

ارزش غذایی تفاله مرکبات (لیمو و پرتقال) عمل‌آوری شده با قارچ نوروسپورا سیتوفیلا (*Neurospora sitophila*)

کوروش ناظم^۱، یوسف روزبهان^{۱*} و سید عباس شجاع‌الساداتی^۲

(تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۷/۴)

چکیده

در این بررسی ارزش غذایی تفاله‌های لیمو و پرتقال عمل‌آوری شده با قارچ نوروسپورا سیتوفیلا از طریق تجزیه شیمیایی، ضرایب هضمی ماده خشک و ماده آلی به روش *in vitro* تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین خام به روش *in sacco* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بدست آمده بوسیله آزمون *t* مقایسه شدند. مقادیر پروتئین خام، خاکستر خام، ماده آلی، دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز برای تفاله لیموی عمل‌آوری نشده به ترتیب ۶/۳، ۶/۲، ۹۳/۸، ۲۱/۳ و ۱۷/۹، تفاله لیموی عمل‌آوری شده ۲۵/۱، ۱۰/۶، ۸۹/۴، ۱۲/۷ و ۶/۸، تفاله پرتقال عمل‌آوری نشده ۶/۸، ۶/۵، ۹۴/۵، ۲۶/۱ و ۲۰/۳ و تفاله پرتقال عمل‌آوری شده ۲۳/۲، ۸/۱، ۹۱/۹، ۱۸/۵ و ۱۵ درصد بود. تفاوت تجزیه شیمیایی انجام شده بین نمونه‌های عمل‌آوری نشده و شده هر دو نوع تفاله در سطح ($P < 0/01$) معنی‌دار بود. ضرایب هضمی ماده خشک و آلی و ماده آلی قابل هضم در ماده خشک برای تفاله لیموی عمل‌آوری نشده به ترتیب ۷۹/۳، ۸۰/۵ و ۷۵/۵، تفاله لیموی عمل‌آوری شده ۹۱/۴، ۹۳/۵ و ۸۳/۵ ($P < 0/01$)، تفاله پرتقال عمل‌آوری نشده ۸۱/۵، ۸۲/۸ و ۷۸/۲ و تفاله پرتقال عمل‌آوری شده ۹۱/۲، ۹۴/۵ و ۸۶/۹ درصد ($P < 0/01$) گردید. تفاوت در ضرایب هضمی انجام شده بین نمونه‌های عمل‌آوری نشده و شده هر دو نوع تفاله در سطح ($P < 0/01$) معنی‌دار بود. تجزیه‌پذیری ماده خشک (با سرعت عبور ۰/۰۵) تفاله لیموی عمل‌آوری نشده ۶۶/۳، تفاله لیموی عمل‌آوری شده ۷۵/۲، تفاله پرتقال عمل‌آوری نشده ۶۸/۷ و تفاله پرتقال عمل‌آوری شده ۷۵/۵ درصد بود. تفاوت در تجزیه‌پذیری ماده خشک انجام شده بین نمونه‌های عمل‌آوری نشده و شده هر دو نوع تفاله در سطح ($P < 0/01$) معنی‌دار بود. میزان تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین (با سرعت عبور ۰/۰۵) برای تفاله لیموی عمل‌آوری نشده و عمل‌آوری شده به ترتیب ۱۲/۱ و ۷۳/۷ و برای تفاله پرتقال عمل‌آوری نشده و عمل‌آوری شده ۱۴/۸ و ۷۷/۸ درصد گردید. تفاوت در تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین انجام شده بین نمونه‌های عمل‌آوری نشده و شده هر دو نوع تفاله در سطح ($P < 0/01$) معنی‌دار بود. به‌طور کلی، عمل‌آوری تفاله مرکبات با قارچ نوروسپورا سیتوفیلا باعث بهبود غلظت پروتئین، افزایش ضرایب هضمی و تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین گردید.

واژه‌های کلیدی: تفاله مرکبات، نوروسپورا سیتوفیلا، ارزش غذایی، پروتئین

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. استاد بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rozbeh_y@modares.ac.ir

مقدمه

عمل‌آوری این ضایعات در جهت افزایش محتوای پروتئین باعث افزایش کارایی آنها در تغذیه دام می‌گردد. به منظور تولید مواد خوراکی پروتئینی از ضایعات مرکبات و افزایش محتوای پروتئین آنها، روش‌های مختلفی به کار گرفته شده است. افزودن موادی مثل اوره به ضایعات مرکبات (۲۵)، سیلو کردن به همراه مواد با پروتئین بالا مثل سبوس گندم (۱۹) و یا عمل‌آوری آن با استفاده از قارچ و مخمر (۲۱) از جمله این روش‌هاست. تحقیقات زیادی به منظور افزایش پروتئین تفاله مرکبات با استفاده از قارچ‌ها صورت گرفته و نتایج آنها منتشر گردیده است (۸، ۹، ۱۱، ۱۴، ۱۵، ۲۰، ۲۱ و ۲۲). نتایج تحقیقات مذکور نشان داده که عمل‌آوری تفاله مرکبات با استفاده از قارچ‌ها منجر به افزایش پروتئین خام در آنها گردیده‌است. به منظور تعیین خصوصیات ضایعات مرکبات عمل‌آوری نشده و ضایعات عمل‌آوری شده با قارچ لازم است که ترکیبات شیمیایی آنها تعیین شده و کیفیت مواد مغذی موجود در آنها بررسی گردد. در تحقیق حاضر از قارچ نوروپورا سیتوفیلا به منظور عمل‌آوری و افزایش غلظت پروتئین خام ضایعات مرکبات استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

۱. تجزیه شیمیایی

تفاله‌های لیمو و پرتقال، در برابر آفتاب خشک شده و مورد تجزیه شیمیایی قرار گرفتند. میزان پروتئین خام نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کلدال و خاکستر خام با سوزاندن هر نمونه در کوره الکتریکی طبق روش‌های استاندارد (AOAC) تعیین شد (۴). مقدار دیواره سلولی با استفاده از محلول شوینده خنثی و دیواره سلولی بدون همی سلولز با استفاده از محلول شوینده اسیدی بر اساس روش ون سوست و هم‌کاران (۲۴) تعیین گردید.

۲. عمل‌آوری نمونه‌ها

الف) تهیه مایه تلقیح

از روی کشت اصلی قارچ نوروپورا سیتوفیلا (*Neurospora sitophila*) (این قارچ جزء دسته آسکومیست‌ها

یکی از عمده‌ترین مشکلات در صنعت دام و طیور کشور کمبود خوراک دام است. واردات مجموع انواع خوراک دام و طیور در طی سال‌های برنامه دوم توسعه به‌طور میانگین در هر سال به میزان ۱۴۷۹ هزار تن بوده است که مقدار ۱۳۸۸ هزار تن از این واردات به مصرف غذای دام رسیده است (۳). یکی از راه‌های جبران این کمبود، استفاده از ضایعات صنایع غذایی در تغذیه دام می‌باشد. بقایای لیمو و پرتقال در برخی از نقاط ایران به میزان زیادی یافت می‌شود. ضایعات مرکبات در ایران شامل ضایعات برداشت، حمل و نقل و نگه‌داری و تبدیل آنها می‌باشد که ضایعات تبدیل سالانه حدود ۹۰۰ هزار تن است (۲). ضایعات مرکبات محتوی انرژی بالا برای نشخوار کنندگان است، به نحوی که میزان انرژی قابل متابولیسم تفاله خشک و تفاله مرطوب آن به ترتیب برابر ۱۰/۳ و ۲/۴ مگا کالری در کیلوگرم بوده و می‌تواند به‌عنوان یک ماده خوراکی با انرژی بالا در تغذیه نشخوار کنندگان به کار رود (۱۳). با این وجود، استفاده از تفاله مرطوب مرکبات ممکن است مشکلاتی نظیر کپک‌زدگی و در نتیجه مسمومیت دام را ایجاد کند (۱۲). اگرچه سیلو کردن تفاله‌های مرطوب یکی از راه‌های نگه‌داری آنهاست، اما سیلو کردن علاوه بر هزینه زیاد ساخت سیلو، مسائلی همچون تبدیل پروتئین حقیقی به ازت آمونیاکی و آلودگی محیط زیست به دلیل تراوش سیلو را به همراه دارد (۱۶). از طرف دیگر خشک کردن تفاله‌های مرطوب در دماهای بالا مستلزم صرف هزینه زیاد بوده و ضمناً می‌تواند باعث بروز واکنش میلارد و کاهش کیفیت پروتئین شود (۱۶). استفاده مؤثر از محصولات فرعی صنایع غذایی به‌عنوان خوراک دام به برخی از عوامل از جمله ترکیب مواد مغذی محصول فرعی در مقایسه با نیازهای دام بستگی دارد (۱۶). عامل مهم دیگر، مقرون به صرفه بودن عمل‌آوری محصول فرعی برای استفاده از آن به‌عنوان خوراک دام (۵). از آنجایی که ضایعات مرکبات از ارزش اقتصادی پایینی برخوردار بوده و دور ریختن آنها باعث آلودگی محیط زیست می‌شود، لذا می‌توان از آنها در تغذیه دام استفاده نمود. از طرف دیگر،

خشک در داخل آون قرار داده شد. رطوبت لیموی خشک شده برابر ۱۰ درصد بود. برای تهیه نمونه ابتدا pH تفاله‌های آسیاب شده تعیین شد. بدین منظور ۴ گرم از نمونه آسیاب شده درون یک ارلن ریخته شد و سپس ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و با استفاده از pH متر، pH آن تعیین شد که برابر با ۳/۵۶ بود (۲۱). سپس برای رسیدن pH به ۵/۵ به نمونه مقدار مناسب آمونیاک اضافه گردید (۲۱). با دانستن مقدار رطوبت تفاله لیموی خشک (۱۰ درصد)، مقدار آمونیاکی که باید برای تنظیم pH به تفاله اضافه می‌شد (۰/۶۵ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰ گرم تفاله الک شده با الک ۴۰ مش و ۰/۵۷ میلی‌لیتر به ازاء هر ۱۰ گرم تفاله الک شده با الک ۱۲ مش)، مقدار مایه تلقیحی که باید به کار می‌رفت (۱ میلی‌لیتر به ازاء هر ۱۰ گرم تفاله خشک) مقدار آب مقطر مورد نیاز برای رسیدن رطوبت محیط به ۷۵ درصد محاسبه شد (۲۱). در مرحله بعد، آب مقطر (۱۰۳/۸ میلی‌لیتر برای تفاله الک شده با الک ۴۰ مش و ۱۰۴/۱ میلی‌لیتر برای تفاله الک شده با الک ۱۲ مش) و آمونیاک مورد نیاز با هم مخلوط شدند. در چهار ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری در هر کدام ۲۰ گرم از تفاله لیموی الک شده با الک ۴۰ مش و در دو ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری هم در هر کدام ۲۰ گرم از تفاله الک شده با الک ۱۲ مش ریخته شد و سپس مقدار لازم از مخلوط آب و آمونیاک (۵۳/۲ میلی‌لیتری برای هر کدام از ارلن‌ها) به آنها اضافه شد. برای مشاهده اثر حجم نمونه در ارلن بر افزایش درصد پروتئین، در یک ارلن هم مقدار ۴۰ گرم نمونه الک شده با الک ۴۰ مش و در دو ارلن هم در هر کدام مقدار ۱۰ گرم نمونه آسیاب شده، در یکی الک شده با الک ۱۲ مش و در دیگری الک شده با الک ۴۰ مش ریخته شده و مقادیر لازم آب و آمونیاک برای رسیدن رطوبت به ۷۵ درصد و pH به ۵/۵ اضافه شد. پس از این مرحله برای استریل کردن نمونه‌ها، ارلن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در داخل اتوکلاو در دمای ۱۲۱ °C قرار داده شد.

ج) تلقیح قارچ و عمل‌آوری

پس از استریل شدن ارلن‌ها و محتویات آنها، عمل تلقیح قارچ بر

می‌باشد که به‌عنوان قارچ‌های عالی شناخته می‌شوند. آنها در شرایط محیطی وسیعی قادر به زندگی بوده و ترکیباتی از قبیل گلوکز، سلولز و کراتین را تجزیه می‌کنند که از سلولز موجود در تفاله مرکبات به‌عنوان منبع کربنی و از آمونیاک به‌عنوان منبع ازت استفاده کرده و تولید پروتئین می‌نمایند. در شرایط کاملاً استریل به هر کشت PDA یک لوپ میسلیم قارچ تلقیح شد و در دمای ۳۰ °C به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد. پس از آن کشت‌های تهیه شده در دمای ۴ °C درون یخچال قرار داده شدند. ترکیب محیط کشت نگه‌دارنده و مایه تلقیح (در یک لیتر) به شرح زیر بود (۱۲).

گلوکز ۱۰۰ گرم، عصاره مخمر ۲ گرم، فسفات هیدروژن پتاسیم (KH₂PO₄) ۰/۷۱۴ گرم، اوره ۰/۸۶ گرم، سولفات آمونیوم (NH₄)₂SO₄ ۰/۴۷ گرم، سولفات منگنز (MgSO₄ · 7H₂O) ۰/۲ گرم، کلرید کلسیم ۰/۲ گرم، سولفات روی (ZnSO₄ · 7H₂O) ۴/۴ میلی‌گرم، اسید بوریک (H₃BO₃) ۰/۱۱۴ میلی‌گرم، مولبیدات آمونیوم (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ · 4H₂O ۰/۴۸ میلی‌گرم، سولفات مس (CuSO₄ · 5H₂O) ۰/۷۸ میلی‌گرم، کلرید منگنز (MnCl₂ · 4H₂O) ۰/۱۴۴ میلی‌گرم، کلرید آهن (FeCl₃) ۳/۲ میلی‌گرم.

برای تهیه کشت نگه‌دارنده، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت با ترکیب فوق تهیه و در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. پس از آنکه pH در ۵/۵ تنظیم و در دمای ۱۲۱ °C و فشار ۱۵ psi به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید، در شرایط کاملاً استریل چند لوپ از میسلیم‌های قارچ روی کشت به درون ارلن محتوی محیط کشت نگه‌دارنده تلقیح شد و در دمای ۳۵ °C به مدت ۲۴ ساعت روی همزن با شدت ۲۰۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد و کشت تلقیحی به‌دست آمده برای نگه‌داری به یخچال با دمای ۴ °C منتقل شد.

ب) آماده سازی نمونه‌ها

ابتدا مقداری از تفاله لیموی خشک شده در برابر آفتاب، در آزمایشگاه آسیاب شد و با الک‌های ۴۰ و ۱۲ مش الک گردیدند. مقدار ۵ گرم از تفاله لیموی آسیاب شده برای تعیین مقدار ماده

جدول ۱. مقدار پروتئین خام نمونه‌ها

نوع عمل‌آوری	نوع الک	مقدار تفاله در هر ارلن (گرم)	درصد رطوبت	درصد پروتئین
بدون عمل‌آوری	-	-	۱۰	۶/۲۵
بدون عمل‌آوری	۱۲	-	۱۰	۸/۹۲
بدون عمل‌آوری	۴۰	-	۱۰	۸/۹
عمل‌آوری	۴۰	۲۰	> ۷۵	۱۶/۳۸
عمل‌آوری	۴۰	۴۰	۷۵	۲۳/۷
عمل‌آوری	۴۰	۱۰	۷۵	۲۴/۲۴
عمل‌آوری	۱۲	۲۰	۷۵	۲۲/۰۵

شده، آزمایش‌های لازم روی آنها انجام شد.

برای تهیه نمونه پرتقال ابتدا تفاله‌های تهیه شده در آزمایشگاه در برابر آفتاب خشک شده و سپس آسیاب و با الک ۴۰ مش الک شدند. مانند تفاله لیمو، ابتدا pH تفاله تعیین شد که برابر ۴/۶ بود. جهت تنظیم pH در حد ۵/۵ از آمونیاک استفاده شد و به‌عنوان منبع ازت و فسفر به ترتیب از سولفات آمونیوم و فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم استفاده شد. در هر ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری مقدار ۲۰ گرم نمونه ریخته شد و برای رساندن pH به ۵/۵ از ۱/۰ میلی‌لیتر آمونیاک به ازاء هر ۲۰ گرم نمونه استفاده شد. به همین ترتیب مقدار ۱/۰ گرم سولفات آمونیوم و ۱۴/۰ گرم فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم نیز به هر ارلن اضافه شد و برای رسیدن رطوبت به ۷۰ درصد مقدار ۴۱/۲ میلی‌لیتر آب مقطر به هر ارلن اضافه شد. در نهایت ارلن‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو قرار گرفتند تا استریل شوند. پس از استریل شدن به هر ارلن مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول تلقیح اضافه شد و ارلن‌ها درون انکوباتور در دمای ۳۵°C به مدت ۱۱۰ ساعت قرار گرفتند.

۳. تعیین ضرایب هضمی

تعیین قابلیت هضم ماده خشک (Dry Matter) DMD (Digestibility Organic Matter) و ماده آلی (Digestibility) و میزان ماده آلی قابل هضم در ماده خشک

روی تفاله‌ها (به ازای هر ۱۰ گرم از تفاله‌ها مقدار ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت قارچ) در زیر هود و در شرایط استریل انجام شد. سپس، ارلن‌ها به‌دستگاه انکوباتور منتقل شد و به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۳۵°C قرار گرفتند. پس از گذشت ۱۲۰ ساعت ارلن‌ها از انکوباتور خارج شده و نمونه‌های داخل هر کدام به‌طور جداگانه داخل پتری گذاشته شد. این نمونه‌ها داخل آون در دمای ۵۰°C قرار داده شد تا کاملاً خشک شوند. پس از خشک شدن کامل، نمونه‌ها به‌طور جداگانه آسیاب شده و میزان پروتئین آنها تعیین شد تا بهترین شرایط جهت عمل‌آوری تعیین گردد. از آنجایی که ممکن است با الک کردن تفاله‌ها درصد پروتئین آنها تغییر کند، بنابراین مقداری از تفاله‌ها با الک‌های ۴۰ مش و ۱۲ مش الک شده و مقدار پروتئین آنها تعیین گردید. مقدار پروتئین خام نمونه‌ها در جدول ۱ ارائه داده شده‌است.

با توجه به نتایج فوق تصمیم گرفته شد که تفاله‌ها با الک ۴۰ مش الک شوند و در هر ارلن ۳۰ گرم از تفاله الک شده ریخته شد و سپس عمل تلقیح انجام شود. برای تهیه نمونه برای آزمایش‌های بعدی، پس از انجام عمل تلقیح و انکوباسیون نمونه‌ها و گذشت ۱۲۰ ساعت، تفاله‌های عمل‌آوری شده از ارلن‌ها خارج شدند و در آون در دمای ۵۰-۴۵°C قرار گرفتند تا به تدریج خشک شوند. دلیل انتخاب این دما برای خشک کردن نمونه‌ها، جلوگیری از کاهش کیفیت پروتئین آنها در اثر دمای بالا بود (۲۱). پس از خشک شدن تفاله‌های عمل‌آوری

جدول ۲. نتایج حاصل از تجزیه شیمیایی (برحسب درصد ماده خشک)

تفاله پرتقال			تفاله لیمو			
مقدار t	عمل‌آوری شده	خام	مقدار t	عمل‌آوری شده	خام	
۷۸/۴۴	۲۳/۲ ^a	۶/۸ ^b	۱۱۹/۰۹	۲۵/۱ ^a	۶/۳ ^b	پروتئین خام
۲۰/۴۵	۹۱/۹ ^b	۹۴/۵ ^a	۳۰/۲۱	۸۹/۴ ^b	۹۳/۸ ^a	ماده آلی
۵/۳	۸/۱ ^a	۶/۵ ^b	۱۹/۵۱	۱۰/۶ ^a	۶/۲ ^b	خاکستر خام
۲۸/۵۵	۱۸/۵ ^b	۲۶/۱ ^a	۲۸/۰۲	۱۲/۷ ^b	۲۱/۳ ^a	دیواره سلولی
۲۱/۶۴	۱۵ ^b	۲۰/۳ ^a	۴۵/۳۱	۶/۸ ^b	۱۷/۹ ^a	دیواره سلولی بدون همی سلولز

حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت تفاله‌های مورد آزمایش در صفت مذکور می‌باشد ($P < 0.01$).

خام نمونه‌ها از نرم افزار Neway استفاده شد.

۵. روش آماری

اختلاف بین میانگین تیمارهای (هر تیمار ۴ تکرار) عمل‌آوری نشده و عمل‌آوری شده در هر گروه (لیمو و پرتقال) با استفاده از آزمون t و بر اساس مدل آماری زیر مقایسه شد:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad [2]$$

Y_{ij} - صفت مقایسه شده.

μ - میانگین صفت اندازه‌گیری شده.

T_i - اثر تیمار و e_{ij} خطای آزمایشی بود. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج

نتایج به‌دست آمده در جداول ۲ تا ۶ آورده شده است. همان‌طوری که در جدول ۲ مشاهده می‌شود میزان خاکستر خام و پروتئین خام در تفاله‌های لیمو و پرتقال پس از عمل‌آوری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.01$)، اما میزان افزایش ایجاد شده در محتوای خاکستر خام تفاله پرتقال نسبت به تفاله لیمو کمتر بود. میزان ماده آلی، NDF و ADF پس از عمل‌آوری در هر دو نوع تفاله به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.01$).

DOMD (Degradability Organic Matter Digestibility) با

استفاده از روش تلی و تری (۲۳) انجام پذیرفت. بدین ترتیب که با استفاده از محلول مک دوگال (۲۳) و شیرابه شکمبه، در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت تحت انکوباسیون بی‌هوازی قرار گرفتند. در مرحله بعد انکوباسیون بی‌هوازی نمونه با استفاده از محلول پپسین اسیدی به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۲۳). انرژی قابل متابولیسم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۶).

$$ME \text{ (MJ/Kg DM)} = 0.0157 \times \text{DOMD (g/Kg DM)} \quad [1]$$

DOMD - ماده آلی قابل هضم در ماده خشک

ME - انرژی قابل متابولیسم

۴. تعیین تجزیه‌پذیری

تعیین میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش کیسه‌های نایلونی انجام شد (۶). نمونه‌ها پس از توزین در داخل کیسه‌های داکرونی قرار گرفته و از طریق فیستولا وارد شکمبه دام گردید. میزان ناپدید شده نمونه‌ها در فواصل زمانی مختلف، به‌عنوان بخش تجزیه شده در نظر گرفته شد (۶ و ۱۸). برای انجام آزمایش‌های مربوط به تجزیه‌پذیری و ضرایب هضمی از سه راس گاو نر تالشی اخته شده استفاده گردید. به‌منظور برآورد مشخصه‌های تجزیه‌پذیری ماده خشک و پروتئین

جدول ۳. میزان ماده خشک (درصد)

لیموی خام	لیموی عمل‌آوری شده	پرتقال خام	پرتقال عمل‌آوری شده
۲۵/۴	۲۲	۲۷	۲۱/۹
۱۳/۳		۱۹	
ماده خشک			
درصد کاهش وزن*			

* اختلاف بین ماده خشک تفاله خام و تفاله عمل‌آوری شده

جدول ۴. قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، ماده آلی در ماده خشک و انرژی قابل متابولیسم (MJ/Kg DM)

قابلیت هضم	تفاله لیمو		تفاله پرتقال		مقدار t
	عمل‌آوری شده	خام	عمل‌آوری شده	خام	
ماده خشک	۹۱/۴ ^a	۷۹/۳ ^b	۳۷/۵	۸۱/۵ ^b	۲۵/۹
ماده آلی	۹۳/۵ ^a	۸۰/۵ ^b	۳۹/۷	۸۲/۸ ^b	۳۷/۵
ماده آلی در ماده خشک	۸۳/۵ ^a	۷۵/۵ ^b	۳۹/۷	۷۸/۲ ^b	۳۹/۴
انرژی قابل متابولیسم	۱۳/۱ ^a	۱۱/۹ ^b	۳۷/۲	۱۲/۳ ^b	۳۶/۲۵

حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت تفاله‌های مورد آزمایش در صفت مذکور می‌باشد ($P < 0/01$).

جدول ۵ نشان داده شده است. ضرایب تجزیه‌پذیری ماده خشک هر دو نمونه پس از عمل‌آوری به‌طور معنی‌داری ($P < 0/01$) افزایش یافت. میزان مواد محلول در آب (a) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/01$) در تفاله لیمو و ($P < 0/05$ در تفاله پرتقال)، اما عمل‌آوری اثری بر بخش‌های b و c نداشت.

مقادیر مربوط به تجزیه‌پذیری پروتئین مؤثر نمونه‌ها پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در شکمبه در جدول ۶ نشان داده شده است. ضرایب تجزیه‌پذیری پروتئین پس از عمل‌آوری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/01$). میزان مواد محلول در آب (a) در هر دو نمونه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0/01$). مقادیر b و c در تفاله پرتقال عمل‌آوری شده افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/01$)، اما در تفاله لیموی عمل‌آوری شده نسبت به تفاله لیموی خام افزایش معنی‌داری در بخش‌های b و c مشاهده نشد.

نکته قابل توجه در این آزمایش تغییرات ایجاد شده در میزان ماده خشک نمونه‌های عمل‌آوری شده نسبت به نمونه‌های خام می‌باشد که در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود پس از عمل‌آوری، مقدار ماده خشک نمونه‌ها کاهش یافت. کاهش ماده خشک با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{وزن ماده خشک نمونه اولیه} = (\%) \text{ کاهش وزن ماده خشک نمونه اولیه} / (\text{وزن ماده خشک نمونه نهایی} - [3])$$

مطابق جدول ۴ پس از عمل‌آوری، ضرایب قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی، ماده آلی قابل هضم در ماده خشک و انرژی قابل متابولیسم به ازای هر کیلوگرم ماده خشک در هر دو نمونه افزایش یافت ($P < 0/01$).

نتایج مربوط به تجزیه‌پذیری ماده خشک نمونه‌ها در

جدول ۵. تجزیه پذیری و مشخصه‌های تجزیه‌پذیری ماده خشک

تفاله پرتقال			تفاله لیمو			ضریب تجزیه‌پذیری
مقدار t	عمل‌آوری شده	خام	مقدار t	عمل‌آوری شده	خام	
۱۰/۵	۸۴/۵ ^a	۷۷ ^b	۱۵/۶	۸۴/۱ ^a	۷۵/۲	٪ ^۱
۱۷/۵	۷۵/۵ ^a	۶۸/۷ ^b	۳۷/۲	۷۵/۲ ^a	۶۶/۳	٪ ^۲
۱۵/۵	۶۹/۹ ^b	۶۳/۶ ^b	۴۹/۱	۶۹/۶ ^a	۶۰/۸	٪ ^۳
مشخصه‌های تجزیه‌پذیری						
۹/۵	۸۴/۵ ^a	۴۴/۸ ^b	۱۷/۵	۴۷/۲ ^a	۳۹/۲ ^b	a
۴/۵	۴۵/۸	۴۱/۳	۰/۶۲	۴۶/۳	۴۵/۴	b
۰/۱۱	۰/۰۷۶۹	۰/۰۷۷۳	۰/۱۱	۰/۰۸۴۲	۰/۰۸۴۶	c

۱. میزان عبور مواد خوراکی از شکمبه به روده در سطح نگهداری (بخش/ساعت).
 ۲. میزان عبور مواد خوراکی از شکمبه به روده در دو برابر سطح نگهداری (بخش/ساعت).
 ۳. میزان عبور مواد خوراکی از شکمبه به روده در سه برابر سطح نگهداری (بخش/ساعت).
- حروف مختلف در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت تفاله‌های مورد آزمایش در صفت مذکور می‌باشد (P < ۰/۰۱).

بحث

ترکیب شیمیایی

پروتئین خام، منابع از ته افزوده شده به تفاله‌ها در زمان عمل‌آوری است (از جمله آمونیاک). از طرف دیگر، قارچ نوروسپورا سیتوفیلای افزوده شده به تفاله، حاوی سطح بالایی از پروتئین (۴۵٪) است (۱۷). علاوه بر این، فراوری تفاله‌ها موجب کاهش کل ماده خشک می‌گردد. لذا از این طریق نیز میزان پروتئین خام بر اساس درصد ماده خشک تا حدودی افزایش می‌یابد. درصد پروتئین خام تفاله فراوری نشده نسبت به مقادیر رایج شده در AFRC (۶) و نیز نسبت به مقدار محاسبه شده توسط آرگور و ایخاتوا (۷) کمتر بود که دلیل آن شاید تفاوت در نوع نمونه‌های مورد استفاده است. در مقایسه با آزمایش شجاع‌الساداتی و همکاران (۲۱) میزان افزایش درصد پروتئین خام پس از عمل‌آوری در این تحقیق بیشتر بود (۲۵/۱) در مقایسه با ۱۶/۸ برای تفاله لیمو و ۲۳/۲ در مقایسه با ۱۸/۲ برای تفاله پرتقال) و در مقایسه با آزمایش بارتودمنز و همکاران (۸)، میزان افزایش درصد پروتئین خام کمتر بود.

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۱ بین درصد پروتئین خام نمونه‌های عمل‌آوری نشده و نمونه‌های عمل‌آوری شده تفاوت معنی‌داری (P < ۰/۰۱) مشاهده شد. دلیل آن افزایش بالای درصد پروتئین نمونه‌ها بعد از عمل‌آوری می‌باشد، به نحوی که پس از عمل‌آوری، درصد پروتئین خام تفاله لیمو ۴ برابر و درصد پروتئین خام تفاله پرتقال حدود ۳/۵ برابر شد. دلیل این افزایش پس از عمل‌آوری، رشد قارچ بر روی تفاله‌ها است. قارچ‌ها بیشتر مواد سهل‌الهضم و لیگنوسلولزی موجود در تفاله را توسط آنزیم‌های خارج سلولی مصرف کرده و تولید انرژی، پروتئین و دی‌اکسیدکربن می‌نمایند (۲۱). قارچ‌ها از سلولز موجود در تفاله مرکبات به‌عنوان منبع کربنی و از منابع از ته افزوده شده به تفاله استفاده کرده و تولید پروتئین می‌کنند. این عمل سبب افزایش درصد پروتئین خام تفاله عمل‌آوری شده می‌گردد (۱۰). یکی از دلایل افزایش

جدول ۶. تجزیه پذیری و مشخصه های تجزیه پذیری پروتئین

تفاله پرتقال			تفاله لیمو			ضریب تجزیه پذیری
مقدار t	عمل آوری شده	خام	مقدار t	عمل آوری شده	خام	
۲۰/۶	۴۰/۶ ^a	۲۵/۱ ^b	۱۷/۷	۳۵/۴ ^a	۲۲/۶ ^b	٪۲ ^۱
۱۹/۷	۳۸/۱ ^a	۲۳/۵ ^b	۲۲/۴	۳۳/۳ ^a	۲۰/۳ ^b	٪۵ ^۲
۲۱/۱	۳۶/۲ ^a	۲۲/۱ ^b	۳۷/۷	۳۲/۱ ^a	۱۹/۶ ^b	٪۸ ^۳
						مشخصه های تجزیه پذیری
۲۲/۷	۲۳/۵ ^a	۱۲/۸ ^b	۱۷/۵	۲۱/۳ ^a	۱۱/۲ ^b	a
۱۱	۱۹/۳ ^a	۱۳/۷ ^b	۱۰/۳	۱۵/۹	۱۲/۶	b
۲۴/۵	۰/۱۶۰۹	۰/۲۴۷۸ ^a	۱۶/۹	۰/۱۸۳۰	۰/۲۱۴۳	c
						ERDP*
۲۵/۵	۸۳/۴ ^a	۱۵/۷ ^b	۲۴/۵	۷۸/۴ ^a	۱۲/۹ ^b	٪۲ ^۱
۲۴/۳	۷۷/۸ ^a	۱۴/۸ ^b	۲۸/۴	۷۳/۷ ^a	۱۲/۱ ^b	٪۵ ^۲
۲۲/۲	۷۳/۵ ^a	۱۴/۱ ^b	۲۷/۴	۷۰/۱ ^a	۱۱/۴ ^b	٪۸ ^۳

۱. میزان عبور مواد خوراکی از شکمبه به روده در سطح نگهداری (بخش/ساعت).

۲. میزان عبور مواد خوراکی از شکمبه به روده در دو برابر سطح نگهداری (بخش/ساعت).

۳. میزان عبور مواد خوراکی از شکمبه به روده در سه برابر سطح نگهداری (بخش/ساعت).

* ضریب تجزیه پذیری مؤثر پروتئین (%).

حروف مختلف در هر ردیف نشان دهنده تفاوت تفاله های مورد آزمایش در صفت مذکور می باشد (P < ۰/۰۱).

نمونه های عمل آوری شده گردیده است. به علاوه، استفاده قارچ از مواد آلی به خصوص دیواره سلولی و هم چنین کربوهیدرات های محلول به عنوان سوبسترا نیز موجب کاهش ماده آلی (جدول ۲) و در نتیجه افزایش نسبی میزان خاکستر خام می شود (۲۱). گزارش شده که پس از عمل آوری نمونه ها با قارچ، درصد سلولز و همی سلولز کاهش یافته است (۲۱)، این مسأله می تواند سبب کاهش درصد ماده آلی شود. درصد خاکستر خام تفاله پرتقال عمل آوری نشده (۶/۵ درصد) در این مطالعه با مقدار به دست آمده توسط شجاع الساداتی و همکاران (۲۱) تفاوت داشت که دلیل آن تفاوت در نوع نمونه مورد استفاده بود. درصد خاکستر خام محاسبه شده در این آزمایش با مقدار محاسبه شده توسط

ماده خشک نمونه ها پس از عمل آوری با قارچ کاهش یافت (جدول ۳). دلیل کاهش ماده خشک پس از عمل آوری، استفاده قارچ از سوبسترا به عنوان یک ماده خوراکی می باشد که به دنبال تنفس قارچ، مقداری از کربن موجود در تفاله به صورت دی اکسید کربن وارد محیط شده و به این ترتیب پس از عمل آوری، میزان ماده خشک نمونه ها کاهش می یابد. فرایند کاهش توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۲۱).

پس از عمل آوری، مقدار خاکستر خام افزایش و مقدار ماده آلی کاهش یافت (P < ۰/۰۵). در طی عمل آوری، برخی منابع مواد معدنی (از جمله فسفر و پتاسیم) به تفاله های اولیه افزوده شد که احتمالاً این عامل باعث افزایش درصد خاکستر خام در

آرگور و ایخاتوا (۷) تقریباً برابر است.

کاهش بیشتر دیواره سلولی در مقایسه با دیواره سلولی بدون همی سلولز به دلیل وجود همی سلولز در ترکیب دیواره سلولی می‌باشد که همی سلولز به خوبی توسط قارچ نروسپورا سیتوفیلا استفاده شده و قارچ آن را تجزیه می‌کند (۲۰). مقادیر دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز نمونه‌ها در تحقیق حاضر با مقادیر ارایه شده توسط AFRC (۶) متفاوت است، که دلیل آن، تفاوت موجود بین نمونه‌های مورد استفاده است. بر خلاف نتیجه به دست آمده در این تحقیق در تحقیقی که سرا و همکاران (۲۰) انجام دادند، درصد دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز پس از عمل‌آوری افزایش یافت (به ترتیب از ۱۴/۵ به ۳۲/۶ و از ۱۱/۲ به ۲۴/۸ درصد برای تفاله لیمو و از ۱۵/۵ به ۳۸/۷ و از ۱۰/۹ به ۳۰/۷ درصد برای تفاله پرتقال)، که دلیل آن احتمالاً تفاوت در نوع قارچ استفاده شده برای عمل‌آوری نمونه‌هاست، در مطالعه آنها از قارچ پنی‌سیلیوم روکفورتی (*Penicillium roqueforti*) استفاده شده بود (۲۰).

قابلیت هضم

قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی هر دو تفاله پس از عمل‌آوری با قارچ به طور معنی‌داری ($P < 0.01$) افزایش یافت. افزایش در قابلیت هضم ماده خشک تفاله لیمو و پرتقال به ترتیب برابر ۱۵/۳ و ۱۲ درصد و افزایش قابلیت هضم ماده آلی به ترتیب برابر ۱۶ و ۱۴ درصد بود. افزایش قابلیت هضم در تفاله‌های عمل‌آوری شده به دلیل کاهش دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز نمونه‌ها (جدول ۲) و افزایش مواد محلول در آب (جدول ۵) بود (۱)، کاهش دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز و افزایش مواد محلول موجب افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه و هضم بیشتر مواد خوراکی شده و این امر نشان دهنده تأثیر مثبت قارچ بر فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه و در نتیجه بر قابلیت هضم مواد خوراکی است (۱). به طور کلی، خوراک تخمیر شده قابلیت هضم بهتری دارد، که دلیل آن وجود میکروارگانیسم‌های مختلف و

آنزیم‌های آنها، در این نوع از خوراک است (۱۶). درصد ماده آلی قابل هضم در ماده خشک و میزان انرژی قابل متابولیسم به ازای هر کیلوگرم ماده خشک نیز پس از عمل‌آوری افزایش یافت که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود. دشتی (۱) نیز در مورد افزایش ضرایب هضمی ماده خشک و آلی تفاله چغندر قند عمل‌آوری شده با قارچ نروسپورا سیتوفیلا نتایج مشابهی به دست آورد، و افزایش ۲۵ درصدی این ضرایب گزارش نموده است.

تجزیه پذیری (*in sacco*)

تجزیه پذیری ماده خشک

بر اساس نتایج به دست آمده (جدول ۵) میزان مواد محلول در آب (بخش a) در تفاله‌های عمل‌آوری شده نسبت به تفاله‌های خام به ترتیب ۱/۲ و ۱/۱ برابر شده است. افزایش میزان مواد محلول در آب پس از عمل‌آوری در تفاله لیمو در سطح ۰/۰۱ و در مورد تفاله پرتقال در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار بود. دلیل افزایش میزان مواد محلول در آب آن است که احتمالاً قارچ با استفاده از آنزیم‌های خود دیواره سلولی تفاله‌های خام را که در آب نامحلول است تجزیه کرده و با تبدیل آن به ترکیبات ساده‌تر و قابل حل در آب سبب افزایش میزان مواد محلول در آب شده است. با افزایش میزان مواد محلول در آب، انرژی بیشتری برای میکروارگانیسم‌های شکمبه فراهم شده و در نتیجه رشد و فعالیت این میکروارگانیسم‌ها بیشتر می‌شود. افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه موجب افزایش تجزیه مواد خوراکی موجود در شکمبه شده که این مسأله در مورد نمونه‌های عمل‌آوری شده به خوبی مشهود است (۱۶).

میزان مواد غیر قابل حل در آب اما قابل تخمیر در شکمبه (بخش b) در نمونه‌های عمل‌آوری شده به میزان اندکی افزایش یافته، اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نیست. هم‌چنین، بین نمونه‌های خام و نمونه‌های عمل‌آوری شده از نظر c (سرعت تجزیه بخش b) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. این مسأله نشان می‌دهد که علی‌رغم افزایش میزان مواد محلول در

پروتئین بخش b نسبت به تفاله‌های پرتقال خام ۱/۴۱ برابر بیشتر بود، اما این افزایش در تفاله لیموی عمل‌آوری شده نسبت به تفاله لیموی خام کمتر و به میزان ۱/۲۷ برابر می‌باشد. علت افزایش میزان بخش b پس از عمل‌آوری کاهش دیواره سلولی و دسترسی بیشتر میکروارگانسیم‌ها به پروتئین است. در مورد c (سرعت تخمیر بخش b) هم بین تفاله پرتقال عمل‌آوری شده و تفاله پرتقال خام تفاوت زیادی وجود داشت، اما بین تفاله لیموی عمل‌آوری شده و تفاله لیموی خام تفاوتی از لحاظ آماری مشاهده نشد. نتایج به‌دست آمده با نتایج دشتی (۱) می‌باشد.

نشخوارکنندگان به‌صورتی متفاوت از حیوانات تک‌معدده‌ای از پروتئین مواد خوراکی استفاده می‌کنند، بدین صورت که بخشی از پروتئین خوراک در شکمبه توسط میکروارگانسیم‌ها تجزیه شده و صرف تولید پروتئین میکروبی می‌شود. همانگونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود بین ERDP نمونه‌های خام و نمونه‌های عمل‌آوری شده تفاوت زیادی وجود دارد ($P < 0.01$). علت افزایش ERDP نمونه‌ها پس از عمل‌آوری از یک طرف به خاطر افزایش درصد پروتئین نمونه‌ها پس از عمل‌آوری و از طرف دیگر افزایش میزان مواد محلول در آب (بخش a) است که باعث فعالیت بیشتر میکروارگانسیم‌های شکمبه و تجزیه بیشتر پروتئین شده است. از طرفی همانگونه که در جدول ۵ مشاهده می‌شود با افزایش سرعت عبور مواد از شکمبه میزان تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین کاهش یافته است زیرا با افزایش سرعت عبور دسترسی میکروارگانسیم‌های شکمبه به مواد خوراکی کاهش می‌یابد. در تحقیق صورت گرفته روی تفاله چغندر قند عمل‌آوری شده با قارچ *نئوروسپورا سیتوفیلا* (۱) نیز نتایج مشابه با نتایج فوق گزارش گردیده است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، عمل‌آوری تفاله مرکبات با قارچ *نوروسپورا سیتوفیلا* باعث بهبود غلظت پروتئین خام و افزایش ضرایب هضمی ماده خشک و ماده آلی می‌گردد، لذا پیشنهاد می‌شود اثر این تفاله‌های عمل‌آوری شده بر عملکرد دام بررسی شود.

آب در نمونه‌های عمل‌آوری شده، بخش قابل تخمیر این نمونه‌ها با سرعتی مشابه با نمونه‌های خام تجزیه شده است. بین میزان مواد محلول در آب و میزان مواد قابل تخمیر در شکمبه در نمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش و مقادیر ارایه شده توسط AFRC (۶) تفاوت وجود دارد که دلیل آن احتمالاً تفاوت بین نمونه‌های استفاده شده در دو آزمایش است. سرعت تجزیه بخش b در هر دو آزمایش یکسان به‌دست آمد.

همان گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، تجزیه‌پذیری نمونه‌های لیمو و پرتقال عمل‌آوری شده نسبت به تفاله‌های خام افزایش یافته است. دلیل افزایش تجزیه‌پذیری ماده خشک نمونه‌ها پس از عمل‌آوری، کاهش درصد دیواره سلولی و دیواره سلولی بدون همی سلولز آنها است، هم‌چنین افزایش مواد محلول در آب پس از عمل‌آوری باعث می‌شود که میکروارگانسیم‌های شکمبه دسترسی بیشتری به منابع انرژی داشته و با راندمان بیشتری مواد غذایی را تجزیه کنند با توجه به این موضوع می‌توان نتیجه گرفت که دام می‌تواند به راحتی مقادیر زیادی از تفاله لیمو و پرتقال عمل‌آوری شده را در جیره روزانه مصرف کند بدون آن که میزان خوراک مصرفی روزانه کاهش یابد. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق با نتایج دشتی (۱) مطابقت دارد.

تجزیه‌پذیری پروتئین

همان گونه که در جدول ۶ ملاحظه می‌شود میزان پروتئین محلول در آب (بخش a) پس از عمل‌آوری تفاله‌های لیمو و پرتقال به میزان زیادی افزایش یافت. مقدار بخش a تفاله لیموی عمل‌آوری شده ۱/۸۹ برابر تفاله لیموی خام و مقدار بخش a تفاله پرتقال عمل‌آوری شده ۱/۸۴ برابر تفاله پرتقال خام بود. تجزیه دیواره سلولی تفاله‌ها توسط قارچ سبب افزایش بخش محلول می‌شود. افزایش میزان مواد محلول در آب موجب تأمین انرژی اولیه بیشتری برای میکروارگانسیم‌های شکمبه شده و از این طریق موجب تجزیه بیشتر مواد خوراکی موجود در شکمبه و افزایش مصرف خوراک توسط دام می‌شود (۱۰). در تفاله‌های پرتقال عمل‌آوری شده میزان

منابع مورد استفاده

۱. دشتی، م. ۱۳۸۰. تعیین ارزش غذایی تفاله چغندر قند عمل‌آوری شده با قارچ *نئوروسپورا سیتوفیلا* با استفاده از گاوهای طالشی جراحی شده. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
۲. محمدپور، ا. ۱۳۷۶. غنی‌سازی پروتئین تفاله مرکبات به روش تخمیر حالت جامد. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
۳. معاونت امور دام جهاد سازندگی. ۱۳۷۸. فرآورده‌های دامی از واردات تا خودکفایی. پیام جهاد سازندگی ۸ (۳): ۲۶-۳۰.
4. AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists, 1990. Official methods of analysis, Fourteenth Edition. AOAC, Washington, DC.
5. Ammerman, C. B. and P. R. Henry. 1991. Citrus and vegetable products for ruminant animals. *In: Proceedings, Alternative Feeds for Dairy and Beef Cattle*, St Louis, MO.
6. AFRC, 1993. Energy and Protein Requirements of Ruminants. CAB International, Wallingford, UK.
7. Aregheore, E. M. and J. Ikhatua. 1999. Nutritional evaluation of some tropical crop residues: *In vitro* organic matter, neutral detergent fiber, true dry matter digestibility and metabolizable energy using the Hohenheim gas test. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 5:747-51.
8. Barreto de Menezes, T. J., J. G. de, T. Salva, V. L. Baldini, R. S. Papini and A. M. Sales. 1989. Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation. *Process Biochem.* 167-171.
9. Forage, A. J. and R. C. Richelato. 1979. *Microbial Biomass*. Academic Press, London.
10. Gibriel, A. Y., R. M. Mahmoud, M. Goma and M. Abou-Zeid. 1981. Production of single cell protein from cereal by-products. *Agric. Wastes* 3: 229-240.
11. Grewal, H. S., K. L. Kalra and S. S. Kahlon. 1990. Citrus (Kinnow-mandarin) residue as potential substrate for single cell protein. *J. Res. Punjab Agric. Univ.* 27:90-96.
12. Griffiths, B. and S. H. Done. 1991. Citrinin as a possible cause of the pruritis, pyrexia, haemorrhagic syndrome in cattle. *Vet. Record.* 129:113-117.
13. Kayouli, C. and L. Stephen. 2000. Silage from by-products for small holders. *In: Silage Making in the Tropics with Particular Emphasis on Small holders*. FAO Plant Production and Protection. Paper 161.
14. Labaneiah, M. E. O., S. A. Abou-Donia, M. S. Mohamed and E. M. EL-Zalaki. 1979. Utilization of citrus wastes for the production of fungal protein. *J. Food Technol.* 14: 95-100.
15. Lequerica, J. L. and B. Lafuente. 1977. Citrus by-products utilization; II. Semisolid fermentation of orange peels by candida utilities. *Rev. Agroquim. Technol. Aliment.* 17:77.
16. McDonald, P., R. A. Edwards., J. F. D. Greenhalgh and C. A. Morgan. 1995. *Animal Nutrition*. Addison Wesley Longman.
17. Moo-Young, M., Y. Chisti and D. Vlach. 1993. Fermentation of cellulosic materials to mycoprotein foods. *Biochem. Adv.* 11: 469-479.
18. Nocek, J. E. 1988. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A Review. *J. Dairy Sci.* 77:2051- 2069.
19. Raihani, N., W. N. Garrett and R. A. Zinn. 1993. Effects of source of supplemental nitrogen on the utilization of citrus pulp based diets by sheep. *J. Anim. Sci.* 71: 2310-21.
20. Scerra, V., A. Caridi, F. Foti, M. C. Sinatra and P. Caparra. 2000. Changes in chemical composition during the colonization of citrus pulps by a dairy *Penicillium roquefortii* strain. *Bioresource Technol.* 72:197-198.
21. Shojaosadati, S. A., R. Faraidouni, A. Madadi-Nouei and I. Mohamadpour. 1999. Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*. *Resourc. Conserv. and Recycl.*
22. Suha Sukan, S. and B. F. A. Yasin. 1986. SCP production from citrus wastes by using constituted mixed fungal inoculum. *Process Biochem.* 21: 50-53.
23. Tilley, J. M. A and R. A. Terry. 1963. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassland. Soc.* 18:104-111.
24. Van Soest, P.J., J.B. Robertson, B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
25. Wing, J. M. 1982. Citrus feedstuffs for dairy cattle. *Florida Agricultural Express State Bull.* Page 829.