



شماره ۱۰۵، زمستان ۱۳۹۳

صص: ۱۹۳-۲۰۲

شرعی علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

تأثیر فرآوری‌های شیمیایی بر ترکیبات شیمیایی و تجزیه پذیری

شکمبه‌های گاو برنج

- ابراهیم قاسمی (نویسنده مسئول)
استادیار گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان.
 - محمد خورش
دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان.
 - غلامرضا قربانی
استاد گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان.
 - حسین امیدی
دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان.
 - محمد رضا امامی
دانشیار گروه آموزشی علوم درمانگاهی - بهداشت و پیشگیری بیماری‌های دامی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد
- تاریخ دریافت: آبان ۹۲ تاریخ پذیرش: دی ۹۲
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۳۱۳۳۹۱۳۵۰۱
Email: ghasemi@cc.iut.ac.ir

چکیده

در این مطالعه، تأثیر فرآوری‌های اوره (۵ درصد)، آمونیاک (۳/۵ درصد)، هیدروکسید سدیم (۵ درصد)، هیدروکسید کلسیم (۴ درصد)، اسید سولفوریک (۵ درصد) و پرکسید هیدروژن (۵ درصد) بر pH، محلولیت ماده خشک، لیگنین، سیلیکا، ترکیبات فنولیک، ساختار سلولز و همی سلولز و تجزیه پذیری ماده خشک و کربوهیدرات‌های دیواره سلولی گاو برنج ارزیابی شد. پس از فرآوری، گاو-های برنج در سیلوهای آزمایشگاهی به مدت ۱ ماه سیلو شدند و سپس تحت تجزیه شیمیایی، آزمون FTIR (آنالیز مادون قرمز فوریر) و تجزیه پذیری شکمبه‌ای (گاو فیستوله شده) قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که فرآوری گاو با اوره تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر خواص شیمیایی و بهبود تجزیه پذیری شکمبه‌ای گاو برنج ندارد ($P > 0.05$). آمونیاک تأثیر کمی بر محلولیت ماده خشک و کربوهیدرات‌های دیواره سلولی ($P > 0.05$) ولی تأثیر به‌سزایی در آزادی ترکیبات فنولی و افزایش تجزیه پذیری دیواره سلولی داشت ($P < 0.01$). بیشترین میزان محلولیت ماده خشک، ترکیبات فنولی و کربوهیدرات‌های دیواره سلولی با فرآوری اسیدی حاصل گردید ($P < 0.01$). فرآوری اسیدی، تجزیه پذیری ماده خشک گاو را افزایش، ولی پیوندهای هیدروژنی داخل میکروفیبریل سلولز و تجزیه پذیری کربوهیدرات‌های دیواره سلولی را کاهش داد ($P < 0.01$). فرآوری با پرکسید هیدروژن، پیوندهای عرضی اسمری بین ترکیبات دیواره سلولی را افزایش داد در حالی که بر سایر ترکیبات گاو تأثیری نداشت ($P > 0.05$) تجزیه پذیری ماده خشک و بوژه بخش همی سلولز با پرکسید هیدروژن کاهش یافت ($P < 0.01$). بیشترین میزان تجزیه پذیری، محلولیت سیلیکا و ترکیبات فنولیک با فرآوری سود بدست آمد ($P < 0.01$). فرآوری پرکسید هیدروژن با افزایش اتصالات عرضی و فرآوری اسید سولفوریک با کاهش pH گاو باعث افت تجزیه پذیری شده در حالی که فرآوری آمونیاک و سود بدون تأثیر منفی بر خواص شیمیایی گاو، تجزیه پذیری شکمبه را به طور قابل توجهی افزایش دادند.

واژه‌های کلیدی: گاو برنج، فرآوری شیمیایی، تجزیه پذیری، خصوصیات شیمیایی.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 105 pp: 193-202

Effects of chemical treatments on chemical compositions and rumen degradability of rice straw

By: Ebrahim Ghasemi^{1*}, Mohammad Khorvash², Gholam Reza Ghorbani³, Hossein Omid⁴ and Mohammad Reza Emami⁵

1, 2, 3 and 4 assistant professor, associate professor, professor of animal science and M. Sc. Student of Animal Science, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran. 5: Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary medicine, Ferdowsi University of Mashhad. Corresponding author: Ebrahim Ghasemi, Tel: +9803133913501 E-mail:ghasemi@cc.iut.ac.ir

Received: November 2013

Accepted: January 2014

The aim of this study was to evaluate the effects of chemical treatments including urea (5%), ammonia (3.5%), calcium hydroxide (4%), sodium hydroxide (5%), sulphuric acid (5%) and hydrogen peroxide (5%) on pH, DM solubility, lignin, silica, phenolic compounds, cellulose and hemicellulose structure and ruminal degradability of rice straw. After processing, the treated straw was ensiled for 1 month and then analysed for chemical characteristics, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, and ruminal degradability (fistulated cows). The results showed that urea treatment showed no considerable effect on chemical compositions and ruminal degradability when compared to untreated straw. Ammonia treatments caused a slight increase in dry matter solubility and neutral detergent fiber ($P>0.05$) while, the release of phenolic compounds and degradability of NDF were largely enhanced with ammonia treatment ($P<0.01$). Improvement in solubility of DM, phenolic compounds and NDF were highest as a result of acidic treatment ($P<0.01$). Although, DM degradability was enhanced, inter molecular hydrogen bonds in cellulose microfibrils and NDF degradability was depressed with acid application ($P<0.01$). Treatment with hydrogen peroxide increased degree of esterification, showed no effect on chemical characteristics ($P>0.05$), but decreased significantly DM and, in particular hemicellulose degradability ($P<0.01$). The highest improvement in ruminal degradability, silica and phenolic compounds solubilities were achieved with NaOH treatment ($P<0.01$). In conclusion, treatment with hydrogen peroxide and sulphuric acid resulted in increased esterification of hemicellulose and in decreased the optima pH for ruminal microbes, respectively while, ammonia and sodium hydroxide treatments showed no adverse impact on the chemical characteristics with a substantial enhancement in ruminal degradability of rice straw.

Key words: rice straw, chemical treatments, degradability, chemical characteristics.

مقدمه

کربوهیدرات‌های دیواره سلولی، نرخ تجزیه پذیری (گوارش) کمی دارند و سطح بالای آن در جیره نشخوارکنندگان باعث محدودیت مصرف خوراک، انرژی و بنابراین تولید حیوان می‌شود (Jung و همکاران، ۲۰۰۰؛ Ghasemi و همکاران، ۲۰۱۳b). لیگنین بالا و نیتروژن کم عوامل محدود کننده قابلیت استفاده از کربوهیدرات‌های دیواره سلولی کاه غلات می‌باشند (Sarnklong و همکاران، ۲۰۱۰). سیلیکا و لیگنین به ترتیب مهمترین عوامل کاهشده کیفیت در کاه برنج معرفی شده‌اند (Van Soest، ۲۰۰۶). دیگر عوامل، حضور ترکیبات فنولی مونومری و همچنین ساختار درونی سلولز و همی سلولز مانند درجه استیلایسیون همی سلولز، بلوریت سلولز و اندازه قطعات و منافذ آن می‌باشند که کمتر تحت بررسی قرار گرفته‌اند (Taherzadeh and

در مناطق با اقلیم خشک و نیمه خشک، فراهمی علوفه‌های با کیفیت برای نشخوارکنندگان محدود بوده لیکن بقایای زراعی زیادی مثل کاه غلات به خاطر اولویت زمین برای کشت غلات هر ساله تولید می‌شوند (Sarnklong و همکاران، ۲۰۱۰). در ایران در سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰، از حدود ۱۲/۷۴ میلیون هکتار سطح برداشت محصولات زراعی، حدود ۹/۰۷ میلیون هکتار معادل ۷۱/۲ درصد آن به کشت غلات اختصاص یافته که نهایتاً حدود ۱۹/۳ میلیون تن غله شامل گندم، جو و شلتوک تولید شد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۹۲). به ازای هر کیلوگرم دانه غله، به طور میانگین حدود ۱/۳ کیلوگرم کاه تولید می‌شود (De Castro، ۱۹۹۴). از نظر ترکیب شیمیایی، بخش عمده این بقایای زراعی از دیواره سلولی (سلولز و همی سلولز) تشکیل شده است.

آمونیاک، آهک، سود، اسید سولفوریک، پرکسید هیدروژن و یونجه (شاهد مثبت). مواد شیمیایی شامل هیدروکسید سدیم (۵ درصد وزن خشک کاه)، هیدروکسید کلسیم (۴ درصد)، اوره (۵ درصد)، اسید سولفوریک (۵ درصد)، و پرکسید هیدروژن (۵ درصد) در یک لیتر آب به ازای هر کیلوگرم کاه حل شد و سپس با سمپاش باغبانی به صورت افشان پاشیده و با کاه کاملاً مخلوط شد. برای ثبت pH کاه پس از فرآوری، ۱۰ گرم نمونه در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه بوسیله مخلوط کن یکنواخت و pH آن اندازه گیری گردید (Ghasemi و همکاران، ۲۰۱۴). مخلوط‌های تهیه شده در سیلوهای کوچک آزمایشگاهی (۱۰ سانتیمتر قطر، ۷۰ سانتیمتر ارتفاع و دارای یک منفذ پیچی برای خروج آب مازاد) فشرده شدند. سرپوش سیلوها را به طور محکمی جایگذاری کرده و سیلوها به مدت ۵ هفته در دمای اتاق (۲۰ درجه) نگهداری شدند. برای فرآوری کاه با آمونیاک، کاه را با وزن مشخص درون کیسه‌های پلی اتیلنی ریخته و مقدار آمونیاک محلول به وزن ۳/۵ درصد کاه (وزنی/وزنی) افزوده و سریعاً بسته شد. پس از ۵ هفته، محتویات هر سیلو خارج و در ظرف سینی جهت خروج رطوبت مازاد در هوای آزاد به مدت چندین روز خشک شدند. کاه‌های فرآوری شده پس از خشک شدن، آسیاب (با توری ۱ میلی متری) و برای تعیین ترکیبات شیمیایی و تجزیه پذیری به کار برده شدند. بلافاصله پس از باز کردن سیلوها، pH آنها اندازه گیری شد. برای تعیین محلولیت کاه در اثر فرآوری‌های شیمیایی، مقدار ۰/۵ گرم نمونه (کیسه F57، ۲۵ میکرومتر، ۵×۴ cm، ANKOM CO, USA) در آب ۳۹ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شد (Ghasemi و همکاران، ۲۰۱۴). کیسه‌ها پس از شستشو خشک و تفاوت وزن ایجاد شده به عنوان ماده خشک محلول در نظر گرفته شد. الیاف حاصل شونده خنثی (NDF¹) و الیاف حاصل شونده اسیدی (ADF²) در دستگاه تجزیه الیاف (Ankom^{200/220} Fiber Analyzer, Fairport, USA) مطابق روش Van Soest و همکاران (۱۹۹۱) اندازه گیری شدند. لیگنین (ADL³) نمونه‌ها با اسید سولفویک ۷۲

(Karimi, ۲۰۰۸). گوارش پذیری، مصرف خوراک و تولید شیر با فرآوری شیمیایی یا مکمل‌های پروتئینی می‌تواند بهبود یابد (Ghasemi و همکاران، ۲۰۱۳b؛ Wanapat و همکاران، ۲۰۰۹). فرآوری‌های مختلفی برای بهبود ارزش غذایی کاه برنج بررسی شده‌اند (Van Soest, ۲۰۰۶). قدیمی‌ترین روش فرآوری کاه با سود، روش بکمن است (Van Soest, 2006). آمونیاک و اوره نقش غنی سازی با نیتروژن و اثر ضد کپکی بیشتری نسبت به سود دارند.

معمولاً فرآوری کاه با آمونیاک و اوره، ۴ تا ۶ درصد پروتئین خام را افزایش می‌دهد (Prasad و همکاران، ۱۹۹۸). عقیده بر این است که اکسنده‌ها (مثل پرکسید هیدروژن، پرمنگنات پتاسیم و ...) قدرت بیشتری در شکستن لیگنین دارند و اکسنده‌های مختلفی برای شکستن پلیمر لیگنین مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Reeves, ۱۹۸۵). علیرغم توسعه و توصیه روش‌های مختلف، کاه غلات همواره بدون فرآوری و حتی مکمل نیتروژنی تغذیه می‌شوند. دلایل متعددی از قبیل عدم شناخت کافی از کارایی روش‌های فرآوری، هزینه بالا، کاربرد آن در مزرعه، ترویج، روش بهینه وجود دارد. از طرفی، فرآوری‌های شیمیایی عمدتاً به صورت جداگانه بررسی شده و نسبت به هم مقایسه شده‌اند. هدف از این تحقیق، مقایسه تاثیر فرآوری‌های مختلف شیمیایی و فرآوری‌های کمتر بررسی شده (مثل پرکسید هیدروژن و اسید سولفوریک) بر تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای کاه برنج و تفسیر آن بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی (عوامل محدود کننده هضم) با استفاده از تجزیه شیمیایی و طیف مادون قرمز فوریر بود.

مواد و روش‌ها

کاه برنج از مزارع مختلف برنج شهرستان لنجان (اصفهان، لنجان) جمع آوری شد. در این منطقه ۳ نوع رقم زاینده رود، سازندگی و فیروزان کشت می‌شود (Ghasemi و همکاران، ۲۰۱۳a). فرآوری با مواد شیمیایی مطابق غلظت‌های توصیه شده صورت گرفت (Van Soest, ۲۰۰۶). تیمارهای آزمایشی در این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. تیمارها عبارتند از شاهد (بدون فرآوری)، اوره،

متوازن شده (جیره گاوهای خشک: ۴۰ درصد سیلوی ذرت، ۲۰ درصد علوفه یونجه، ۲۰ درصد کاه جو و ۲۰ درصد کنسانتره مکمل شده با مواد معدنی و ویتامینی) تغذیه می شدند. پس از اتمام زمان شکمبه گذاری، کیسه‌ها در آب سرد تا خارج شدن آب زلال شستشو و سپس در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. داده‌های حاصل با استفاده از طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از رویه مدل خطی عمومی (GLM) نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۱) مطابق مدل آماری زیر تجزیه و تحلیل شدند.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Y_{ij} مقدار هر مشاهده، μ میانگین جمعیت، T_{ij} اثر تیمار و e_{ij} شامل خطای آزمایشی می شدند. از آزمون مقایسه میانگین LSD جهت مقایسه بین میانگین تیمارها استفاده شد.

نتایج

مقادیر pH قبل (pH_1) و بعد (pH_2) از سیلوسازی برای فرآوری کاه با اسید مشابهت داشت. در حالی که pH کاه‌های فرآوری شده با مواد قلیایی به جز اوره پس از سیلو نمودن، کاهش (۲ - ۴ واحد) یافتند (جدول ۱). محلولیت ماده‌ی خشک بیشتری با فرآوری اسید سولفوریک (۲۲/۴ درصد) ایجاد شد با این حال محلولیت ماده خشک یونجه (۲۶/۶ درصد) از تمام فرآوری‌های شیمیایی کاه برنج بالاتر بود ($P < 0.01$). کمترین محلولیت توسط فرآوری با هیدروکسید کلسیم (۱۴/۴ درصد) و پرکسید هیدروژن (۱۳/۶ درصد) بدست آمد ($P < 0.01$). میزان الیاف نامحلول در شوینده خنثی با اعمال فرآوری قلیایی در تمام تیمارها (به جز اوره و پرکسید هیدروژن) کاهش و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی به مقدار ناچیزی افزایش یافت ($P < 0.01$). کاهش الیاف نامحلول در شوینده خنثی کاه به ترتیب با افزایش قدرت قلیایی یعنی اوره، آمونیاک، هیدروکسید کلسیم و سود (۳ تا ۹ درصد) بیشتر بود ($P < 0.01$). بیشترین کاهش الیاف (از ۶۸/۰ به ۵۵/۳ درصد) توسط تیمار با اسید سولفوریک حاصل شد و پرکسید هیدروژن تأثیری بر غلظت الیاف نامحلول در شوینده خنثی (۶۶/۸ درصد) نداشت ($P > 0.05$). میزان سلولز با فرآوری‌های شیمیایی از نظر

درصد در دستگاه گرمخانه دیزی-۲ (Daisy^{II} incubator, Fairport, USA) پس از ۳ ساعت تعیین شد. همی سلولز و سلولز از تفاوت بخش‌های الیاف حاصل شوینده خنثی، اسیدی و لیگنین بدست آمدند. محتوای سیلیکای نمونه‌های کاه پس از هضم با اتوکلاو با روش کالریتری تعیین شدند (Ghasemi و همکاران، ۲۰۱۳a).

جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۵۰ نانومتر سنجیده شد (UV2100-VIS Spectrophotometer). از سیلیکای خالص (SiO_2) به عنوان معیار استفاده شد. برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولیک، مقدار ۲۵۰ میلی گرم نمونه در لوله فالکون ۵۰ میلی لیتری ریخته و ۴۵ میلی لیتر بافر سدیم-پتاسیم (pH=۷) به آن اضافه شد. نمونه‌ها سپس در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه شیکردار گذاشته شدند. پس از اتمام گرمخانه گذاری، لوله‌های فالکون در ۳۰۰۰ (دور/دقیقه) به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و ۱ میلی لیتر از محلول رویی با ۲۰ میلی لیتر آب یون زدای شده رقیق و میزان جذب بطور مستقیم در طول موج ۲۸۰ نانومتر با دستگاه ماورابنفش-فتومتر (GeneRay, Biometra, Germany) خوانده شد (Ghasemi و همکاران، ۲۰۱۳ a). جذب باندهای مادون قرمز فوریر (FTIR) اجزای دیواره سلولی شامل سلولز، همی سلولز و لیگنین با استفاده از دستگاه FTIR (Bruker Tensor 27) اندازه‌گیری شد. بدین منظور، الیاف حاصل در شوینده خنثی (دیواره سلولی) بصورت کاملاً نرم کوبیده شد و بر سطح الماس به شکل قرص درآمد و در طیف مادون قرمز بین ۶۰۰ تا ۴۰۰۰ cm^{-1} با وضوح $2\ cm^{-1}$ اندازه‌گیری شد (Ghasemi و همکاران، ۲۰۱۳b). برای تعیین تجزیه پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و ترکیبات الیافی (الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی، سلولز و همی سلولز)، مقدار ۰/۵ گرم نمونه در کیسه‌های F57 (Ankom Co., Fairport, USA; 25 μ m pore size.) ریخته شد. سپس این کیسه‌ها در کیسه توری مانند بزرگ (ابعاد ۵۰×۵۰ سانتیمتر و منافذ با قطر ۲ میلی متر) قرار داده و در شکمبه ۲ گاو غیرشیرده به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. گاوها با یک جیره کاملاً مخلوط

بود ($P > 0/05$). تجزیه‌پذیری همی سلولز (۱۸/۷ درصد) با فرآوری پرکسید هیدروژن نسبت به ترکیبات الیافی و ماده خشک به شدت بیشتری کاهش یافت ($P < 0/01$). بیشترین تجزیه‌پذیری ترکیبات الیافی با فرآوری سود (۳۷/۲ درصد برای الیاف نامحلول در شوینده خنثی) و آمونیاک مشاهده شد ($P < 0/01$). اگرچه آمونیاک تأثیر کمتری بر تجزیه‌پذیری ماده خشک (۴۱/۷ درصد) نسبت به فرآوری سود داشت ولی از نظر افزایش تجزیه‌پذیری همی سلولزی (۳۷/۲ درصد) تأثیر مشابهی داشت. با وجود تجزیه‌پذیری بسیار بالاتر ماده خشک علوفه یونجه، تجزیه‌پذیری بخش الیاف نامحلول در شوینده خنثی (۲۴/۹ درصد) و به خصوص همی سلولز (۱۶/۲ درصد) آن حتی از کاه برنج بدون فرآوری هم کمتر بود. طیف جذبی مادون قرمز برنج بدون فرآوری، کاه فرآوری شده و علوفه یونجه در شکل ۱ نشان داده شده است. پیک جذب 3335 cm^{-1} (مربوط به پیوندهای هیدروژنی بین و داخل میکروفیبریل سلولز) برای علوفه یونجه، کاه بدون فرآوری و فرآوری شده با اوره، آمونیاک، هیدروکسید کلسیم، سود، اسید سولفوریک و پرکسید هیدروژن به ترتیب ۰/۰۱۵۷، ۰/۰۱۴۵، ۰/۰۱۴۱، ۰/۰۱۵۴، ۰/۰۱۱۴ و ۰/۰۱۷۶ بود که نشان دهنده افزایش پیوندهای هیدروژنی در اثر فرآوری با پرکسید هیدروژن و کاهش با تیمار اسیدی بود. پیک جذبی در cm^{-1} ۱۷۲۸ حاصل پیوندهای گروه کربونیلی می‌باشد که در دیواره سلولی مربوط به گروه‌های عاملی استیل، یورونیک (بین زایلان و لیگنین) و اسیدهای فرولیک و پی-کوماریک موجود در همی-سلولز و لیگنین دیواره سلولی می‌باشد که نقش مهمی در ارتباط و اتصال عرضی بین همی سلولز و لیگنین و پیچیدگی دیواره سلولی دارد. نسبت این باند جذبی برای یونجه، کاه برنج بدون فرآوری و فرآوری شده با اوره، آمونیاک، هیدروکسید کلسیم، سود، پرکسید هیدروژن قلیایی، اسید سولفوریک و پرکسید هیدروژن به ترتیب ۰/۰۱۵۹، ۰/۰۰۸۹، ۰/۰۰۹۴، ۰/۰۰۸۸، ۰/۰۰۸۶، ۰/۰۰۸۳، ۰/۰۰۷۵ و ۰/۰۱۱۵ بود. فرآوری با اسید باعث کاهش این باند جذبی به مقدار بیشتری نسبت به سایر فرآوری‌ها شد. این باند جذبی در فرآوری با پرکسید هیدروژن افزایش یافت.

مقدار عددی کمی افزایش یافت ولی همی سلولز به شدت با قلیا و به خصوص با تیمار اسیدی کاهش یافت ($P < 0/01$). نسبت سلولز به همی سلولز در یونجه نزدیک دو برابر کاه برنج بود (۲/۳ در مقایسه با ۱/۲). لیگنین هسته‌ای (لیگنین نامحلول در شوینده‌ی اسیدی) در علوفه یونجه نیز ۲ برابر کاه برنج بود (۸/۵ در مقایسه با ۴/۲۶ درصد). کمترین مقدار لیگنین از نظر عددی برای تیمار اکسند (پرکسید هیدروژن) نسبت به کاه فرآوری نشده مشاهده شد (۳/۹۳ در مقایسه با ۴/۲۶ درصد $P > 0/05$). محلولیت سیلیکا تحت تأثیر اوره و پرکسید هیدروژن قرار نگرفت ($P > 0/05$) ولی در کاه‌های فرآوری شده با دیگر قلیاها و تیمار اسیدی کاهش یافت. اعمال فرآوری آمونیاک نسبت به بقیه قلیاها، ترکیبات فنولی (مونومر) بیشتری از دیواره سلولی را آزاد کرد (از ۱۰/۲ به ۲۲/۳ گرم در کیلوگرم ماده خشک کاه، $P < 0/01$). مقدار آزاد شدن ترکیبات فنولی در فرآوری با هیدروکسید کلسیم و اوره تقریباً مشابه بود ($P > 0/05$). اسید و پرکسید هیدروژن به ترتیب بیشترین (۲۵/۲ گرم به ازای کیلوگرم کاه) و کمترین (۱۲/۹ گرم به ازای کیلوگرم کاه) تأثیر را بر آزاد شدن ترکیبات فنولی داشتند ($P < 0/01$). بیشترین میزان تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک به ترتیب با فرآوری سود (۴۵/۴ درصد)، آمونیاک (۴۱/۷ درصد)، اسید (۴۰/۴ درصد) و هیدروکسید کلسیم (۴۰/۲ درصد) بدست آمد (جدول ۲). اوره تأثیری بر بهبود روند تجزیه‌پذیری ماده خشک (از ۳۲/۷ به ۳۴/۱ درصد، $P > 0/05$) و یا ترکیبات الیافی نداشت و در تیمار پرکسید هیدروژن (۲۹/۴ درصد) تمایل به کاهش تجزیه‌پذیری ماده خشک وجود داشت ($P > 0/05$). تجزیه‌پذیری علوفه یونجه (۵۳/۲ درصد) به طور قابل توجهی بالاتر از کاه بدون فرآوری یا فرآوری شده بود ($P < 0/01$). مقدار کاهش یا افزایش تجزیه‌پذیری الیاف مشابه با روند تجزیه‌پذیری ماده خشک نبود. با فرآوری اسیدی، تجزیه‌پذیری الیاف نامحلول در شوینده خنثی (از ۲۶ به ۲۲/۳ درصد) تمایل به کاهش و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (از ۲۵/۵ به ۲۰/۸ درصد، $P < 0/01$) به شدت کاهش یافت. تجزیه‌پذیری همی سلولز (۲۶/۷ درصد) و سلولز (۲۵/۷ درصد) در فرآوری اسیدی مشابه کاه بدون فرآوری

هیدروژن افزایش (۱/۴۰)، در سایر فرآوری‌ها تقریباً بدون تغییر و در علوفه یونجه بالا (۱/۴۰) بود.

بلوریت کل با نسبت باند جذبی ۱۳۶۷ به ۲۹۲۲ سنجیده می‌شود، این شاخص در کاه برنج بدون فرآوری مقدار ۱/۲۷، با پرکسید

جدول ۱: خصوصیات شیمیایی و ترکیبات مغذی کاه برنج فرآوری شده با تیمارهای قلیا، اسید و اکسنده و مقایسه آن‌ها با علوفه یونجه

p-value	خطای معیار	علوفه یونجه	تیمار [*] (کاه برنج)							شاهد	
			اکسنده	اسید	سود	آهک	آمونیاک	اوره	آهک		
-	-	-	۷/۱۳	۲/۳۹	۱۱/۶۳	۱۱/۶	-	۷/۴۱	۷/۲۸	۱ ^{**}	
-	-	-	۶/۳۹	۲/۳۵	۸/۷۵	۸/۱۳	۹/۱	۸/۶۸	-	pH _۲	
>۰/۰۱	۰/۱۳	۲۶/۶ ^a	۱۳/۶ ^f	۲۲/۴ ^b	۲۰/۴ ^c	۱۴/۴ ^e	۱۶/۵ ^d	۱۶/۱ ^d	۱۳/۸ ^f	محلولیت، %	
>۰/۰۱	۰/۶۹	۴۶/۶ ^f	۶۶/۸ ^{ab}	۵۵/۳ ^e	۶۱/۹ ^d	۶۲/۶ ^d	۶۴/۹ ^c	۶۶/۰ ^{bc}	۶۸/۰ ^a	ان-دی-اف، %	
>۰/۰۱	۰/۴۶	۳۴/۷ ^d	۴۱/۵ ^{ab}	۴۰/۸ ^{bc}	۴۱/۶ ^{ab}	۴۲/۰ ^{ab}	۴۱/۶ ^{ab}	۴۲/۲ ^a	۳۹/۹ ^c	ای-دی-اف، %	
>۰/۰۱	۰/۶۶	۲۶/۲ ^d	۳۷/۶ ^{ab}	۳۶/۴ ^{bc}	۳۷/۲ ^{ab}	۳۷/۶ ^{ab}	۳۷/۳ ^{ab}	۳۸/۰ ^a	۳۵/۶ ^c	سلولز، %	
>۰/۰۱	۰/۸۱	۱۱/۹ ^f	۲۵/۴ ^b	۱۴/۶ ^e	۲۰/۳ ^d	۲۰/۷ ^d	۲۳/۳ ^c	۲۳/۹ ^{bc}	۲۸/۱ ^a	همی سلولز، %	
>۰/۰۱	۰/۴۲	۸/۵ ^a	۳/۹ ^{۳b}	۴/۳ ^{۷b}	۴/۳ ^{۳b}	۴/۳ ^{۷b}	۴/۳ ^{۰b}	۴/۱ ^{۳b}	۴/۲ ^{۶b}	لیگنین، %	
>۰/۰۱	۰/۰۰۵	-	۵/۳ ^{۳a}	۴/۶ ^{۸b}	۴/۸ ^{۲b}	۴/۷ ^{۶b}	۴/۷ ^{۷b}	۵/۲ ^{۶a}	۵/۳ ^{۲a}	سیلیکا، %	
>۰/۰۱	۰/۰۹	۱۷/۲ ^d	۱۲/۹ ^g	۲۵/۲ ^a	۲۱/۲ ^c	۱۶/۴ ^e	۲۲/۳ ^b	۱۵/۲ ^f	۱۰/۲ ^h	ترکیبات فنولی	

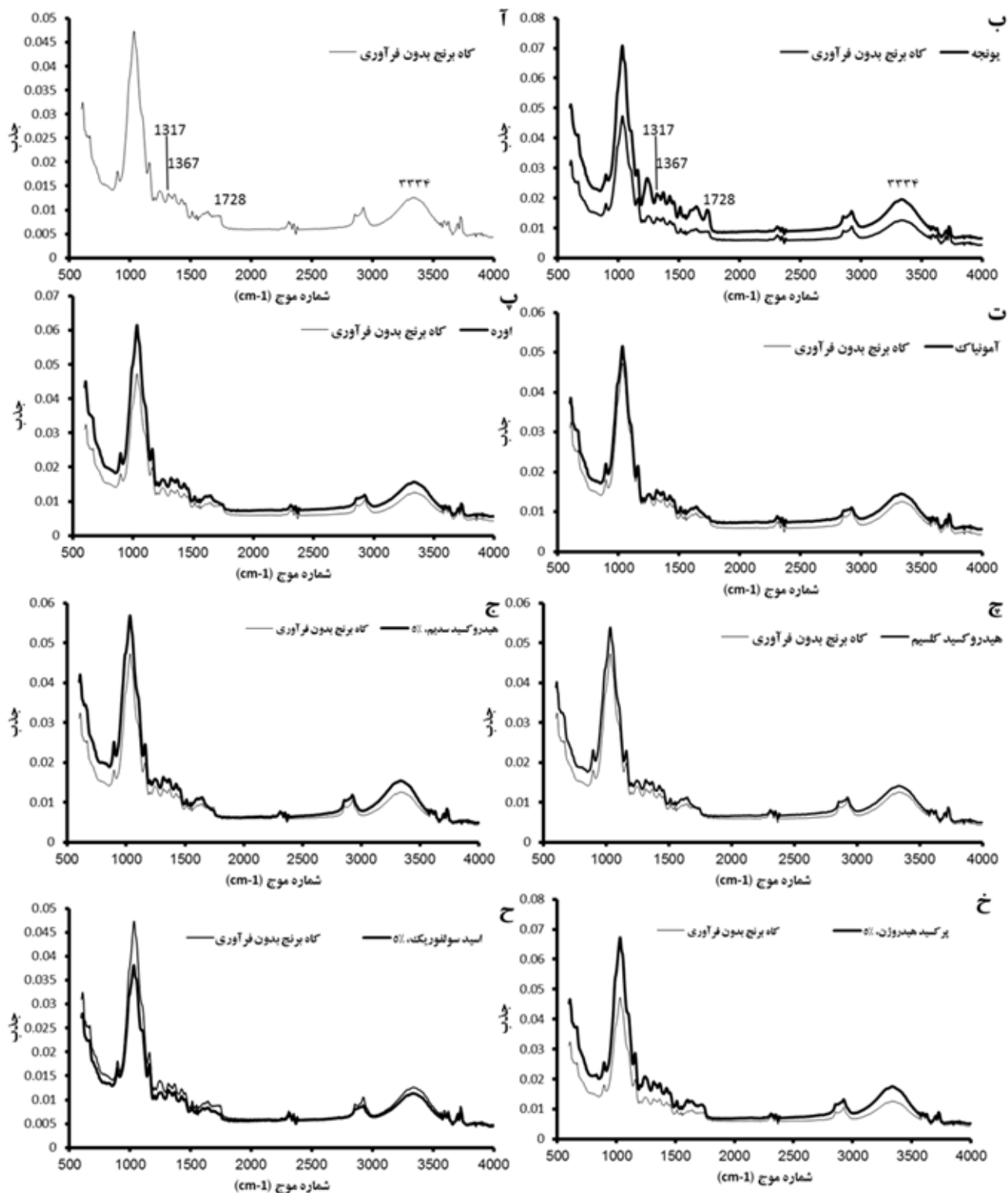
^{*} شاهد (کاه بدون فرآوری)، اوره: ۵٪، آمونیاک: ۳/۵٪، آهک آبدیده (هیدروکسید کلسیم): ۴٪، هیدروکسید سدیم: ۵٪، اسید سولفوریک: ۵٪، اکسنده: پرکسید هیدروژن ۵٪، یونجه (شاهد مثبت). ^{**} pH: pH بعد از فرآوری شیمیایی، pH بعد از باز شدن سیلو، ان-دی-اف: الیاف نامحلول در شوینده خنثی، ای-دی-اف: الیاف نامحلول در شوینده اسیدی، پی-سی: ترکیبات فنولی (گرم در کیلوگرم کاه).
حروف مختلف بین اعداد نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p > 0.01$) در یک ردیف می‌باشد.

جدول ۲: تجزیه پذیری شکمبه‌ای (۲۴ ساعت) کاه برنج فرآوری شده با تیمارهای قلیا، اسید و اکسنده و مقایسه آن‌ها با علوفه یونجه

p-value	خطای معیار	علوفه یونجه	تیمار [*] (کاه برنج)							تجزیه پذیری %	
			اکسنده	اسید	سود	آهک	آمونیاک	اوره	آهک		
>۰/۰۱	۲/۰۶	۵۳/۲ ^a	۲۹/۴ ^e	۴۰/۴ ^c	۴۵/۴ ^b	۴۰/۲ ^c	۴۱/۷ ^c	۳۴/۱ ^d	۳۲/۷ ^{de}	ماده خشک	
>۰/۰۱	۴/۲۶	۲۴/۹ ^c	۲۱/۹ ^c	۲۲/۳ ^c	۳۷/۲ ^a	۳۰/۵ ^b	۳۵/۴ ^a	۲۳/۱ ^c	۲۶/۰ ^{bc}	ان-دی-اف	
>۰/۰۱	۲/۹۱	۲۶/۹ ^b	۲۳/۸ ^{bc}	۲۰/۸ ^c	۳۶/۵ ^a	۳۲/۷ ^a	۳۴/۴ ^a	۲۳/۳ ^{bc}	۲۵/۵ ^b	ای-دی-اف	
>۰/۰۱	۵/۰۹	۳۴/۶ ^b	۲۶/۱ ^c	۲۵/۷ ^c	۴۱/۷ ^a	۳۶/۸ ^{ab}	۳۸/۲ ^{ab}	۲۷/۰ ^c	۲۷/۷ ^c	سلولز	
>۰/۰۱	۴/۰۳	۱۶/۲ ^d	۱۸/۷ ^{cd}	۲۶/۷ ^b	۳۸/۵ ^a	۲۵/۹ ^b	۳۷/۲ ^a	۲۲/۸ ^{bc}	۲۶/۷ ^b	همی سلولز	

^{*} شاهد (کاه بدون فرآوری)، اوره: ۵٪، آمونیاک: ۳/۵٪، آهک آبدیده (هیدروکسید کلسیم): ۴٪، هیدروکسید سدیم: ۵٪، اسید سولفوریک: ۵٪، اکسنده: پرکسید هیدروژن ۵٪، یونجه (شاهد مثبت).

حروف مختلف بین اعداد نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p < 0.01$) در یک ردیف می‌باشد.



شکل ۱: طیف جذبی مادون قرمز ترکیبات دیواره ی سلولی یونجه، کاه برنج بدون فرآوری و فرآوری شده با مواد شیمیایی (اسید، قلیا، اکسند و آمونیاک)

بحث

سلولی یونجه حتی از کاه بدون فرآوری پائین تر است. مطابق این نتایج Pinos-Rodriguez و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که هضم الیاف گراس‌ها بهتر از الیاف علوفه لگوم‌ها می‌باشد. کاه فرآوری شده با اوره تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای مشابهی نسبت به تیمار شاهد داشت. برخلاف این نتایج، زاهدی فر و همکاران (۱۳۹۲) تجزیه‌پذیری متفاوتی بین کلش فرآوری‌نشده و فرآوری‌شده با اوره مشاهده نمودند ولی مصرف خوراک و افزایش وزن بین دو گروه گوساله پرواری یکسان بود. در مطالعه تنها و همکاران (۱۳۸۹) تفاوتی بین قابلیت هضم ظاهری کاه گندم فرآوری‌نشده و فرآوری‌شده با اوره مشاهده نشد همچنین در تحقیق حسنی و همکاران (۱۳۷۷) کاه فرآوری‌شده با اوره در جیره گوساله‌های نر سرابی به مدت ۱۴۰ روز مصرف شد ولی افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل غذایی تحت تاثیر تیمارهای آنها قرار نگرفت. فرآوری با اسید سولفوریک با وجود کاهش لیگنین، سیلیکا، افزایش آزاد شدن ترکیبات فنولی از دیواره سلولی و محلولیت ماده‌ی خشک و کاهش پیوندهای هیدروژنی و استری، باعث کاهش معنی‌داری در تجزیه‌پذیری بخش الیافی کاه برنج شد. در رابطه با کاهش تجزیه‌پذیری الیاف به نظر می‌رسد علت خارجی یا عاملی بعد از این مراحل، در کاهش تجزیه‌پذیری دخالت داشته باشد. کاهش pH کاه فرآوری‌شده با اسید ۵ درصد (pH ۲/۳۵) احتمالاً نقش ممانعت‌کننده از کلنی‌شدن و فعالیت باکتری‌های سلولولیتیک داشته باشد. برخی محققان (Mourino و همکاران، ۲۰۰۱) نشان دادند که تحت شرایط محدودیت سوبسترا، ثابت نرخ تجزیه‌پذیری سلولز، تابع خطی از pH آغازین تجزیه‌پذیری است. کاهش pH با ممانعت از کلنی‌شدن سلولولیتیک‌ها تجزیه‌پذیری سلولز را کاهش می‌دهد (Sung و همکاران، ۲۰۰۷). فعالیت باکتری‌های سلولولیتیک شکمبه در pH ۶/۲ کاهش و در pH پائین‌تر متوقف می‌شود (Van Soest، ۱۹۹۴). دلیل بالا بودن تجزیه‌پذیری ماده خشک کاه برنج با اسید، به اثر حل شدن آن با اسید برمی‌گردد زیرا تیمار اسید سولفوریک سبب حداکثر محلولیت ماده خشک کاه برنج شد. لذا بالا بودن تجزیه‌پذیری

کاه برنج جمع‌آوری شده حاوی الیاف شوینده خنثی، الیاف شوینده اسیدی، لیگنین، خاکستر و سیلیکای تقریباً کمی بود. ولی اعداد مشاهده شده مشابه با کاه‌های مناطق آسیای جنوب شرق و اروپا بودند (Agbagla-Dohnani و همکاران، ۲۰۰۱؛ Vadivelloo and Phang، ۱۹۹۶). اتصالات همی‌سلولز هم به قلیا و هم اسید حساس بوده و شکسته می‌شوند، در حالی که سیلیکا، کوتین و واکس‌های سطحی، تحت شرایط قلیایی و تا حدی توسط محلول شوینده خنثی حل می‌شوند (Van Soest، ۱۹۹۴). گروه‌های کربوکسیلیک و استیل و پیوندهای (۳-۱) گلیکوسیدی در نواحی شاخه‌دار همی‌سلولز توسط قلیا شکسته می‌شوند. به طور مشابه، اسیدهای هیدروکسی سینامیک (اسید فرولیک و پی-کوماریک) با پیوند استری (آرابینوزایلان و لیگنین) علوفه‌های گرامینه با صابونی شدن قلیایی شکسته می‌شوند (Van Soest، ۱۹۹۴). انجام چنین واکنش‌های شیمیایی بین گروه‌های عامل دیواره‌ی سلولی کاه و مواد فرآوری، احتمالاً سبب کاهش pH طی سیلو سازی کاه فرآوری‌شده با قلیا می‌باشند. مطالعات بیشتری جهت تعیین فرآیند و کیفیت تخمیر سیلوی کاه فرآوری‌شده با قلیا مورد نیاز است. تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک بیشتری برای علوفه یونجه نسبت به فرآوری‌های شیمیایی مشاهده شد. بخش بیشتر این تجزیه‌پذیری مربوط به محلولیت بیشتر ماده خشک یونجه می‌باشد. با این وجود، تجزیه‌پذیری بخش الیافی یونجه به خصوص بخش همی‌سلولزی به شدت پائین‌تر از کاه برنج (حتی بدون فرآوری) بود. تجزیه‌پذیری سلولز یونجه از کاه بدون فرآوری بالاتر و از کاه فرآوری‌شده با آمونیاک، هیدروکسید کلسیم و سود کمتر بود. شدت جذب باندهای حاصل از پیوندهای هیدروژنی، بلوریت سلولز و پیوندهای استری در دیواره سلولی علوفه یونجه به مراتب بالاتر از کاه بود و این مشاهده با درصد تجزیه‌پذیری پائین‌تر دیواره‌ی سلولی علوفه یونجه نسبت به کاه موافق است. در حقیقت تجزیه‌پذیری بیشتر یا کیفیت بالاتر علوفه یونجه نسبت به کاه به خاطر محتوای داخل سلولی یا محلولیت ماده‌ی خشک بالاتر است و گرنه کیفیت دیواره

سلولزی بوده و با تورم، افزایش سطح فراهم و کاهش بلوریت سبب افزایش دسترسی آنزیم‌های میکروبی به پلیمر سلولز می‌شود (Nieves و همکاران ۲۰۱۱).

نتیجه‌گیری

فرآوری با اوره کاربرد بیشتری نسبت به سایر فرآوری‌ها به علت فراهمی این ماده شیمیایی، سهولت کار و اثر غنی‌سازی با نیتروژن دارد. هرچند در این مطالعه، اوره تأثیری قابل توجهی بر تغییر خواص شیمیایی و یا بهبود تجزیه‌پذیری کاه برنج نداشت. آمونیاک تأثیر قابل توجهی بر تجزیه‌پذیری بخش الیافی کاه داشت. این فرآوری نیز به آسانی می‌تواند در سطح مزرعه برای فرآوری کاه به کار رود. تیمار قلیایی کاه با سود و سیلوسازی آن علاوه بر سیلیکازدایی و حلالیت ترکیبات فنولی بیشتر، بیشترین بهبود هضم شکمبه‌ای را به همراه داشت. همچنین به علت کاهش قابل ملاحظه pH قلیایی کاه فرآوری شده با سود با فرآیند سیلو نمودن، نگرانی در این بابت مرتفع می‌شود.

پاورقی

Neutral detergent fiber
Acid detergent fiber
Acid detergent lignin
Fourier transform infrared spectroscopy
FIBEX

منابع

- آمارنامه کشاورزی محصولات زراعی سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰. (۱۳۹۲). جلد اول، تهران، وزارت جهادکشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. <http://www.maj.ir>
- تنها، ت.، زاهدی فر، م. و محجوبی، الف. (۱۳۸۹). اثر نوع عمل آوری کاه گندم بر تجزیه‌پذیری و قابلیت هضم جیره و عملکرد گوساله‌های نر هلشتاین. پژوهش و سازندگی، ۸۶: ۵۷-۶۵.
- حسینی، الف. ر.، بنی فاطمه م. ب. و خسرو شاهی. ح. ظ. (۱۳۷۷). تعیین انرژی قابل هضم کاه و کاه آمونیاکی و استفاده از آن در تغذیه گوساله‌های نر سرابی. گزارش‌های طرح تحقیقاتی. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی.
- زاهدی فر، م.، فضائی، ح.، عباسی، الف.، علیوردی نسب، ر.، اسد

درون کیسه‌ای با فرآوری اسیدی، به عمل تجزیه‌گری میکروب-های شکمبه مربوط نیست. بیشترین میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک و سلولز در فرآوری با سود مشاهده شد. تجزیه‌پذیری بخش همی-سلولزی با فرآوری آمونیاک و سود مشابه بود ترکیبات فنولی از طریف پیوندهای استری رابط بین همی سلولز و لیگنین می‌باشند (Wang و همکاران، ۲۰۱۰).

این پیوندهای استری از نوع اسید فرولیک و پی-کوماریک نقطه نشستن لیگنین ساخته شده بر دیواره سلولی می‌باشند یعنی این گروه‌ها از یک طرف با همی سلولز متصل بوده و از طرف دیگر به صورت عرضی با لیگنین پیوند می‌دهند. وجود این پیوندها از دیرباز شناخته شده است (Van Soest، ۲۰۰۶). آزاد شدن این ترکیبات در فرآوری‌های آمونیاک و سود تقریباً از نظر مقدار مشابه بود. در همین راستا، این دو فرآوری به میزان یکسانی تجزیه‌پذیری همی سلولز را افزایش دادند. آمونیاک بیشتر یا تنها تأثیر خود را بر این پیوندها (پیوندهای استری $O=C-OOH$) گذاشت. Weimer و همکاران (۲۰۰۳) با ثبت روش فیکس ۵، کاه برنج را به رطوبت ۵۰ درصد رسانده و سپس تحت فشار و آمونیاک به مدت ۱۰-۵ دقیقه حرارت داده و در نهایت با آزاد شدن فشار، الیاف از هم پاشیده می‌شدند. سپس کاه فرآوری شده خشک شد و با جایگزینی به میزان ۷٪ در جیره گاوهای شیرده، تولید شیر و بازده خوراک بهبود یافت. این روش به امکانات و دستگاه خاص نیاز داشته و کاربرد آن در سطح مزرعه بعید است. همانطور که مشاهده شد، تجزیه‌پذیری همی سلولز به مقدار بیشتری نسبت به سلولز در اثر فرآوری با پرکسید هیدروژن کاهش یافت. دلیل این کاهش می‌تواند به خاطر تبدیل گروه‌های عامل دیگر (مثل گروه‌های اتری) موجود در دیواره سلولی به حالت استری در اثر عمل اکسیداسیون باشد. شکست این اتصالات عرضی می‌تواند سبب افزایش محلولیت همی سلولز و لیگنین و آزاد شدن سلولز گردد (Wang و همکاران، ۲۰۱۰). فرآوری با سود، علاوه بر شکستن این پیوندها، سبب سیلیکازدایی بیشتری نیز شد و تجزیه-پذیری الیاف بیشتری به خصوص بخش سلولزی را به همراه داشت. سدیم موجود در سود قادر به نفوذ در میکروفیبریل‌های

- treated rice straw on the performance of crossbred cows. *Animal Feed Science and Technology*, Vol, 73, pp: 347-352.
- 14) Reeves, J.B. (1985). Lignin composition of chemically treated feeds as determined by nitrobenzene oxidation and its relationship to digestibility. *Journal of Dairy Science*, Vol, 68, pp: 1976-1983.
 - 15) Sarnklong, C., Cone, J.W., Pellikaan, W. and Hendriks, W.H. (2010). Utilization of rice straw and different treatments to improve its feed value for ruminants: A review, *Asian-Australian Journal of Animal Science*, Vol, 23, pp: 680 – 692.
 - 16) SAS® (2001). User's Guide: Statistics, Version 8.1 Edition, SAS. Inst., Inc., Cary, NC.
 - 17) Sung, H.G., Kobayashi, Y., Chang, J. H. A., Hwang, H. and Ha, J.K. (2007). Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, Vol, 20, pp: 200-207.
 - 18) Taherzadeh, M. J. and Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve in ethanol and biogas production. A review, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol, 8, pp: 1-30.
 - 19) Vadiveloo, J. and Phang, O. C. (1996). Differences in the nutritive value of two rice straw varieties as influenced by season and location. *Animal Feed Science and Technology*, Vol, 61, pp: 347-352.
 - 20) Van Soest, P.J. (1994). Nutritional Ecology of the Ruminant, second ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.
 - 21) Van Soest, P.J. (2006). Rice straw, the role of silica and treatments to improve quality, *Animal Feed Science and Technology*, 130, 137-171.
 - 22) Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition, *Journal of Dairy Science*, Vol, 74, pp: 3583-3592.
 - 23) Wang B., Wang, X. and Feng, H. (2010). Deconstructing recalcitrant Miscanthus with alkaline peroxide and electrolyzed water. *Bioresource Technology*, Vol, 101, pp: 752-760.
 - 24) Weimer, P. J., Mertens, D. R., Ponnampalam, E., Severin, B. F. and Dale, B. E. (2003). FIBEX-treated rice straw as a feed ingredient for lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, Vol, 103, pp: 41-50.
 - زاده، ن.، رضایی، م. و تیمور نژاد، ن. (۱۳۹۲). استفاده از کلش گندم عمل آوری شده با اوره در بلوک‌های خوراک کامل و اثر آن بر عملکرد گوساله‌های نر پرواری. پژوهش و سازندگی، ۱۰۰: ۶۱-۵۳.
 - 5) Agbagla-Dohnani, A., Noziere, P., Gaillard-Martinie, B., Puard, M. and Doreau, M. (2003). Effect of silica content on rice straw ruminal degradation. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, Vol, 140, pp: 183-192.
 - 6) De Castro, F.B. (1994). The use of steam treatment to upgrade lignocellulosic materials for animal feed. PhD thesis. University of Aberdeen.
 - 7) Ghasemi, E., Ghorbani, G. R., Khorvash, M., Emami, M. R. and Karimi, K. (2013a). Chemical composition, cell wall features, and degradability of stem, leaf blade, and sheath in untreated and alkali-treated rice straw. *Animal (Cambridge)*, Vol, 7, pp: 1106-1112.
 - 8) Ghasemi, E., Khorvash, M., Ghorbani, G. R., Emami, M. R. and Karimi, K. (2013b). Dry chemical processing and ensiling of rice straw to improve its quality for use as ruminant feed. *Tropical Animal Health and Production*, Vol, 45, pp: 1215-1221.
 - 9) Ghasemi, E., Ghorbani, G. R., Khorvash, M. Omidi, H. and Emami, M. R. (2014). Adjustment of pH and enzymatic treatment of barley straw by dry processing method. *Journal of Applied Animal Research*, doi:10.1080/09712119.2013.875908.
 - 10) Mourino, F., Akkarawongsa, R. and Weimer, P. J. (2001). Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science*, Vol, 84, pp: 848-859.
 - 11) Nieves, D.C., Karimi, K. and Horváth, I.S. (2011). Improvement of biogas production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB). *Industrial Crop Products*, Vol, 34, pp: 1097-1101.
 - 12) Pinos-Rodriguez, J.M., Gonzalez, S.S., Mendoza, G.D., Barcena, R., Cobos, M.A., Hernandez, A. and Ortega, M.E. (2002). Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *Journal of Animal Science*, Vol, 80, pp:3016-3020.
 - 13) Prasad, R.D.D., Reddy, M.R. and Reddy G.V.N. (1998). Effect of feeding baled and stacked urea