wall polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4638-4644.
- Diaz, D. E., W. M. Hagler Jr., J. T. Blackwelder, J. A. Eve, B. A. Hopkins, K. L. Anderson, F. T. Jones, and L. W. Whitlow. 2004. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia* 157:233-241.

- 
- Diaz, D. E., B. A. Hopkins, L. M. Leonard, W. M. Hagler Jr., and L. W. Whitlow. 2000. Effect of fumonisin on lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83:1171. (Abstr.)
- Ding, Z. T., D. M. Xu, J. Bai, F. H. Li, A. T. Adesogan, P. Zhang, X. J. Yuan, and X. S. Guo. 2019. Characterization and identification of ferulic acid esterase-producing *Lactobacillus* species isolated from *Elymus nutans* silage and their application in ensiled alfalfa. *J. Appl. Microbiol.* 127:985-995.
- Dreywood, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Int. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18:499-499.
- Driehuis, F., M. C. Spanjer, J. M. Scholten, and M. C. Te Giffel, 2008. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. *Food Addit. Contam. A.* 1:41-50.
- Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink, and P. G. Van Wikselaar. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass Forage Sci.* 56:330-343.
- European Commission. 2006. Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off. J. Eur. Union* L229:7-9.
- European Commission. 2011. Commission regulation (EU) No 574/2011 of 16 June 2011 amending Annex I to Directive 2002/832/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine, *Ambrosia* spp. and carry-over of certain coccidiostats and histomonostats and consolidating Annexes I and II thereto. *Off. Eur. Union* L157:7-24.
- European Commission. 2016. Commission recommendation of 29 July 2016 amending Recommendation 2006/576/EC as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in pet food. *Off. Eur. Union* L208:58-60.

FDA (Food and Drug Administration). 2001. Guidance for industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds. Retrieved from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-fumonisin-levels-human-foods-and-animal-feeds> (accessed on 18 July 2020).

FDA (Food and Drug Administration). 2010. Guidance for industry and FDA: Advisory levels for deoxynivalenol (DON) in finished wheat products for human consumption and grains and grain by-product used for animal feed. Retrieved from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-and-fda-advisory-levels-deoxynivalenol-don-finished-wheat-products-human> (accessed on 18 July 2020).

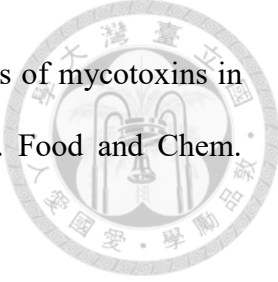
FDA (Food and Drug Administration). 2019. CPG Sec. 683.100 action levels for aflatoxins in animal feeds. Retrieved from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cpg-sec-683100-action-levels-aflatoxins-animal-feeds> (accessed on 18 July 2020).

Fettweis, U., and J. Kühn. 2013. ADF_{om} and crude fibre analytics: Comparison of the grass filter crucible technique with automated fibrebag technology (C. Gerhardt). VDLUFA Series 69:823-827.

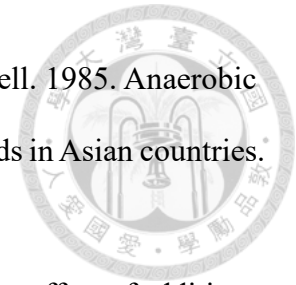
Filya, I. 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. J. Dairy Sci. 86:3575-3581.

Filya, I., and E. Sucu. 2010. The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. Grass Forage Sci. 65:446-455.

Galtier, P., and M. Alvinerie. 1976. *In vitro* transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. Ann. Rech. Vét. 7:91-98.

- 
- García-Moraleja, A., G. Font, J. Mañes, and E. Ferrer. 2015. Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults. *Food and Chem. Toxicol.* 86: 225-233.
- Gibson, T. 1965. *Clostridia* in silage. *J. Appl. Bact.* 28:56-62.
- González-Pereyra, M. L., V. A. Alonso, R. Sager, M. B. Morlaco, C. E. Magnoli, A. L. Astoreca, C. A. R. Rosa, S. M. Chiacchiera, A. M. Dalcerro, and L. R. Cavaglieri. 2008. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 104:1034-1041.
- Gordon, C. H., J. C. Derbyshire, H. G. Wiseman, E. A. Kane, and C. G. Melin. 1961. Preservation and feeding value of alfalfa stored as hay, haylage, and direct-cut silage. *J. Dairy Sci.* 44:1299-1311.
- Greenhill, W. L. 1964. The buffering capacity of pasture plants with special reference to ensilage. *Aust. J. Agric. Res.* 15:511-519.
- Griffin, T. S., K. A. Cassida, O. B. Hesterman, and S. R. Rust. 1994. Alfalfa maturity and cultivar effects on chemical and *in situ* estimates of protein degradability. *Crop. Sci.* 34:1654-1661.
- Gunner, H. B., and M. Alexander. 1964. Anaerobic growth of *Fusarium oxysporum*. *J. Bacteriol.* 87:1309-1316.
- Gurung, N. K., D. L. Rankins, and R. A. Shelby. 1999. *In vitro* ruminal disappearance of fumonisin B1 and its effects on *in vitro* dry matter disappearance. *Vet. Hum. Toxicol.* 41:196-199.
- Han, K. J., M. Collins, E. S. Vanzant, and C. T. Dougherty. 2004. Bale density and moisture effects on alfalfa round bale silage. *Crop Sci.* 44:914-919.
- Hashemzadeh-Cigari, F., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, and A. Taghizadeh. 2011. The effects of wilting, molasses and inoculants on the fermentation quality and nutritive value of lucerne silage. *S. Afr. J. Anim.* 41:377-388.

Hesseltine, C. W., C. L. Featherston, G. L. Lombard, and V. R. Dowell. 1985. Anaerobic growth of molds isolated from fermentation starters used for foods in Asian countries. *Mycologia*. 77:390-400.



Hetta, M., J. W. Cone, A. M. Gustavsson, and K. Martinsson. 2003. The effect of additives in silages of pure timothy and timothy mixed with red clover on chemical composition and *in vitro* rumen fermentation characteristics. *Grass Forage Sci*. 58:249-257.

Higgs, R. J., A. J. Sheahan, K. Mandok, M. E. Van Amburgh, and J. R. Roche. 2013. The effect of starch-, fiber-, or sugar-based supplements on nitrogen utilization in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci*. 96:3857-3866.

Honig, H., and M. K. Woolford. 1980. Changes in silage on exposure to air. Page 78-87. In: C. Thomas (ed.) *Forage Conservation in the 80s*. Occasional Symposium No. 11. Br. Grassland Soc., Hurley, Berkshire, UK.

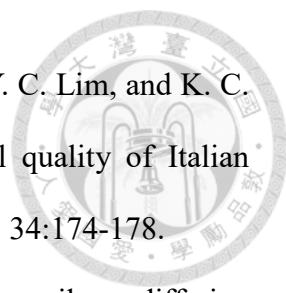
Hristov, A. N., and T. A. McAllister. 2002. Effect of inoculants on whole-crop barley silage fermentation and dry matter disappearance *in situ*. *J. Anim. Sci*. 80:510-516.

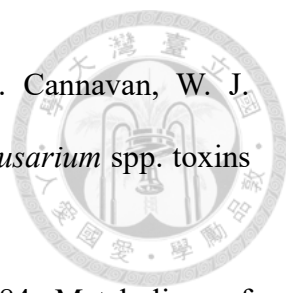
Huisden, C. M., A. T. Adesogan, S. C. Kim, and T. Ososanya. 2009. Effect of applying molasses or inoculants containing homofermentative or heterofermentative bacteria at two rates on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy. Sci*. 92:690-697.

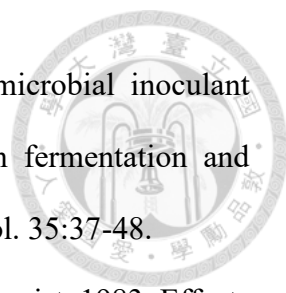
Hunter, A. C. 1984. Microflora and somatic cell content of goat milk. *Vet. Rec*. 114:318-320.

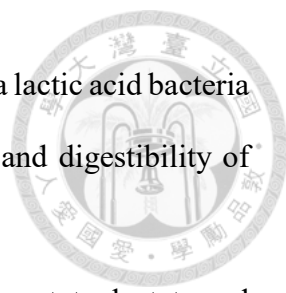
Hussain, Q., Ø. Havrevoll, and L. O. Eik. 1996. Effect of type of roughage on feed intake, milk yield and body condition of pregnant goats. *Small Rumin. Res*. 22:131-139.

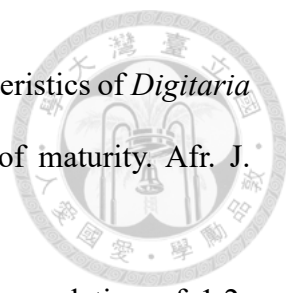
Hussein, H. S., and J. M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxin on humans and animals. *Toxicology* 167:101-134.

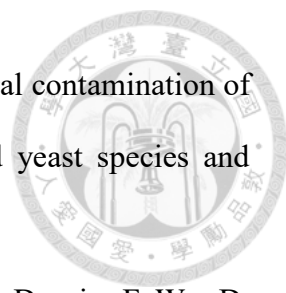
- 
- Ilavenil, S., M. V. Arasu, M. Vijayakumar, M. W. Jung, H. S. Park, Y. C. Lim, and K. C. Choi. 2014. *Lactobacillus plantarum* improves the nutritional quality of Italian ryegrass with alfalfa mediated silage. *J. Kor. Grassl. Forage Sci.* 34:174-178.
- Jackson, N., and T. J. Forbes. 1970. The voluntary intake by cattle of four silages differing in dry matter content. *Anim. Prod.* 12:591-599.
- Johnson, H. E., R. J. Merry, D. R. Davies, D. B. Kell, M. K. Theodorou, and G. W. Griffith. 2005. Vacuum packing: a model system for laboratory-scale silage fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 98:106-113.
- Jouany, J. P. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137:342-362.
- Kaiser, A. G., J. W. Piltz, H. M. Burns, and N. W. Griffiths. 2004. *TopFodder* successful silage, 2nd edition. Dairy Australia and New South Wales Department of Primary Industries.
- Kamalak, A., O. Canbolat, Y. Gurbuz, A. Erol, and O. Ozay. 2005. Effect of maturity stage on chemical composition, *in vitro* and *in situ* dry matter degradation of tumbleweed hay (*Gundelia tournefortii* L.). *Small Rumin. Res.* 58:149-156.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 49:209-224.
- Kang, T. W., A. T. Adesogan, S. C. Kim, and S. S. Lee. 2009. Effects of an esterase-producing inoculant on fermentation, aerobic stability, and neutral detergent fiber digestibility of corn silage. *J. Dairy Sci.* 92:732-738.
- Kawas, J. R., J. Lopes, D. L. Danelon, and C. D. Lu. 1991. Influence of forage-to-concentrate ratios on intake, digestibility, chewing and milk production of dairy goats. *Small Rumin. Res.* 4:11-18.

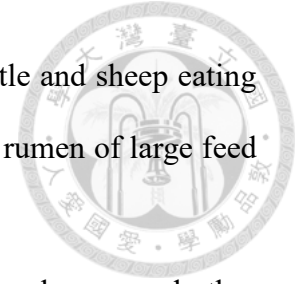
- 
- Kennedy, D. G., S. A. Hewitt, J. D. McEvoy, J. W. Currie, A. Cannavan, W. J. Blanchflower, and C. T. Elliot. 1998. Zeranol is formed from *Fusarium* spp. toxins in cattle *in vivo*. *Food Addit. Contam.* 15:393-400.
- Kiessling, K. H., H. Petterson, K. Sandholm, and M. Olsen. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1070-1073.
- Kleinschmit, D. H., L. Kung. 2006. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage. *J. Dairy Sci.* 89:3999-4004.
- Kleinschmit, D. H., R. J. Schmidt, and L. Kung. 2005. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.* 88:2130-2139.
- Kleter, G., W. L. Lammers, and E. A. Vos. 1984. The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *Clostridium tyrobutyricum* in whey and cheese. 2. Experiments in cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 38:31-41.
- Kung, L. 2001. Silage fermentation and additives. In: Jacques K A, Lyons T P, eds., *Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium*. Nottingham University Press, Nottingham, UK. Pages 145–159.
- Kung, L., C. C. Taylor, M. P. Lynch, and J. M. Neylon. 2003. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:336-343.
- Kung, L., E. C. Stough, E. E. McDonell, R. J. Schmidt, M. W. Hofherr, L. J. Reich, and C. M. Klingerman. 2010. The effect of wide swathing on wilting times and nutritive value of alfalfa haylage. *J. Dairy Sci.* 93:1770-1773.

- 
- Kung, L., R. S. Tung, and K. Maciorowski. 1991. Effect of a microbial inoculant (Ecosyl™) and/or a glycopeptide antibiotic (vancomycin) on fermentation and aerobic stability of wilted alfalfa silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 35:37-48.
- Lahr, D. R., D. E. Otterby, D. G. Johnson, J. G. Linn, and R. G. Lundquist. 1983. Effects of moisture content of complete diets on feed intake and milk production by cows. *J. Dairy Sci.* 66:1891-1900.
- Lambert, R. J., and M. Stratford. 1999. Weak-acid preservatives: modelling inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.* 86:157-164.
- Li, M., X. Zi, H. Zhou, G. Hou, and Y. Cai. 2014. Effect of sucrose, glucose, molasses and cellulose on fermentation quality and *in vitro* gas production of king grass silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197:206-212.
- Li, Y., Z. Wang, R. C. Beier, J. Shen, D. D. Smet, S. D. Saeger, and S. Zhang. 2011. T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: Review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *J. Agric. Food Chem.* 59:3441-3453.
- Li, Y., and N. Nishino. 2011. Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamosus* or *Lactobacillus buchneri*. *Lett. Appl. Microbiol.* 52:314-321.
- Man, N. V., and H. Wiktorsson. 2002. Effect of molasses on nutritional quality of cassava and gliricidia tops silage. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15:1294-1299.
- Marpegan, M. R., C. J. Perfumo, H. M. Godoy, M. Sala de Miguel, E. Diaz, and M. A. Risso. 1988. Feed refusal of pigs caused by *Fusarium* mycotoxins in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed A.* 35:610-616.
- McDonald, P. 1981. *The Biochemistry of Silage*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- McNamara, K., P. O'Kiely, J. Whelan, P. D. Forristal, and J. J. Lenehan. 2002. Simulated bird damage to the plastic stretch-film surrounding baled silage and its effects on conservation characteristics. *Irish J. Agric. Food Res.* 41:29-41.

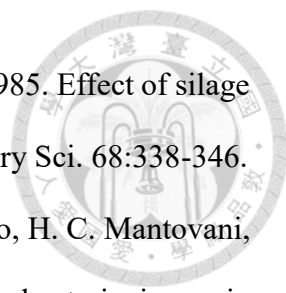
- 
- Meeske, R., H. M. Basson, and C. W. Cruywagen. 1999. The effect of a lactic acid bacteria inoculant with enzymes on the fermentation dynamics, intake and digestibility of *Digitaria eriantha* silage. *Anim. Feed Technol.* 81:237-248.
- Moon, N. J. 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. Appl. Bacteriol.* 55:454-460.
- Moran, J. 2005. *Tropical dairy farming: feeding management for small holder dairy farmers in the humid tropics.* Landlinks Press, 312 pp.
- Morris, D. L. 1948. Quantitative determination of carbohydrate with Dreywood's anthrone reagent. *Sci.* 107:254-255.
- Muck, R. E. 2010. Silage microbiology and its control through additives. *R. Bras. Zootec.* 39:183-191.
- Muck, R. E., E. M. G. Nadeau, T. A. McAllister, F. E. Contreras-Govea, M. C. Santos, and L. Kung. 2018. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.* 101:3980-4000.
- Müller, C. E. 2005. Fermentation patterns of small-bale silage and haylage produced as a feed for horses. *Grass Forage Sci.* 60:109-118.
- Munkvold, G. P., and A. E. Desjardins. 1997. Fumonisin in maize: Can we reduce their occurrence. *Plant Dis.* 81:556-565.
- Naoki, N., and T. Yuji. 2008. Variations in bacterial communities in laboratory-scale and big bale silos assessed by fermentation products, colony counts and denaturing gradient gel electrophoresis profiles. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:283-288.
- Nelson, W. F., and L. D. Satter. 1990. Effect of stage of maturity and method of preservation of alfalfa on production by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73:1800-1811.

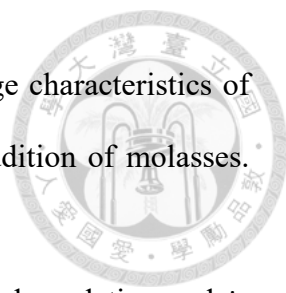
- 
- Niekerk, M. V., A. Hassen, and F. Bechaz. 2008. Fermentation characteristics of *Digitaria eriantha* subsp. *eriantha* silage harvested at different stages of maturity. *Afr. J. Range. Forage Sci.* 25:141-145.
- Nishino, N., M. Yoshida, H. Shiota, and E. Sakaguchi. 2003. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.* 94:800-807.
- Nocek, J. E. 1988. *In situ* and other methods estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. *J. Dairy Sci.* 71:2051-2069.
- NRC. 1989. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academy Press, Washington, D.C., USA.
- NRC. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. National Academy Press, Washington, D.C., USA.
- Nsereko, V. L., B. K. Smiley, W. M. Rutherford, A. Spielbauer, K. J. Forrester, G. H. Hettinger, E. K. Harman, and B. R. Harman. 2008. Influence of inoculating forage with lactic acid bacterial strains that produce ferulate esterase on ensilage and ruminal degradation of fiber. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:122-135.
- O'Brien, M., K. F. Nielsen, P. O'Kiely, P. D. Forristal, H. T. Fuller, and J. C. Frisvad. 2006. Mycotoxins and other secondary metabolites produced *in vitro* by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J. Agric. Food Chem.* 54:9268-9276.
- O'Brien, M., P. O'Kiely, P. D. Forristal, and H. T. Fuller. 2007. Visible fungal growth on baled grass silage during the winter feeding season in Ireland and silage characteristic associated with the occurrence of fungi. *Anim. Feed Sci. Technol.* 139:234-256.

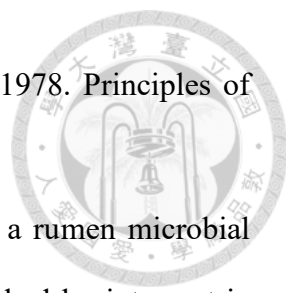
- 
- O'Brien, M., P. O'Kiely, P. D. Forristal, and H. T. Fuller. 2008. Fungal contamination of big-bale grass silage on Irish farms: Predominant mould and yeast species and features of bales and silage. *Grass Forage Sci.* 63:121-137.
- Ogunade, I. M., C. Martinez-Tupia, O. C. M. Queiroz, Y. Jiang, P. Drouin, F. Wu, D. Vyas, and A. T. Adesogan. 2018. Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *J. Dairy Sci.* 101:4034-4059.
- Ohshima, M., L. M. Cao, E. Kimura, Y. Ohshima, and H. Yokoto. 1997. Influence of addition of previously fermented juice to alfalfa ensiled at different moisture contents. *Grassl. Sci.* 43:56-58.
- Orla-Jensen, S. 1919. *The Lactic Acid Bacteria*. Andr. Fred. Høst & Søn. Copenhagen.
- Oude Elferink, S. J. W. H., F. Driehuis, J. C. Gottschal, and S. F. Spoelstra. 1999. Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Electronic Conf. on Tropical Silage*, Rome, Italy.
- Oude Elferink, S. J. W. H., J. Krooneman, J. C. Gottschal, S. F. Spoelstra, F. Faber, and F. Driehuis. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:125-132.
- Ørskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92:499-503.
- Pahlow, G., R. E. Muck, F. Driehuis, S. J. W. H. Oude Elferink, and S. F. Spoelstra. 2003. Microbiology of ensiling, Pages 31-93 in *Silage Science and Technology*. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, ed. Am. Soc. Agron., Inc., Crop Sci. Soc. Am., Inc., Soil Sci. Soc. Am., Inc. Publications, Madison, WI.
- Playne, M. J., and P. McDonald. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *J. Sci. Food Agric.* 17:264-268.



- Poppi, D. P., D. J. Minson, and J. H. Ternouth. 1981. Studies of cattle and sheep eating leaf and stem fractions of grasses. III The retention time in the rumen of large feed particles. *Aust. J. Agric. Res.* 32:123-137.
- Reed, K. F. M., and D. D. Moore. 2009. A preliminary survey of zearalenone and other mycotoxins in Australian silage and pasture. *Anim. Prod. Sci.* 49:696-703.
- Rees, D. V. H. 1982. A discussion of sources of dry matter loss during the process of haymaking. *J. Agric. Eng. Res.* 27:469-479.
- Reich, L. J., L. Kung. 2010. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 159:105-109.
- Repetto, J. L., V. Echarri, M. Aguerre, and C. Cajarville. 2011. Use of fresh whey as an additive for lucerne silages: Effects on chemical composition, conservation quality and ruminal degradation of cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 170:160-164.
- Risk, C., A. F. Mustafa, and L. E. Phillip. 2005. Effects of inoculation of high dry matter alfalfa silage on ensiling characteristics, ruminal nutrient degradability and dairy cow performance. *J. Sci. Food Agric.* 85:743-750.
- Rodrigues, I., and K. Naehrer. 2012. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* 4:663-675.
- Särkijärvi, S., A. Seppälä, J. Perälä, T. Heikkilä, M. Nysand, and M. Mäki. 2012. Preference of horses for haylage ensiled with propionic acid based additive. Pages 516-517. In: XVI Int. Silage Conf. Hämeenlinna, Finland.
- Scudamore, K. A., and C. T. Livesey. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: A review. *J. Sci. Food Agric.* 77:1-17.
- Seale, D. R., A. R. Henderson, K. O. Pettersson, and J. F. Lowe. 1986. The effect of addition of sugar and inoculation with two commercial inoculants on fermentation of lucerne silage in laboratory silos. *Grass Forage Sci.* 41:61-70.

- 
- Shaver, R. D., R. A. Erdman, A. M. O'connor, and J. H. Vandersall. 1985. Effect of silage pH on voluntary intake of corn silage and alfalfa haylage. *J. Dairy Sci.* 68:338-346.
- Silva, V. P., O. G. Pereira, E. S. Leandro, T. C. D. Silva, K. G. Ribeiro, H. C. Mantovani, and S. A. Santos. 2016. Effects of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential on fermentation profile and chemical composition of alfalfa silage in tropical conditions. *J. Dairy Sci.* 99:1895-1902.
- Sneath, P. H. A., N. S. Mair, H. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- Squire, R. A. 1981. Ranking animal carcinogens: A proposed regulatory approach. *Sci.* 214:877-880.
- Sreemannarayana, O., A. A. Frohlich, T. G. Vitti, R. R. Marquardt, and D. Abramson. 1988. Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. *J. Anim. Sci.* 1988:1703-1711.
- Staerfl, S. M., S. L. Amelchanka, T. Kälber, C. R. Soliva, M. Kreuzer, and J. O. Zeitz. 2012. Effect of feeding dried high-sugar ryegrass ('AberMagic') on methane and urinary nitrogen emissions of primiparous cows. *Livest. Sci.* 150:293-301.
- Steg, A., and J. M. van der Meer. 1985. Differences in chemical composition and digestibility of beet and cane molasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 13:83-91.
- Storm, I. M. D., J. L. Sørensen, R. R. Rasmussen, K. F. Nielsen, and U. Thrane. 2008. Mycotoxin in silage. *Stewart Postharvest Rev.* 6:1-12.
- Tengerdy, R. P., Z. G. Weinberg, G. Szakacs, M. Wu, J. C. Linden, L. L. Henk, and D. E. Johnson. 1991. Ensiling alfalfa with additives of lactic acid bacteria and enzymes. *J. Sci. Food Agric.* 55:215-228.
- Tilley, J. M. A., and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Grass Forage Sci.* 18:104-111.

- 
- Tjandraatmadja, M., B. W. Norton, and I. C. M. Rae. 1994. Ensilage characteristics of three tropical grasses as influenced by stage of growth and addition of molasses. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:74-81.
- Umucalilar, H. D., B. Coşkun, and N. Gülşen. 2002. *In situ* rumen degradation and *in vitro* gas production of some selected grains from Turkey. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 86:288-297.
- Upadhaya, S. D., M. A. Park, and J. K. Ha. 2010. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: A review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23:1250-1260.
- Van Os, M., A. M. Van Vuuren, and S. F. Spoelstra. 1997. Mechanism of adaptation in sheep to overcome silage intake depression induced by biogenic amines. *Br. J. Nutr.* 77:399-415.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39:971-974.
- Weaver, G. A., H. J. Kurtz, J. C. Behrens, T. S. Robison, B. E. Segium, F. Y. Bates, and C. J. Mirocha. 1986. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. *Am. J. Vet. Res.* 47:1395-1397.
- Weinberg, Z. G., and R. E. Muck. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* 19:53-68.
- Weir, W. C., L. G. Jones, and J. H. Meyer. 1960. Effect of cutting interval and stage of maturity on the digestibility and yield of alfalfa. *J. Anim. Sci.* 19:5-19.
- West, J. W., G. M. Hill, J. M. Fernandez, P. Mandebvu, and B. G. Mullinix. 1999. Effects of dietary fiber on intake, milk yield, and digestion by lactating dairy cows during cool or hot, humid weather. *J. Dairy Sci.* 82:2455-2465.

- 
- White, A., P. Handler, E. L. Smith, R. L. Hill, and I. R. Lehman. 1978. Principles of Biochemistry. McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo.
- Whitelaw, F. G., J. S. Milne, and X. B. Chen. 1991. The effect of a rumen microbial fermentation on urea and nitrogen metabolism of sheep nourished by intragastric infusion. *Exp. Physiol.* 76:91-101.
- Wilkinson, J. M., and D. R. Davies. 2012. The aerobic stability of silage: Key findings and recent developments. *Grass and Forage Sci.* 68:1-19.
- Woolford, M. K. 1975. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C₁-C₁₂) as potential silage additives. *J. Sci. Food Sci.* 26:219-228.
- Woolford, M. K., and G. Pahlow. 1998. The silage fermentation. Page 73-102. In: B. J. B. Wood (ed.) *Microbiology of Fermented Foods*. 2nd ed. Vol. 3. Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Yang, L., X. Yuan, J. Li, Z. Dong, and T. Shao. 2019. Dynamics of microbial community and fermentation quality during ensiling of sterile and nonsterile alfalfa with or without *Lactobacillus plantarum* inoculant. *Bioresour. Technol.* 275:280-287.
- Yang, W. Z., and K. A. Beauchemin. 2007. Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: Chewing and ruminal pH. *J. Dairy Sci.* 90:2826-2838.
- Yiannikouris, A., and J. P. Jouany. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. *Anim. Res.* 51:81-99.
- Yitbarek, M. B., and B. Tamir. 2014. Silage additives: Review. *Open J. Appl. Sci.* 4:258-274.
- Yu, Y., and J. W. Thomas. 1975. Effect of propionic acid and ammonium isobutyrate on preservation and nutritive values of alfalfa haylage. *J. Anim. Sci.* 41:1458-1467.

Yuan, X. J., A. Y. Wen, J. Wang, S. T. Desta, Z. H. Dong, and T. shao. 2018. Effects of four short-chain fatty acids or salts on fermentation characteristics and aerobic stability of alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage. *J. Sci. Food Agric.* 98:328-335.

Zhang, T., L. Li, X. Wang, Z. Zeng, Y. Hu, and Z. Cui. 2009. Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:965-971.

陸、附錄

附表 1. Fleig 氏青貯品質評分表 (陳等, 2000)

Appendix 1. Fleig score

乳酸		乙酸		丁酸	
總酸當量百分比	計分	總酸當量百分比	計分	總酸當量百分比	計分
%		%		%	
0.0-20	0	0.0-20	25	0.00-0.1	50
20.0-22		20.0-22	24	0.10-0.5	48
22.0-24	2	22.0-24	23	0.50-1.0	45
24.0-26	3	24.0-26	22	1.00-1.6	43
26.0-28	4	26.0-28	21	1.60-2.0	40
28.0-30	5	28.0-30	20	2.00-3.0	38
30.0-32	6	30.0-32	19	3.00-4.0	37
32.0-34	7	32.0-34	18	4.00-5.0	35
34.0-36	8	34.0-36	17	5.00-6.0	34
36.0-38	9	36.0-38	16	6.00-7.0	33
38.0-40	10	38.0-40	15	7.00-8.0	32
40.0-42	11	40.0-42	14	8.00-9.0	31
42.0-44	12	42.0-44	13	9.00-10.0	30
44.0-46	12	44.0-46	12	10.00-12.0	28
46.0-48	14	46.0-48	11	12.00-14.0	26
48.0-50	15	48.0-50	10	14.00-16.0	24
50.0-52	16	50.0-52	9	16.00-18.0	22
52.0-54	17	52-54.0	8	18.00-20.0	20
54.0-56	18	54.0-56	7	20.00-22.0	18
56.0-58	19	56.0-58	6	22.00-24.0	16
58.0-60	20	58.0-60	5	24.00-26.0	14
60.0-62	21	>60	0	26.00-28.0	12
62.0-64	22			28.00-30.0	10
64.0-66	23			30.00-32.0	9
66.0-68	24			32.00-34.0	8
68.0-70	25			34.00-36.0	7
>70	25			36.00-38.0	6
				38.00-40.0	5
				40.00-42.0	4
				42.00-44.0	3
				44.00-46.0	2
				46.00-48.0	1
				48.00-50.0	0
				50.00-52.0	-1
				52.00-54.0	-2
				54.00-56.0	-3
				56.00-58.0	-4
				58.00-60.0	-5
				>60	-10