

Effet de la supplémentation en enzymes fibrolytiques exogènes sur la cinétique de production de gaz *in vitro* d'une paille d'avoine traitée ou non par voie chimique



IABC 2015
International
TUNISIA

J. JABRI*, H. YAICH, K. ABID, A. MALEK, J. REKHIS, M. KAMOUN

École Nationale de Médecine Vétérinaire, Service d'alimentation et de nutrition animale : Sidi Thabet – Tunis, Tunisie.

* Auteur correspondant: jabrijihene@gmail.com

Abstract-For ruminants, the effect of supplementation with exogenous fibrolytic enzymes on digestibility of by-products, like straws, remains poorly studied. Then the *in vitro* gas production technique was used to evaluate the effect of a combination of different chemical pretreatments and exogenous fibrolytic enzymes (EFE) on fermentative characteristics and digestibility of oat straw. To enhance its protein content, this straw was submitted to three different types of chemical pretreatments. These were carried out successively with NH₃, urea and sodium hydroxide.

For supplementation, an enzymatic complex consisting of a mixture of cellulase and xylanase (1:1, v/v) was used in a dose of 0.6 mg / g DM. The analyzing of a factorial design (4 × 2) showed that most combinations between chemical pretreatments and EFE have no significant effect on the parameters of the gas production kinetics. However, only the pre-treatment combined the sodium hydroxide with EFE improves significantly the maximum rate of fermentation. This passes from 1.54 to 3.21ml / h respectively for the control straw and treated straw with sodium hydroxide and EFE. On the other hand, pretreatment with NH₃ and urea or not combined with EFE improve the digestibility of the organic matter and the energy value of the straw studied. However, these two pre-treatments, combined or not with EFE, have the same effect. Therefore, it can be confirmed that the effect of chemical pretreatment dominates that EFE supplementation. So, we can conclude that the supplementation with EFE combined with NH₃ or urea pre-treatment improves the maximum rate of fermentation and the digestibility of the studied oat straw.

Keywords: cellulase, chemical pretreatment, gas production, xylanase

Résumé - Chez les ruminants, l'effet de la supplémentation en enzymes fibrolytiques exogènes sur l'utilisation digestive des sous-produits agro-alimentaires, notamment les pailles, reste mal étudié. La technique de production de gaz *in vitro* a été utilisée pour examiner l'effet d'une combinaison entre différents prétraitements chimiques et des enzymes fibrolytiques exogènes (EFE) sur les caractéristiques fermentaires et l'utilisation digestive de la paille d'avoine. Afin d'améliorer sa valeur protéique en particulier, cette paille témoin a été soumise à trois types de prétraitements chimiques différents. Ces derniers ont été réalisés successivement avec l'NH₃, l'urée et la soude.

Pour la supplémentation, un complexe enzymatique constitué d'un mélange de cellulase et de xylanase (1:1, v/v) a été utilisé suivant une dose de 0.6 mg/g MS. L'analyse d'un modèle factoriel (4×2) a montré que la plupart des combinaisons entre les prétraitements chimiques et les EFE n'ont pas d'effet significatif sur les paramètres de la cinétique de production de gaz. Cependant, seul le prétraitement à la soude combiné aux EFE améliore significativement la vitesse maximale de fermentation. Celle-ci passe de 1.54 à 3.21ml / h respectivement pour la paille témoin et la paille traitée par la soude et les EFE. D'autre part, les prétraitements à l'NH₃ et à l'urée combinés ou non avec les EFE améliorent d'une manière hautement significative la digestibilité de la matière organique et la valeur énergétique de la paille étudiée. Cependant, ces deux prétraitements, combinés ou non avec les EFE, présentent le même effet. Par conséquent, on confirmerait que l'effet du prétraitement chimique domine celui de la supplémentation en EFE. On peut conclure que la supplémentation en EFE combinée avec un prétraitement à l'NH₃ ou à l'urée améliore la vitesse maximale de la fermentation et l'utilisation digestive de la paille d'avoine étudiée.

Mots clés: cellulase, prétraitement chimique, production de gaz, xylanase



1. Introduction

La paille est un sous-produit de la céréaliculture caractérisé par sa valeur nutritive très limitée. Elle est fréquemment impliquée dans les rations alimentaires des ruminants et particulièrement durant les périodes de déficits fourragers ou de disette. Cependant, sa composition chimique caractérisée par une teneur très élevée en cellulose brute et une teneur très faible en protéines brutes va lui conférer par conséquent une faible digestibilité de matière organique. Dans le milieu ruminal, les micro-organismes produisent des enzymes endogènes qui hydrolysent les fibres alimentaires. Les structures aussi complexes des parois cellulaires peuvent limiter l'ampleur de la digestion par les microorganismes et augmentent le temps de séjour des aliments dans le rumen (Wang et McAllister 2002). Dans ce contexte, plusieurs études ont été menées pour évaluer l'effet de la supplémentation des fourrages par des enzymes fibrolytiques exogènes (EFE) sur leur digestibilité. Ainsiplusieurs études confirment l'effet bénéfique d'une telle supplémentation et ce par une augmentation de la digestibilité de matière sèche mesurée en *in vitro*, *in sacco* et *in vivo* (Feng et al. 1996; Yang et al. 1999), de la vitesse de la digestion ruminale de la fraction NDF (Yang et al. 1999) et de la productivité des animaux (Beauchemin et al. 1995; Rode et al. 1999; Salem et al. 2013). Il faut noter que l'efficacité de cette supplémentation en enzymes fibrolytiques dépend essentiellement de l'interaction spécifique substrat-enzyme (Eun et al. 2006). Toutefois, très peu de recherches ont été menées pour examiner les effets potentiels de la cellulase et de la xylanase sur les pailles. De plus, les effets d'une telle supplémentation enzymatique sur des pailles traitées chimiquement restent présent inconnus. L'objectif de cette étude consiste à déterminer l'effet de la supplémentation en enzymes fibrolytiques exogènes sur l'utilisation digestive d'une paille d'avoine non traitée et traitée chimiquement par l'ammoniac, par l'urée et par la soude tout en utilisant la méthode *in vitro* de Menke et Steingass (1988).

2. Matériel et Méthodes :

• Traitements chimiques et enzymatiques de la paille

Le sous-produit étudié est une paille d'avoine récoltée de la ferme du Centre de Formation Professionnelle Agricole dans le Secteur de l'Élevage Bovin de Sidi Thabet. Quatre échantillons de 2 kg de paille chacun, ont été prélevés au hasard du stock de la ferme et puis coupés à une longueur de 5 cm. Le premier échantillon a été étudié sans aucun traitement pour être pris comme témoin (P_T). Les 3 autres échantillons ont été traités soit par l'ammoniac liquide (P_{NH_3}) avec une dose de 30 g / kg de matière sèche (MS) (suivant la méthode de Sundstol et al. 1978), soit par l'urée (P_{Ur}) avec une dose de 40g / kg de MS, (suivant la méthode de Chermiti et al. 1989) et soit encore par la soude (P_S) avec une dose de 40g / kg de MS (suivant la méthode de Dulphy 1982). Ainsi, chaque échantillon a été subdivisé en deux parties identiques. La première partie représente les échantillons de paille non supplémentés par les EFE, alors que la deuxième partie a été consacrée aux échantillons de paille supplémentés par les EFE. Ces derniers ont été pulvérisées par un complexe enzymatique composé de deux enzymes commerciales qui sont la cellulase plus (ayant une activité en cellulase de 30000 à 36000 unités par g et en β -glucanase de 7500 à 10000 unités par g) et laxylanase plus (ayant une activité en xylanase de 34000 à 41000 unités par g, en β -glucanase de 12000 à 15000 unités par g et en cellulase de 45000 à 55000 unités par g). Ces deux enzymes (Dyadic International, Jupiter, FL, USA) qui sont extraites à partir *Trichoderma longibrachiatum*, ont été mélangées suivant les proportions (1:1/v:v) pour constituer le complexe enzymatique. Ce dernier a été utilisé suivant une concentration de 0.6 mg / g de MS d'échantillon pour avoir les 4 échantillons de paille suivants : P_{T+EFE} , P_{NH_3+EFE} , P_{Ur+EFE} et P_{S+EFE} .

• Analyses chimiques

Pour les échantillons P_T , P_{NH_3} , P_{Ur} et P_S , les différentes teneurs en matière sèche (MS), en matière organique (MO), en matières azotées totales (MAT), en cellulose brute (CB), en extrait éthéré (EE), en matières minérales (MM), en calcium (Ca) et en phosphore (P) ont été déterminées suivant les méthodes décrites et adoptées par les AOAC (1990).

• Incubation *in vitro* : production de gaz dans les seringues :

La méthode *in vitro* décrite par Menke et Steingass (1988) a été utilisée pour étudier la cinétique de production de gaz dans des seringues en verre ayant une capacité de 100 ml. L'inoculum utilisé pour

l'incubation est obtenu à partir du jus de rumen d'une vache de race Brown Swiss équipée d'une canule ruminale. Ayant subi une diète hydrique de 12 heures, cette femelle à l'entretien reçoit deux fois par jour une ration complète composée d'aliment concentré et de foin d'avoine. La collecte de jus du rumen a été réalisée avant le repas du matin par l'intermédiaire d'une pompe manuelle. Une fois filtré, le jus de rumen est mélangé avec la solution tampon de Menke et Steingass (1988) en proportion 1:2 (v/v) pour constituer l'inoculum d'incubation. Les seringues contenant une prise d'essai de 200 mg d'aliment et 30 ml d'inoculum ont été immédiatement fermées par des pinces, agitées et puis placées dans un incubateur à 39°C. Pour chaque seringue, la production de gaz a été enregistrée après 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 et 96 heures d'incubation. Pour chaque point de cinétique, trois répétitions ont été prévues.

• Analyse mathématique et statistique

L'ajustement des cinétiques de la production de gaz dans les seringues a été réalisé suivant le modèle Gompertz proposé par Schofield et al. (1994) et où les différents paramètres ont été estimés par une régression non linéaire des moindres carrés (nls) du logiciel R (3.1.3) (2015) :

$$PG = A \exp \left[-\exp \left(1 + \frac{b * e}{A} (\text{Lag} - t) \right) \right]$$

Avec, PG est la production cumulative de gaz (ml), A est le maximum théorique de production de gaz (ml), b est la vitesse maximale de production de gaz (ml / h) qui se produit au niveau du point d'inflexion de la courbe, e est la constante d'Euler et Lag est le temps de latence (h) avant le début de production de gaz. Ce temps est défini comme le point d'intersection de l'axe des temps et la ligne tangente au point d'inflexion (Zwietering et al. 1990 cité par Schofield 1994).

Les résultats de la PG *in vitro* et les différents paramètres de fermentation ont été analysés statistiquement par un arrangement factoriel 4 × 2 (4 échantillons de paille traités et non traités chimiquement × supplémentés et non supplémentés en EFE) en tant que ;

$$GP_{ijk} = \mu + T_i + S_j + (T_i \times S_j) + e_{ijk}$$

Où, GP_{ijk} est l'observation de la PG observée lorsque le i^{ème} traitement (T_i) est incubé avec le j^{ème} supplémentation; μ est la moyenne générale; T_i (i = 1-4) est l'effet des différents traitements chimiques; S_j est la supplémentation (j = 0-1); S_i × S_j est l'interaction entre les différents traitements chimiques de la paille et la supplémentation et e_{ijk} est l'erreur résiduelle.

La digestibilité de la matière organique (dMO), la teneur en énergie métabolisable (EM) et la teneur en énergie nette lait (ENL) ont été estimées suivant les fonctions spécifiques proposées par Menke et al. (1979; 1988) :

$$dMO_{(g/kg\ MS)} = 148.8 + 8.89 \times PG + 4.5 \times PB_{(\%MS)} + 0.651 \times MM_{(\%MS)}$$

$$EM_{(MJ/kg\ MS)} = 2.20 + 0.13570 \times PG + 0.0057 \times PB_{(g/kg\ MS)} + 0.000286 \times (EE_{(g/kg\ MS)})^2$$

$$ENL_{(MJ/kg\ MS)} = 0.0960 \times PG + 0.0038 \times PB_{(g/kg\ MS)} + 0.000173 \times (EE_{(g/kg\ MS)})^2 + 0.5400$$

Avec :

- PG est la production nette de gaz après 24 h d'incubation (ml/ 200 mg de MS de l'échantillon)
- PB est la teneur en protéines brutes
- MM est la teneur en matières minérales
- EE est l'extrait étheré.

3. Résultats et discussion :

• Composition chimique de paille :

Les différents prétraitements chimiques de la paille d'avoine ont amélioré essentiellement les teneurs en matières azotées totale (tableau 1). En effet, le prétraitement à l'urée (P_{Ur}) donne des teneurs qui dépassent celle de la paille (P_r) de presque 5 fois. Ces résultats concordent avec la plupart des résultats trouvés dans la littérature. Cependant, le taux d'amélioration des teneurs en MAT en particulier, dépend essentiellement des doses des réactifs chimiques utilisés, des degrés d'humidité des pailles, de la durée de conservation et de la température ambiante (Demarquilly et al. 1989).

Tableau1 : Composition chimique de la paille d'avoine témoin (P_T) et traitée par la soude (P_S), par l'ammoniac (P_{NH3}) et par l'urée (P_{Ur})

Échantillons de paille	MS	MM	EE	CB	MAT	P	Ca
P _T	901	65	0,6	390	32	0,205	3.3
P _S	377	109	0,6	410	34	0,11	3.9
P _{NH3}	720	72	1,7	400	67	0,088	1.6
P _{Ur}	788	64	1,1	420	142	0,12	-

MS : teneur en matière sèche (g/kg MS) ; MM : teneur en matières minérales (g/kg MS) ; EE : extrait éthéré (g/kg MS) ; CB : teneur en cellulose brute (g/kg MS) ; MAT : teneur en matières azotées totales (g/ kg MS) ; P : teneur en phosphore (g/kg MS) ; Ca : teneur en calcium (g/kg MS).

• **Production de gaz en *in vitro***

Comme le montrent les résultats du tableau 2, la supplémentation de la paille d'avoine témoin (P_T) et des pailles prétraitées chimiquement avec un complexe d'EFE n'a pas d'effet remarquable sur la production cumulative de gaz durant toute la période d'incubation. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par (Eun et al. 2006) qui indiquent que l'addition d'enzymes fibrolytiques exogènes n'a pas d'effet significatif sur la production de gaz des pailles non traitées et traitées par l'ammoniac.

Tableau 2 : Effet de la supplémentation de la paille d'avoine traitée et non traitée chimiquement en EFE sur la production cumulative de gaz (PG en ml / 200 mg MS).

Echantillons de paille	PG _{2h}	PG _{4h}	PG _{6h}	PG _{8h}	PG _{12h}	PG _{24h}	PG _{48h}	PG _{72h}	PG ₉₆
P _T	0,5	0,75	1 ^{ab}	1,75 ^{ab}	2,5 ^a	2 ^{ab}	6 ^{ab}	15 ^{abc}	21,25 ^{ab}
P _{T+EFE}	1	1,25	1,75 ^a	2 ^a	2,25 ^a	1,5 ^{abc}	4,5 ^{bc}	11,37 ^{bcd}	14,75 ^{bcd}
P _{NH3}	0,25	0,75	1,25 ^{ab}	1,75 ^{ab}	2,25 ^a	3 ^a	7 ^{ab}	15,75 ^{abc}	22 ^a
P _{NH3+EFE}	0,5	0,75	1 ^{ab}	1,25 ^{abc}	1,75 ^{ab}	3 ^a	8,25 ^a	14,5 ^{abc}	18,25 ^{abc}
P _{Ur}	0,5	0,25	0,5 ^b	0,75 ^{abc}	0,75 ^b	0,25 ^c	1 ^d	5,75 ^d	9,25 ^d
P _{Ur+EFE}	0,25	0	0 ^b	0,25 ^c	1 ^b	1 ^{bc}	2,5 ^{cd}	10,25 ^{dc}	13 ^{dc}
P _S	0,33	0,25	0,41 ^b	0,58 ^{bc}	1,58 ^{ab}	2,25 ^{ab}	4,41 ^{bc}	18,58 ^a	22,25 ^a
P _{S+EFE}	0,8	0,58	0,58 ^{ab}	0,91 ^{abc}	1,58 ^{ab}	1,75 ^{abc}	3,75 ^{bcd}	16,75 ^{ab}	20,08 ^{ab}
p-value	0.264	0.1	0.12	0.063	0.058	0.046	0.007	0.01	0.009
SEM	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1	0.22	0.96	0.52

^{a,b,c,d} moyennes de la même colonne portant différentes lettres sont significativement différentes (P < 0.05)

L'analyse du modèle choisi a montré que la plupart des combinaisons entre les prétraitements chimiques et les EFE n'ont pas d'effet significatif sur les paramètres de la cinétique de production de gaz (figure 1). Cependant, seul le prétraitement à la soude combiné aux EFE améliore significativement la vitesse maximale de fermentation (tableau 3).

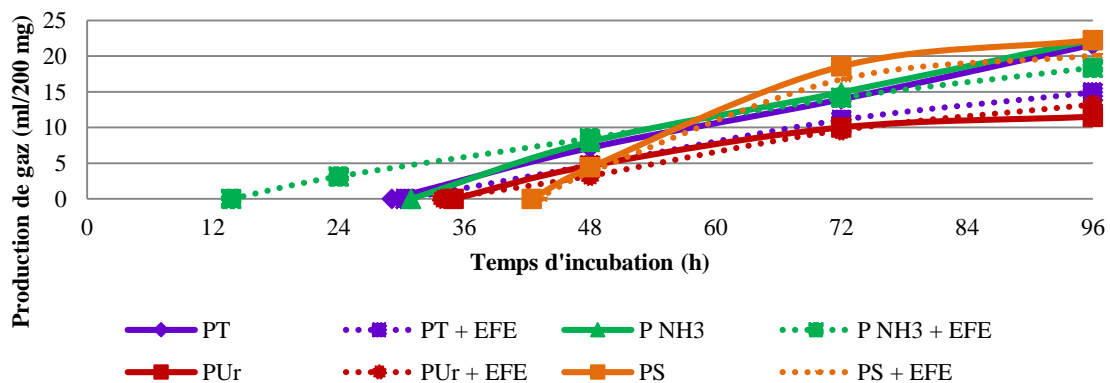


Figure 1 : Cinétique de production de gaz dans les seringues de la paille d'avoine étudiée avec et sans prétraitement chimique, supplémentée et non supplémentée avec le complexe d'EFE

De même, on remarque que le temps de latence (Lag) diminue avec la paille traitée à l'ammoniac et supplémentée en EFE (P_{NH_3+EFE}). Il est par conséquent possible qu'avec ce traitement, la fermentation ruminale commence d'une façon plus précoce par rapport aux autres traitements. Il est probable que ce traitement minimise les obstacles structurels et rend les parois cellulaires plus accessibles par les enzymes. De ce fait, la colonisation des particules alimentaires par les microorganismes s'améliore parfaitement et on aura une fermentation meilleure et plus rapide. Parallèlement, la disponibilité des sucres simples pour les microorganismes du rumen s'améliore sous l'action des enzymes fibrolytiques exogènes utilisées (Wadhwa 1995, Wang et McAllister 2002).

Tableau 3 : Effet de la supplémentation en EFE de la paille d'avoine étudiée avec et sans prétraitements chimiques sur la cinétique de production de gaz *en in vitro*.

Echantillons de paille	A	b	Lag
P_T	51,28 ^{ab}	1,542 ^b	29,085 ^{ab}
P_{t+EFE}	20,25 ^{bc}	1,357 ^b	30,375 ^{ab}
P_{NH_3}	59,32 ^a	1,682 ^b	30,91 ^{ab}
P_{NH_3+EFE}	24,04 ^{bc}	1,175 ^b	13,74 ^c
P_{Ur}	11,78 ^c	1,704 ^b	34,978 ^{ab}
P_{Ur+EFE}	18,32 ^c	1,397 ^b	33,892 ^{ab}
P_S	23,08 ^{bc}	3,742 ^a	42,445 ^a
P_{S+EFE}	20,66 ^{bc}	3,217 ^a	42,983 ^a
p-value	0.044	0.006	0.05
SEM	1.68	0.366	1.038

^{a,h,c}moyennes de la même colonne portant différentes lettres sont significativement différentes ($P < 0.05$)
 A est le maximum théorique de production de gaz (ml), b est la vitesse maximale de production de gaz (ml /h) Lag est le temps de latence (h).

D'autre part, les prétraitements à l' NH_3 et à l'urée combinés ou non avec la supplémentation en EFE améliorent d'une manière hautement significative la digestibilité de la matière organique et la valeur énergétique de la paille étudiée (tableau 4). Cependant, chacun de ces deux prétraitements chimiques, combiné ou non combiné avec les EFE, présente des valeurs de dMO, d'EM et d'ENL presque équivalentes. Par conséquent, on peut confirmer que l'effet du prétraitement chimique domine celui de la supplémentation en EFE.

Tableau 4 : Effet de la supplémentation en EFE de la paille d'avoine étudiée avec et sans prétraitements chimiques sur la digestibilité de la MO et la valeur énergétique.

Echantillons de paille	dMO (% MO)	EM (MJ/kg MS)	ENL (MJ/kg MS)
Control (P_t)	40.427 ^c	2.66 ^b	0.86 ^b
P_{t+EFE}	39.823 ^c	2.59 ^b	0.81 ^b
P_{NH_3}	45.911 ^b	3.07 ^a	1.13 ^a
P_{NH_3+EFE}	45.911 ^b	3.07 ^a	1.13 ^a
P_{Ur}	49.049 ^a	3.07 ^a	1.12 ^a
P_{Ur+EFE}	49.954 ^a	3.18 ^a	1.19 ^a
P_S	41.206 ^c	2.71 ^b	0.89 ^b
P_{S+EFE}	40.603 ^c	2.64 ^b	0.84 ^b
p-value	<0.0001	0.0003	0.0006
SEM	0.40	0.02	0.016

^{a,b,c}moyennes de la même colonne portant différentes lettres sont significativement différentes ($P < 0.05$)

Malgré les améliorations enregistrées, la supplémentation en EFE, et avec la concentration de 0.6 mg du complexe enzymatique par g de MS, semble être sans effet sur l'utilisation digestive de la paille étudiée. L'effet dominant des traitements chimiques, notamment par l'ammoniac, s'explique par leur capacité de cliver les liaisons estérifiées des parois cellulaires, de réduire l'enchevêtrement physique de la cellulose et de solubiliser les composés phénoliques inhibiteurs (Chesson 1981; Fahey et al. 1993). Ces traitements améliorent par la suite la saccharification enzymatique pendant la fermentation ruminale pour donner une meilleure utilisation digestive des pailles (Gould 1984 ; Sundstol 1988).

4. Conclusion

On peut conclure que la supplémentation en EFE combinée avec un prétraitement à la soude, à l' NH_3 ou à l'urée améliore la vitesse maximale de la fermentation et l'utilisation digestive de la paille d'avoine étudiée. Par ailleurs, il est important de vérifier si l'effet de la supplémentation en EFE des pailles traitées ou non traitées chimiquement n'est pas dépendant de la nature et même de la concentration du complexe enzymatique choisi.

Acknowledgments : Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet D3.10.27 CRP financé par l'IAEA.

5. Références

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990)** Official methods of analysis, sixteenth ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Beauchemin Ka, Rode LM, Sewalt VJH (1995)** Fibrolytic Enzymes Increase Fiber Digestibility and Growth Rate of Steers Fed Dry Forages. *Canadian Journal of Animal Science* 75(4):641–44.
- Chermi A, Nefzaoui, Cordesse R (1989)** Paramètres d'uréolyse et digestibilité de la paille traitée à l'urée. *Ann. Zootech.* : 38, 63–72.
- Chesson A (1981)** Effects of sodium hydroxide on cereal straws, in relation to the enhanced degradation of structural polysaccharides by rumen microorganisms. *J Sci Food Agric* 32, 745-758
- Demarquilly C, Chenost M, Ramihone B (1989)**. Intérêt zootechnique du traitement des pailles à l'ammoniac dans : Symposium International sur l'Alimentation des Ruminants en Milieu Tropical Humide, Guadeloupe, INRA, Paris, pp. 441-455.
- Dulphy JP, Breton J, Bienaime A, Louyot JM (1982)** Étude de la valeur alimentaire des pailles de céréales traitées ou non à la soude. I. - Influence du traitement à la soude. *Ann. Zootech.*, 31, 195-214.
- Gould JM, Freer S N (1984)** High-efficiency ethanol production from lignocellulosic residues pretreated with alkaline H_2O_2 . *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 628–631. doi: 10.1002/bit.260260613
- Eun JS, Beauchemin Ka, Hong SH, Bauer MW (2006)** Exogenous Enzymes Added to Untreated or Ammoniated Rice Straw: Effects on in Vitro Fermentation Characteristics and Degradability. *Animal Feed Science and Technology* 131(1-2):87–102.
- Fahey GC, Bourquin LD, Titgemeyer EC, Atwell DG (1993)**. Postharvest treatment of fibrous feedstuffs to improve the nutritive value. P.715-766 in Forage Cell Wall Structure and Digestibility. H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, and J. Ralph, ed. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Feng P, Hunt CW, Pritchard GT, Julien WE (1996)** Effect of Enzyme Preparations on In Situ and In Vitro Degradation and In Vivo Digestive Characteristics of Mature Cool-Season Grass Forage in Beef Steers. *Journal of Animal Science* 74(6):1349–57.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (1979)** The estimation of the digestibility and metabolizable energy contents of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J Agric Sci* 92: 217-222
- Menke KH, Steingass H (1987)** Estimate of the energetic feed value from the in vitro rumen juice with certain gas formation and the chemical analysis II regression equations. *Ubers Tierernahrg* 15: 59-94
- Menke KH, Steingass H (1988)** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 287–55.
- NRC (1989)** Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 6th revised edn. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.
- Rode LM, Yang WZ, Beauchemin Ka (1999)** Fibrolytic Enzyme Supplements for Dairy Cows in Early Lactation. *Journal of dairy science* 82(10):2121–26.
- Salem a Z M, Gado HM, Colombatto D, Elghandour MMY (2013)** Effects of Exogenous Enzymes on Nutrient Digestibility, Ruminant Fermentation and Growth Performance in Beef Steers. *Livestock Science* 154(1-3):69–73.
- Schofield P, Pitt RE, Pell AN (1994)** Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J. Anim. Sci.* 72:2980–2991.

- Sundstol F., Coxworth E. et Mowat D.N. (1978).** Amélioration de la valeur nutritive de la paille par le traitement à l'ammoniac., Rn'. mond. Zootech. : 26, 13-21.
- Sundstol F 1988** Straw and other fibrous by-products. *Livestock Production Science* (19)1/2:137-158
- Wang Y, McAllister TA (2002)** Rumen Microbes, Enzymes and Feed Digestion: A Review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci* 15(11):1659–76.
- Wang Y, McAllister TA (2002)** Investigation of exogenous fibrolytic enzyme activity on barley straw using in vitro incubation. *J. Anim. Sci.* 80 (Suppl. 1), 316.
- Wadhwa M, Makkar GS. 1995** Effect of hydrogen peroxide-ammonium hydroxide treatment on the in sacco degradability of crop residues. *J Anim Sci*;65:446–9.
- Yang W Z, Beauchemin Ka, Rode L M (1999)** Effects of an Enzyme Feed Additive on Extent of Digestion and Milk Production of Lactating Dairy Cows. *Journal of dairy science* 82(2):391–403. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75245-8).
- Zwietering MH, Rombouts FM, van't Riet V (1992)** Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *J. Appl. Bacteriol.* 72:139.