

**WPLYW ZAWARTOŚCI SUCHEJ MASY ZAKISZANEGO SUROWCA ORAZ DODATKU  
PREPARATU BAKTERYJNEGO NA ZAWARTOŚĆ KWASÓW ORGANICZNYCH  
W KISZONKACH**

**Renata Choińska, Hanna Giryn, Elżbieta Bartosiak, Danuta Kotyrba**

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego  
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa  
renata.choinska@ibprs.pl

**Streszczenie**

Przedmiotem pracy było oznaczenie zawartości kwasów mlekowego, octowego, propionowego w kiszonkach sporządzonych w warunkach laboratoryjnych z runi łąkowej o zawartości suchej masy 44% i 67%. Proces zakiszania, w obu wariantach, prowadzono z dodatkiem i bez preparatu bakteryjnego zawierającego wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej. Dominującymi kwasami we wszystkich badanych kiszonkach były kwasy: mlekowy i octowy, natomiast kwas propionowy występował w ilościach śladowych. Poziom kwasów organicznych w poszczególnych kiszonkach różnił się w zależności od zawartości suchej masy zakiszanej runi łąkowej. Wraz ze wzrostem zawartości suchej masy zakiszanej zielonki zaobserwowano istotny spadek ilości analizowanych kwasów. Po 42 dobach fermentacji w warunkach beztlenowych kiszonki sporządzone z runi łąkowej o wysokiej zawartości suchej masy, wynoszącej 67%, zawierały średnio o 70% mniej zarówno kwasu mlekowego, jak i kwasu octowego, w porównaniu z kiszonkami otrzymanymi z runi łąkowej o zawartości suchej masy na poziomie 44%. Wpływ dodatku preparatu bakteryjnego na zawartość analizowanych kwasów był uzależniony od zawartości suchej masy zielonki. Dodanie preparatu bakteryjnego spowodowało istotne zmiany jedynie w przypadku kiszonki sporządzonej z surowca o zawartości suchej masy 44%. W kiszonce fermentującej z dodatkiem preparatu bakteryjnego zawartość kwasu mlekowego była o 36% wyższa niż w kiszonce, do której bakterii nie dodano.

**Słowa kluczowe:** preparat bakteryjny do zakiszania pasz, chromatografia kwasów organicznych, produkty fermentacji kiszzonek

## **EFFECT OF DRY MASS AND BACTERIAL SILAGE INOCULANT ON THE CONTENT OF ORGANIC ACIDS IN SILAGES**

### **Summary**

The amount of lactic acid, acetic acid, propionic acid in grass silages was determined in this study. Ensiling was conducted in laboratory silos with or without addition of bacterial preparation containing selected strains of lactic acid bacteria. Silages were made from grasses with different dry mass content 44% and 67%, respectively. In all studied samples lactic acid and acetic acid dominated over the other analytes. The amount of analyzed compounds varied depending on the silages preparation conditions. The dry mass content of the ensiled grasses was the most important factor imparting the level of the analyzed organic acids in the silages. With the increase of the dry mass content, decrease of the level of the organic acids was observed. Silages made from grass with high dry mass content i.e. 67%, had average less, about 70%, lactic, acetic acids than silages made from grass with dry mass content of 44%. The influence of the bacterial preparation on the amount of organic acids in silages was dependent on the dry mass content of ensilaged materials. Inoculation had pronounced on the increase of the content of lactic acid in the silages prepared from grass with dry mass content of 44%. This silage had 36% more lactic acid than inoculated one.

**Key words:** bacterial silage inoculant, chromatography of organic acids, silages fermentation products

### **WSTĘP**

Pasze stosowane w żywieniu zwierząt, takie jak trawa (ruń łąkowa), lucerna, kukurydza, są powszechnie utrwalane w procesie kiszenia. Kiszonki zaliczane do pasz objętościowych soczystych są cennym źródłem pokarmowym (stanowią około 60% dawki pokarmowej) stosowanym w żywieniu zwierząt hodowlanych w okresie zimowym [Zielińska i in. 2007]. Jakość i wartość pokarmowa kiszzonek związana jest głównie z zawartością produktów procesu fermentacji mlekowej, m.in. kwasu mlekowego, kwasu octowego. Obecność produktów przemian metabolicznych bakterii mlekowych w kiszonce uzależniona jest natomiast od wielu czynników, w tym m.in.: od przydatności surowców roślinnych do zakiszania (stopnia podsuszenia zakiszane materiału) oraz od technologii produkcji kiszzonek. Zawartość suchej masy zakiszane surowca powinna być na poziomie 35–40%. Niższa zawartość suchej masy przyczynia się do podwyższenia ilości kwasu masłowego i octowego, których nadmiar obniża wartość odżywcza kiszzonek. Ponadto prowadzi do wycieku dużych ilości soku kiszzonekowego, co

wiąże się ze stratami składników odżywczych, zwłaszcza cukrów stanowiących niezbędną pożywkę dla bakterii mlekowych. Sporządzanie kiszonek z traw zbyt podsuszonych ma również negatywny wpływ na ich jakość i strawność. Kiszonki takie charakteryzują się niską zawartością kwasu octowego i propionowego oraz wysoką wartością pH [Szyszkowska i in. 2010]. Zakiszanie surowca zarówno o zbyt wysokiej, jak i o zbyt niskiej zawartości suchej masy jest niepożądane, gdyż kiszonki o niskiej wartości odżywczej oraz kiszonki kwaśne są niechętnie pobierane przez zwierzęta [Górka 2009]. Uzyskanie dobrej jakości kiszonki o odpowiedniej wartości odżywczej wymaga przestrzegania określonych zasad prowadzenia procesu zakiszania pasz [Dinić i in. 2010]. Ważnym elementem w technologii produkcji kiszonek jest dodatek preparatów bakteryjnych zawierających wyselekcjonowane homo- i heterofermentacyjne szczepy bakterii fermentacji mlekowej. Głównym celem stosowania preparatów bakteryjnych jest stymulacja i ukierunkowanie przebiegu procesu fermentacji [Weinberg i Muck 1996; Bolsen i in. 1996; Driehuis i in. 1999, Zielińska i in. 2007]. Jak wynika z praktyki, stosowanie surowca o odpowiednim stopniu przewodnictwa jak również odpowiednie jego zagęszczenie nie zawsze gwarantuje uzyskanie produktu o pożądanych właściwościach. Dodatek preparatu bakteryjnego zapewnia dostateczną ilość bakterii kwasu mlekowego, które w sposób naturalny wspomagają przebieg fermentacji mlekowej w zakiszonym surowcu [Wróbel 2012; Zielińska i in. 2007].

Liczne badania przeprowadzone w ostatnich latach nad wykorzystaniem wyselekcjonowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej, w tym głównie szczepu *Lactobacillus buchneri*, dowodzą korzystnego wpływu tego heterofermentatywnego szczepu na poprawę stabilności tlenowej kiszonek. Bakterie mlekowe *L. buchneri* obniżają przeżywalność drożdży w warunkach beztlenowych oraz hamują ich wzrost przy dostępie powietrza, co przyczynia się do podwyższenia stabilności tlenowej kiszonki i jej jakości [Weinberg i Muck 1996; Driehuis i in. 1999, 2001; Holzer i in. 2003]. Szczep ten ponadto charakteryzuje się zdolnością do beztlenowej degradacji kwasu mlekowego do kwasu octowego i 1,2-propanodiolu. Prawdopodobnie 1,2-propanodiol jest metabolitem pośrednim, który ulega degradacji do 1-propanolu i kwasu propionowego przy udziale bakterii *Lactobacillus diolivorans* [Krooneman i in. 2002]. Kwasy octowy i propionowy wykazują silne działanie antybakteryjne i antyfungistyczne [Forbes 1995].

Analiza zawartości kwasów organicznych i innych metabolitów wytworzonych w kiszonkach ma istotne znaczenie ze względu na możliwość uzyskania informacji dotyczących jakości kiszonki, jak również może posłużyć jako wskaźnik stabilności i potencjalnej oporności kiszonki na fermentację wtórną.

Celem niniejszej pracy było oznaczenie z zastosowaniem technik chromatograficznych,

zawartości kwasu mlekowego, octowego, propionowego w kiszonkach sporządzonych z dodatkiem/bez dodatku preparatu bakteryjnego zawierającego heterofermentatywny szczep *Lactobacillus buchneri*.

## **MATERIAŁ I METODY BADAŃ**

### **1. Materiał do badań**

Materiał do badań stanowiły kiszonki sporządzone z uprzednio podsuszanej runi łąkowej z dodatkiem preparatu zawierającego heterofermentatywny szczep *Lactobacillus buchneri* KKP 907 i bez dodatku tego preparatu. Zawartość suchej masy zakiszane surowca wynosiła 44% i 67%. Kiszonki były przechowywane przez 6 tygodni (42 doby) w szczelnie zamkniętych plastikowych pojemnikach (w warunkach beztlenowych). Zawartość analitów badano w próbkach pobieranych po upływie 6 tygodni zakiszania i przez kolejne 12 dni po zakończeniu inkubacji w warunkach beztlenowych.

### **2. Metody badań**

#### *Oznaczanie produktów fermentacji mlekowej*

Metabolity bakterii fermentacji mlekowej ekstrahowano z kiszonek wodą. Uzyskane ekstrakty oczyszczano metoda ekstrakcji do fazy stałej na kolumnkach SPE-C<sub>18</sub>, a następnie analizowano, wykorzystując techniki chromatograficzne.

Kwas mlekowy oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej: HPLC-Gilson z detektorem UV (206 nm) i kolumną Aminex 87H-Biorad. Faza ruchoma: kwas siarkowy pH 3,1; przepływ 0,6 ml/min w 64°C. Kwas octowy i kwas propionowy oznaczano techniką chromatografii gazowej, stosując chromatograf gazowy firmy Agilent Technologies 7890A z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID), kolumną kapilarną o średnicy 0,53 mm, długości 30 m z fazą DB-FFAP (J&W Scientific Columns). Gaz nośny: hel, szybkość przepływu 85 ml/min, program temperaturowy: 35°C (0,5 min), przyrost 20°C/min do 90°C, przyrost 10°C/min do 200°C (0,5 min). Oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach.

### **3. Analiza statystyczna wyników**

Aby stwierdzić, czy badane kiszonki różnią się statystycznie pod względem zawartości kwasów mlekowego, octowego i propionowego, po 42 dobach fermentacji w warunkach beztlenowych przeprowadzono jednoczynnikowe analizy wariancji. Dokonane zostały porównania zaplanowane, mające na celu potwierdzenie występowania potencjalnych różnic

między kiszonkami, zarówno pod kątem zawartości suchej masy, jak i dodatku preparatu bakteryjnego. W przypadku odrzucenia w analizie wariancji hipotezy zerowej o równości średnich, na przyjętym poziomie istotności, przeprowadzono grupowanie średnich za pomocą testu Tukeya. Dla wszystkich analiz przyjęto poziom istotności  $\alpha=0,05$ . Analizę statystyczną wykonano, wykorzystując program Statistica firmy Statsoft.

## DYSKUSJA I WYNIKI

Zawartość kwasów organicznych oraz pH kiszonek oznaczone po 42 dobach fermentacji w warunkach beztlenowych przedstawiono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Zawartość kwasów organicznych oraz pH kiszonek sporządzonych z dodatkiem i bez dodatku preparatu bakteryjnego po 42 dobach fermentacji.

W nawiasach podano grupy jednorodnie wyróżnione za pomocą testów post-hoc (Tukeya): grupy a, b – oznaczenia grup jednorodnych dla danego kwasu, w kiszonkach Kk44 i Kb44; grupy A, B – oznaczenia grup jednorodnych dla danego kwasu, w kiszonkach Kk67 i Kb67. Takie same litery oznaczają brak różnic istotnych statystycznie.

*pH and organic acids content of silages treated with and without bacterial preparation after opening laboratory silo on day 42 of ensiling.*

*The statistical analyses of obtained results (Tukey's test) are shown in parentheses. Groups: a, b – silages Kk44 and Kb44; groups A, B – silages Kk67 and Kb67.*

Zawartość suchej masy zakiszane surowca [%]	Kiszonka	pH kiszonki	Zawartość kwasów organicznych [g·kg <sup>-1</sup> (s.m.)*]		
			mlekowy	octowy	propionowy
44	Kk 44	4,4	13,95 ± 0,21 (a)	21,05 ± 0,64 (a)	0,60 ± 0,14 (a)
	Kb 44	4,1	21,70 ± 0,28 (b)	21,70 ± 0,14 (a)	1,05 ± 0,07 (b)
67	Kk 67	5,9	4,8 ± 0,14 (A)	5,7 ± 0,12 (A)	0,42 ± 0,03 (A)
	Kb 67	5,3	5,2 ± 0,14 (A)	7,0 ± 0,14 (A)	0,11 ± 0,01 (B)

Kk – kiszonka bez dodatku preparatu bakteryjnego

Kb – kiszonka z dodatkiem preparatu bakteryjnego

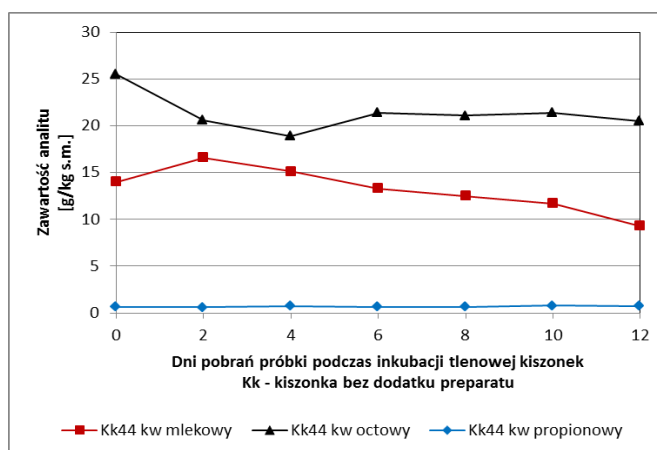
\* – zawartość w przeliczeniu na suchą masę

Po 42 dobach zakiszania runi łąkowej o zawartości suchej masy 44% stwierdzono istotne różnice w zawartości kwasu mlekowego oraz kwasu propionowego pomiędzy kiszonką otrzymaną z dodatkiem preparatu bakteryjnego (Kb44) a kiszonką sporządzoną bez preparatu (Kk44). Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w zawartości kwasu octowego

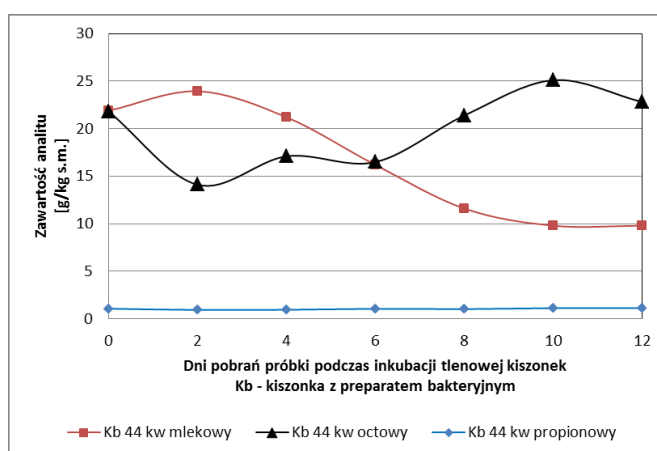
(tabela 1). Stężenie kwasu mlekowego w kiszonce Kb44 po 42 dobach fermentacji było o 7,9 g/kg (36%) wyższe od stężenia w kiszonce Kk44.

W kiszonce Kk44, otrzymanej w wyniku fermentacji runi łąkowej przy udziale obecnych w środowisku mikroorganizmów, wśród oznaczanych kwasów organicznych dominował kwas octowy (tabela 1). Wysoka zawartość kwasu octowego, przewyższająca ilość kwasu mlekowego, ujemnie wpływa na właściwości smakowe kiszonki [Górka 2009]. Dodatek preparatu bakteryjnego zawierającego *L. buchneri* miał korzystny wpływ na wzrost zawartości kwasu mlekowego w kiszonce Kb44. Po 42 dobach fermentacji zawartość obu kwasów, octowego i mlekowego, w kiszonce Kb44 była na zbliżonym poziomie. W początkowej fazie inkubacji w warunkach tlenowych zawartość kwasu mlekowego przewyższała zawartość kwasu octowego w kiszonce Kb44 (rysunek 1b). W kolejnych dniach zaobserwowano zmniejszanie się zawartości kwasu mlekowego zarówno w kiszonce kontrolnej, jak i inokulowanej preparatem (rysunek 1). Zawartość kwasu octowego w okresie inkubacji w warunkach tlenowych w kiszonce otrzymanej bez dodatku preparatu bakteryjnego znajdowała się na prawie niezmiennym poziomie i wynosiła średnio 21,1 g/kg suchej masy kiszonki (rysunek 1a). W przypadku kiszonki z preparatem Kb44 zawartość tego kwasu była zmienna, z minimalną tendencją wzrostową w ostatnich dniach inkubacji (rysunek 1b). Spadek zawartości kwasu mlekowego i zmniejszenie jego udziału w kiszonkach, w porównaniu z udziałem kwasu octowego, przyczynił się do zmiany pH kiszonek, które w końcowym dniu inkubacji w warunkach tlenowych wynosiło 4,7 w kiszonce Kb44 oraz 4,6 w przypadku kiszonki Kk44. Kwas octowy w porównaniu z kwasem mlekowym posiada wyższe wartości pKa [Driehuis i in. 1999].

W badanych próbkach kiszonek oznaczono również kwas propionowy, jednak jego zawartość znajdowała się na bardzo niskim poziomie, ok. 1 g/kg suchej masy kiszonki (rysunek 1).



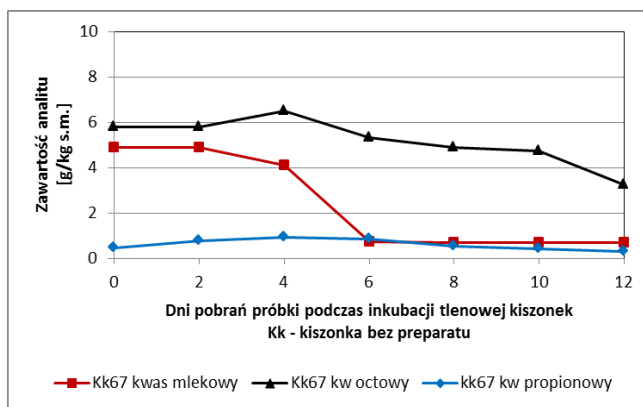
(a)



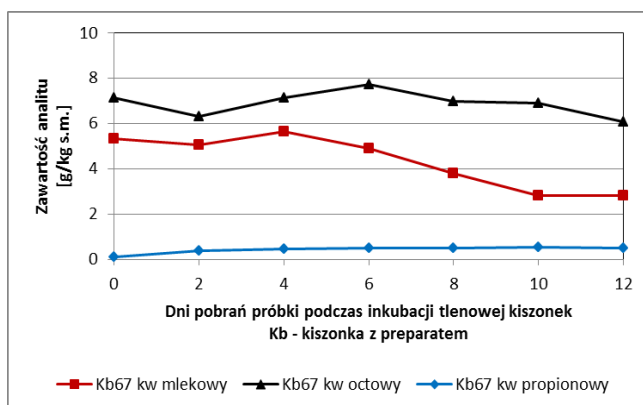
(b)

**Rysunek 1.** Zmiany stężenia analizowanych kwasów organicznych podczas inkubacji tlenowej kiszzonek sporządzonych z zielonki o zawartości suchej masy 44%. (a) kiszzonka otrzymana bez dodatku preparatu, (b) kiszzonka otrzymana z dodatkiem preparatu. *Changes in the organic acids content in silages prepared from grass with 44% dry mas content, during aerobic incubation. (a) silage prepared without addition of bacterial preparation, (b) silage prepared with addition of bacterial preparation.*

Analiza zawartości kwasu mlekowego w kiszzonek Kk67 i Kb67, po 42 dobach fermentacji w warunkach beztlenowych, wykazała brak istotnego wpływu dodatku preparatu na wzrost zawartości tego kwasu. Nie zaobserwowano również istotnych różnic w zawartości kwasu octowego pomiędzy kiszzoneką kontrolną i inokulowaną (tabela 1). Ilość analizowanego kwasu propionowego w kiszzonek wynosiła poniżej 1 g/kg suchej masy kiszzoneki, jednak jego ilość w kiszonce Kb67 była statystycznie niższa ( $p < 0,05$ ) niż w Kk67 (tabela 1). Kwas octowy dominował nad kwasem mlekowym i propionowym w kiszonce Kk67 i Kb67, zarówno podczas fermentacji w warunkach beztlenowych, jak i podczas inkubacji tlenowej (tabela 1, rysunek 2). Podczas inkubacji tlenowej kiszzonek Kk67 i Kb67 zaobserwowano spadek zawartości kwasu mlekowego.



(a)



(b)

**Rysunek 2.** Zmiany stężenia analizowanych kwasów organicznych podczas inkubacji tlenowej kiszzonek sporządzonych z zielonki o zawartości suchej masy 67%. (a) kiszonka otrzymana bez dodatku preparatu, (b) kiszonka otrzymana z dodatkiem preparatu. *Changes in the organic acids content in silages prepared from grass with 67% dry mas content, during aerobic incubation. (a) silage prepared without addition of bacterial preparation, (b) silage prepared with addition of bacterial preparation.*

Wzrost zawartości suchej masy zakiszanej runi łąkowej do poziomu 67% spowodował zmniejszenie, średnio o 70%, zawartości zarówno kwasu mlekowego, jak i octowego oraz propionowego w kiszzonek (tabela 1). Po 42 dobach fermentacji kiszzonek Kk67 i Kb67, charakteryzowały się istotnie niższymi ( $p < 0,05$ ) stężeniami oznaczanych kwasów organicznych w porównaniu z kiszzonekami sporządzonymi z runi łąkowej o mniejszej zawartości suchej masy.

Kiszzoneki sporządzone z surowca o wyższej zawartości suchej masy cechowały się wyższymi wartościami pH (tabela 1). Spadek zawartości kwasu mlekowego oraz wzrost pH w kiszzonekach otrzymanych z surowca o wysokiej zawartości suchej masy zaobserwowali również inni badacze, jak np.: Rajcakova i in. (2003), Gallo i in. (2003), w swoich pracach związanych z zakiszaniem czerwonej koniczyny. Zależność ta, wynikająca z ograniczonej dostępności wody w zakiszonym surowcu, sprawia, iż efektywność zakiszania surowca o takich parametrach jest niska. Odpowiednia wilgotność środowiska jest niezbędna do prawidłowego



przebiegu procesów życiowych bakterii fermentacji mlekowej i związanej z tym syntezy kwasów organicznych. Przy wysokiej zawartości suchej masy, powyżej 45%, zahamowaniu ulegają przemiany fermentacyjne bakterii mlekowych, ponieważ tylko 10% epifitycznych bakterii kwasu mlekowego jest zdolnych do rozwoju w takich warunkach [Wróbel 2012].

### WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono różnice w zawartości oznaczanych kwasów organicznych: mlekowego, octowego i propionowego, w zależności od zawartości suchej masy zakiszane surowca.
2. Po 42 dobach fermentacji kiszonki sporządzone z runi łąkowej o zawartości suchej masy wynoszącej 67% charakteryzowały się o ok. 70% niższą zawartością analizowanych kwasów organicznych oraz wyższą wartością pH w porównaniu z kiszunkami sporządzonymi z runi łąkowej o zawartości suchej masy 44%.
3. Dodatek preparatu bakteryjnego przyczynił się do wzrostu zawartości kwasu mlekowego jedynie w przypadku kiszonek sporządzonych z surowca o zawartości suchej masy na poziomie 44%.
4. Stopień podsuszenia materiału odgrywa zasadniczą rolę w procesie zakiszania. Dodatek preparatu bakteryjnego do surowca o wysokiej zawartości suchej masy nie miał istotnego wpływu na ilość kwasu mlekowego powstającego w czasie zakiszania.

### PIŚMIENNICTWO

1. Bolsen K.K., Ashbell G., Weinberg Z.G. (1996). Silage fermentation and silage additives. *AJAS*, 9(5), 483-493
2. Dinić B., Dordević N., Anđelković B., Sokolović D., Terzić D. (2010). Management of fermentation process in ensilaged livestock feed. *Biotechnol. Animal Husbandry*, 26(1-2), 105-115
3. Driehuis F., Elferink Oude S.J.W.H., van Piet G. (1999). Production in relation to animal performance, animal health, meat, and milk quality. W: The XII International silage conference, Uppsala, Sweden, 264-265
4. Driehuis F., Elferink Oude S.J.W.H., van Wixselaar P.G. (2001). Fermentation characteristic and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science*, 56, 330-343
5. Forbes J.M. (1995). Voluntary food intake and diet selection in farm animals. Wallingford, UK, CAB International

6. Gallo M., Rajcakova L., Mlynar R. (2003). Effect of application biological additive on fermentation quality of red clover silage. W: XI International scientific symposium "Forage Conservation", Nitra, 96-97
7. Górka P. (2009). Kiszonka w ocenie. Tygodnik Rol., 52,
8. Holzer M., Maryhuber E., Danner H., Braun R. (2003). The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. Trends Biotechnol., 21(6), 282-287
9. Krooneman J., Faber F., Alderkamp A.C., Elferink Oude S.J.W.H., Driehuis F., Cleenwerck I., Swings J., Gottschal J.C., Vancanneyt M. (2002). *Lactobacillus diolivorans* sp.nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. Intern. J. System. Evol. Microbiol., 52, 639-646
10. Rajcakova L., Mlynar R., Gallo M., Bencova E. (2003). The effect of wilting on the fermentation quality of red clover silage. W: XI International scientific symposium "Forage Conservation", Nitra, 94-95
11. Szyszkowska A., Krzywiecki S., Sobczyk I. (2010). Czynniki wpływające na intensywność procesu wtórnej fermentacji w kiszonkach oraz wpływ skarmiania niestabilnych tlenowo kiszzonek na ryzyko wystąpienia jednostek chorobowych u krów mlecznych. Zesz. Nauk. UP Wroc., Biol. Hod. Zwierz., LX, 577, 205-216
12. Weinberg Z.G., Muck R.E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculant for silage. FEMS Microbiol. Rev., 19, 53-68
13. Wróbel B. (2012). Ocena efektywności stosowania dodatków biologicznych w procesie zakiszania runi łąkowej. J. Res. Appl. Agric. Eng., 57(4), 193-198
14. Zielińska K.J., Grzybowski R.A., Stecka K.M., Suterska A.M., Miecznikowski A.H. (2007). Wpływ preparatu bakteryjno-mineralno-witaminowego w procesie kiszenia runi łąkowej na hamowanie rozwoju pleśni toksynotwórczych. J. Res. Appl. Agric. Eng., 52 (4), 114-118