

## RAZGRADLJIVOST STANIČNIH STIJENKI U TALIJANSKOG LJULJA, CRVENE DJETELINE I INKARNATKE OCIJENJENA RAZLIČITIM POSTUPCIMA

## DEGRADABILITY OF CELL WALLS IN ITALIAN RYEGRASS, RED CLOVER AND CRIMSON CLOVER EVALUATED BY DIFFERENT METHODS

D. Babnik, Mojca Resnik

Izvorni znanstveni članak  
UDK: 636.085.2  
Primljeno: 5. travanj 1997.

### SAŽETAK

S ciljem da se istraži razgradljivost staničnih stijenki talijanskog ljulja, crvene djeteline i inkarnatke, na uzorcima prvog otkosa različite starosti provedeni su in sacco razgradljivost, test fermentabilnosti i in vitro enzimatska probavljivost. Istraživanja pokazuju da su razlike u razgradljivosti staničnih stijenki (NDF) nakon 16 sati inkubacije u buragu kod talijanskog ljulja (49,1%), crvene djeteline (50,9%) i inkarnatke (47,3%) neznčajne. Razgradljivost hemiceluloze je bila najveća kod talijanskog ljulja (47,1%), kod inkarnatke 39,4% i najmanja kod crvene djeteline (29,5%). Nasuprot tome razgradljivost celuloze je bila veća kod crvene djeteline nego kod ljulja i inkarnatke. Test fermentabilnosti proveden na uzorcima kojima su bile prethodno ekstrahirane vodotopljive tvari, pokazao se interesantnim. Procjena in vitro probavljivosti staničnih stijenki enzimatskom metodom kod pojedinih uzoraka može biti pristrana, a metoda se pokazala neadekvatnom i za ocjenjivanje dinamike razgradnje. Veći sadržaj lignina kod inkarnatke nije imao negativnog utjecaja na razgradljivost staničnih stijenki.

### UVOD

Ograničena razgradljivost i probavljivost staničnih stijenki po mišljenju nekih znanstvenika jedna je od glavnih prepreka za veću proizvodnju mlijeka i mesa u svijetu. Razgradljivost je ovisna o brojnim čimbenicima, među ostalim i o lignifikaciji i matričnoj strukturi, odnosno prostornoj povezanosti lignina, celuloze i hemiceluloze. Upravo matrična struktura celuloze utječe na brzinu, odnosno dinamiku njene razgradnje (Van Soest, 1994.).

Poznavanje dinamike razgradnje staničnih stijenki omogućava nove pristupe proučavanju kakvoće voluminozne krme kao i ka manipulaciji za njeno poboljšanje (Fisher i sur., 1989.).

Postoje različite metode kojima se ocjenjuju probavljivost i razgradljivost krme. Budući da kod ocjenjivanja dinamike razgradnje kemijske metode

Dr. Drago Babnik, dipl. ing. kmet.; mag. Mojca Resnik, dipl. ing. kem., Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana, Slovenija.

nisu vjerodostojne (Orskov i Ryle, 1990.), značajno mjesto i u buduću zauzimat će različite in vitro metode (Menke i sur., 1979.; Fisher i sur., 1989.) i in sacco metoda (Ørskov i McDonald, 1979.).

Pojedine metode za ocjenjivanje hranjive vrijednosti krme, odnosno razgradljivosti i dinamike razgradnje međusobno se bitno razlikuju. U tom vidu provedeno je istraživanje razgradljivosti staničnih stijenki vrlo različitih izvora različitim metodama. Istraživan je dakle i utjecaj termina košnje na razgradljivost NDF u talijanskog ljulja, crvene djeteline i inkarnatke.

## MATERIJAL I METODE

Uzorci talijanskog ljulja, crvene djeteline i inkarnatke prvog otkosa sakupljani su na pokusnom polju Jable (Slovenija) jednom tjedno od 23. travnja do 21. svibnja. Pokusne parcele bile su pognojene kod sjetve s 550 kg gnojiva NPK (9-18-18) (50 kg N/ha), a u rano proljeće samo talijanski ljulj sa 60 kg N/ha. Uzorci su bili sušeni na 60 °C, zatim za kemijske analize i in vitro određivanje razgradljivosti NDF samljeveni u Wiley mlinu s mrežom otvora od 1 mm, a za određivanje in sacco razgradljivosti NDF uzorci su samljeveni kroz mrežu otvora 5 mm. Analiza strukturnih ugljikohidrata obavljena je detergent metodom Goering i Van Soest, 1970. Rezultati kemijskih analiza i razgradljivosti bjelančevina već su objavljeni (Babnik i Resnik, 1991.), a rezultati komparativnog istraživanja razgradljivosti NDF različitim metodama prikazani su u ovom radu.

In sacco razgradljivost strukturnih ugljikohidrata izvedena je na fistuliranim i zasušenim kravama. Krmni obrok u vrijeme pokusa bio je sastavljen od 2 kg krmne smjese s 18% sirovih bjelančevina, mineralno-vitaminskog dodatka te sijena srednje kakvoće po volji. Vrećice od poliestera, veličine 12 x 20 cm sa cca 7 g uzorka u svakoj, inkubirane su u buragu u trajanju od 8, 16 i 24 sata. Nakon toga vrećice su ispirane hladnom vodom u stroju za pranje rublja 30 min i sušene na 60°C do konstantne težine. Razgradljivost NDF, ADF, celuloze i hemiceluloza određena je vaganjem i analizom uzorka prije i poslije inkubacije.

Kod uzoraka proveden je test fermentabilnosti po Menke i sur., 1979. Po njihovoj preporuci pripremljena je puferska otopina te mješavina buražnog soka i puferske otopine (1: 2). Buražni sok je bio uzet od fistulirane krave, koja je bila hranjena jednako kao u vrijeme in sacco pokusa. U injekcijske brizge je bilo izvagano po 200 mg uzorka i dodano 30 ml mješavine buražnog soka i puferske otopine. Injekcijske brizge bile su potopljene 48 sati u vodnu kupku na 39°C a dinamika proizvodnje plina mjerena je kroz cijelo razdoblje inkubacije.

Proizvodnja plina, mjerena po metodi Menke i sur., 1979, provedena je i na uzorcima kojima su bile predhodno ekstrahirane vodotopljive tvari. Uzorci su bili zatvoreni u vrećice od poliestera i onda ispirani toplom vodom (40°C) u stroju za pranje rublja 2 sata te zatim sušeni. U injekcijske brizge izvagano je po 200 mg ispranog uzorka i zatim inkubirano 72 sata.

Razgradljivost NDF ocijenjena je i in vitro enzimatskom metodom. Upotrijebljena je in vitro enzimatska metoda za ocjenjivanje probavljivosti organske tvari prema Rihs, 1985. Uzorci su bili najprije inkubirani u otopini (HCl) pepsina, a onda u otopini celuloze u fosfatnom puferu. Na ostacima uzoraka nakon različitih dužina inkubacije (6, 16, 24, 48 sati) utvrđen je sadržaj NDF.

Obrada podataka obavljena je statističkim programom Statgraphics, 1991.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati in sacco razgradljivosti NDF, ADF, celuloze i hemiceluloze prikazani su na tablici 1. Razlike u razgradljivost NDF između vrste krme su male, i tek nakon 24 sata inkubacije u buragu pokazala se niža razgradljivost NDF kod inkarnatke nego kod talijanskog ljulja ( $p < 0.05$ ). Neznačajne razlike u razgradljivosti nakon 16 sati inkubacije ustanovljene su i kod ADF. Razgradljivost celuloze bila je veća ( $p < 0.05$ ) kod crvene djeteline (58%) nego kod talijanskog ljulja (51%) i inkarnatke (51%), a nasuprot tome razgradljivost hemiceluloze veća je ( $p < 0.05$ ) kod talijanskog ljulja (47%) nego kod crvene djeteline (30%).

Tablica 1. In sacco razgradljivost staničnih stijenki (NDF), ADF, celuloze i hemiceluloze (%)

Table 1. In sacco degradability of cell walls (NDF), ADF, cellulose and hemicellulose (%)

Termin košnje - Date of cutting	Trajanje inkubacije u buragu (sati)-Incubation time in rumen (hours)								
	8	16	24	8	16	8	16	16	
	NDF			ADF		Celuloza Cellulose		Hemiceluloza Hemicellulose	
30. 04.	32.7 <sup>st</sup>	64.2	70.0	33.4 <sup>g</sup>	66.1	37.0 <sup>l</sup>	69.8	51.4 <sup>p</sup>	
07. 05.	31.0 <sup>a</sup>	55.7	62.4	33.2 <sup>g</sup>	57.2	36.7 <sup>1</sup>	60.9	42.9 <sup>pr</sup>	
14. 05.	9.4	35.9 <sup>c</sup>	37.8	16.9	39.4 <sup>l</sup>	18.2	40.7 <sup>n</sup>	21.2	
21. 05.	22.3	40.6 <sup>c</sup>	45.0	24.2	40.7 <sup>l</sup>	26.4	41.8 <sup>n</sup>	39.1 <sup>t</sup>	
Vrsta - Species									
Talijanski ljulj - Italian rye-grass	26.7 <sup>b</sup>	49.1 <sup>d</sup>	55.7 <sup>o</sup>	22.8 <sup>h</sup>	49.9 <sup>k</sup>	24.1 <sup>m</sup>	51.1 <sup>o</sup>	47.1 <sup>s</sup>	
Crvena djetelina - Red clover	20.5 <sup>b</sup>	50.9 <sup>d</sup>	54.0 <sup>of</sup>	31.5 <sup>i</sup>	54.1 <sup>k</sup>	35.3	57.7	29.5	
Inkarnatka - Crimson clover	24.3 <sup>b</sup>	47.3 <sup>d</sup>	51.7 <sup>f</sup>	26.4 <sup>hi</sup>	48.5 <sup>k</sup>	29.3 <sup>m</sup>	51.1 <sup>o</sup>	39.4 <sup>s</sup>	

1) jednako označene vrijednosti kod istog vremena inkubacije međusobno se ne razlikuju ( $p>0.05$ ) - values with the same superscript and the same time of incubation do not differ between themselves ( $p>0.05$ )

Tablica 2. Probavljivost staničnih stijenki (NDF) ocijenjena in vitro enzimatskom metodom (%)

Table 2. Degradability of cell walls (NDF) estimated by in vitro enzymatic method (%)

Termin košnje – Date of cutting	Trajanje inkubacije (sati) - Incubation time (hours)			
	6	16	24	48
30. 04.	39.5 <sup>st1</sup>	49.0 <sup>a</sup>	49.9 <sup>a</sup>	55.3
07. 05.	36.4 <sup>a</sup>	43.7 <sup>ab</sup>	44.1 <sup>a</sup>	46.1 <sup>a</sup>
14. 05.	27.5 <sup>bc</sup>	38.9 <sup>bc</sup>	39.8 <sup>ab</sup>	41.3 <sup>a</sup>
21. 05.	23.7 <sup>c</sup>	31.0 <sup>c</sup>	31.4 <sup>b</sup>	33.0
Vrsta – Species				
Talijanski ljulj – Italian ryegrass	40.1	48.2 <sup>a</sup>	48.8 <sup>c</sup>	50.9 <sup>b</sup>
Crvena djetelina – Red clover	26.4 <sup>d</sup>	34.0 <sup>d</sup>	34.7 <sup>d</sup>	36.7 <sup>c</sup>
Inkarnatka – Crimson clover	28.8 <sup>d</sup>	39.9 <sup>de</sup>	40.5 <sup>cd</sup>	44.2 <sup>bc</sup>

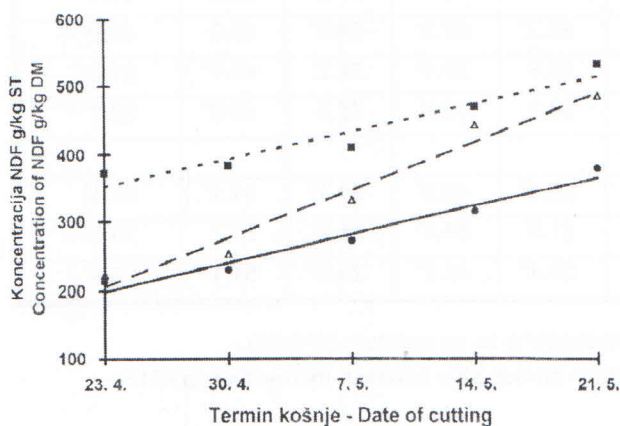
1) jednako označene vrijednosti kod istog vremena inkubacije međusobno se ne razlikuju ( $p>0.05$ ) - values with the same superscript and the same time of incubation do not differ between themselves ( $p>0.05$ )

Probavljivost NDF utvrđena in vitro enzimatskom metodom u prosjeku manja je nego ona utvrđena in sacco metodom. Rezultati su očekivani, jer su kod enzimatske metode odsutni hemicelulolitični enzimi, a posljedica su i drugih utjecaja Van

Soest, 1994. Pored toga enzimatska probavljivost NDF kod crvene djeteline manja je ( $p<0.05$ ) nego kod talijanskog ljulja (tablica 2). In sacco metoda dakle drukčije ocijenjuje razgradljivost NDF u pojedine vrste nego in vitro enzimatska metoda.

Grafikon 1. Koncentracija NDF kod prvog otkosa talijanskog ljulja (■), crvene djeteline (●) i inkarnatke (Δ), crvene djeteline i inkarnatke u ovisnosti o terminu košnje

Graph 1. NDF concentration at first cutting of Italian rye-grass (■), red clover (●) and crimson clover (Δ) depending on date of cutting

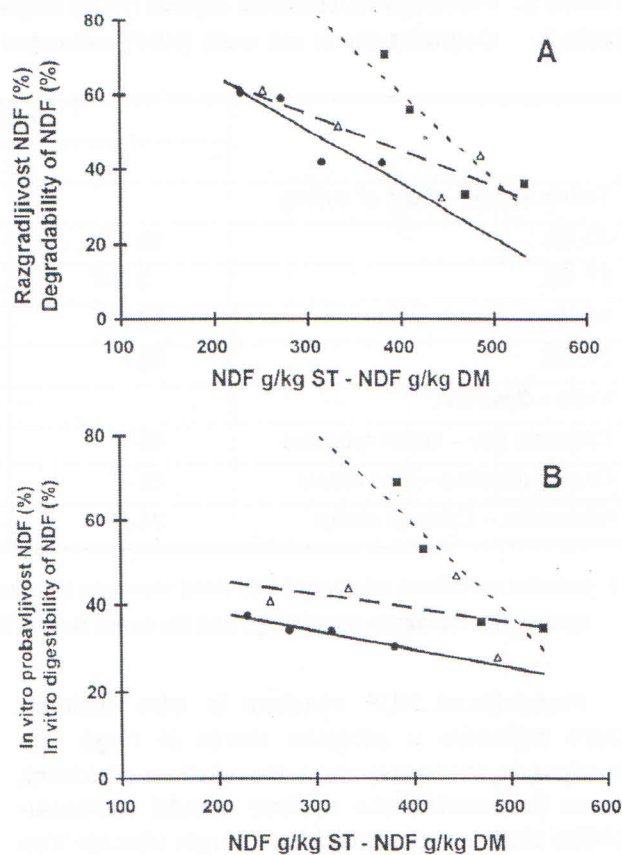


Starenjem krme povećava se sadržaj strukturalnih ugljikohidrata. Na grafikonu 1 prikazane su koncentracije NDF u ovisnosti o starosti. Talijanski ljulj ima najveći sadržaj NDF a crvena djetelina najmanji. Kod inkarnatke koncentracija NDF kretala se između ljulja i djeteline ali se starenjem najbrže povećavala. Za inkarnatku je karakteristična i srazmjerno velika koncentracija lignina. Povećanjem sadržaja NDF, odnosno starenjem biljaka, smanjuje se i razgradljivost strukturalnih ugljikohidrata. Najbrže se razgradljivost NDF (grafikon 2-A) smanjuje kod ljulja a najsporije kod inkarnatke. Slično važi i za in sacco razgradljivost celuloze i ADF. Utjecaj starenja na enzimatsku probavljivost NDF (grafikon 2-B) uočljiv je samo kod talijanskog ljulja dok kod crvene djeteline i inkarnatke starost biljke, odnosno sadržaj NDF, nije imao većeg utjecaja. Enzimatskom metodom je prije svega podcijenjena probavljivost NDF kod uzoraka inkarnatke i crvene djeteline sakupljenih u početnom razdoblju rasta (tablica 2; grafikon 2-B). Kod uzoraka inkarnatke i crvene djeteline, pokošenih 30. travnja i 7. svibnja, enzimatska probavljivost NDF kretala se oko 40 do 45% dok je in sacco razgradljivost bila oko 55%.

Utjecaj starosti biljke na enzimatsku in vitro probavljivost NDF može se do neke mjere ispraviti npr. regresijskom vezom između in vitro i in vivo probavljivosti prema Van der Meeru (cit. Gruber i sur., 1997.), ali se ne može ispraviti i različiti utjecaj vrste biljke na probavljivost. U tom pogledu enzimatska metoda može u određenim uvjetima ocijeniti probavljivost NDF dosta pristrano.

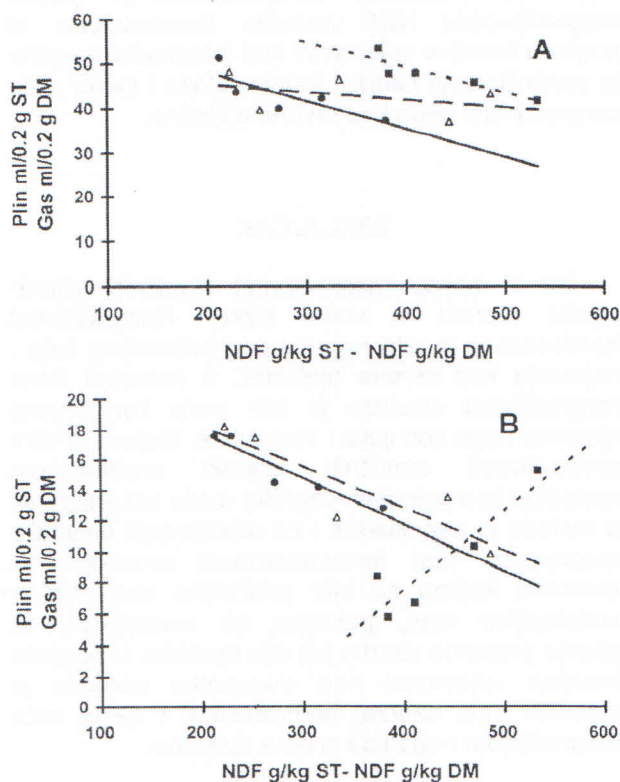
Grafikon 2. In sacco razgradljivost NDF (A) i in vitro enzimatska probavljivost NDF (B) nakon 16 sati inkubacije kod talijanskog ljulja (■), crvene djeteline (●) i inkarnatke (Δ) u ovisnosti o koncentraciji NDF

Graph 2. In sacco NDF degradability (A) and in vitro NDF enzymatic digestibility (B) after 16 hours of incubation at Italian rye-grass (■), red clover (●) and crimson clover (Δ) depending on NDF concentration



**Grafikon 3.** In vitro proizvodnja plina u 24 sata inkubacije kod neekstrahiranih uzoraka (A) i uzoraka kojima su bile ekstrahirane vodotopljive tvari (B) talijanskog ljulja (■), crvene djeteline (●) i inkarnatke (Δ) u ovisnosti o koncentraciji NDF

**Graph 3.** In vitro gas production in 24 hours of incubation in unextracted samples (A) and in samples with extracted water-soluble substances (B) of Italian ryegrass (■), red clover (●) and crimson clover (Δ) in depending on NDF concentration



Utjecaj vrste i starosti biljke na razgradljivost također je proučavana in vitro metodom mjerenja proizvodnje plina koji nastaje kod inkubacije uzoraka sa buražnim sokom i puferom u injekcijskim brizgama. Na grafikonu 3-A može se uočiti utjecaj koncentracije NDF, odnosno starosti biljke, na količinu plina nakon 24 sata inkubacije. Starenjem krme smanjuje se proizvodnja plina. Najmanja proizvodnja utvrđena je kod crvene

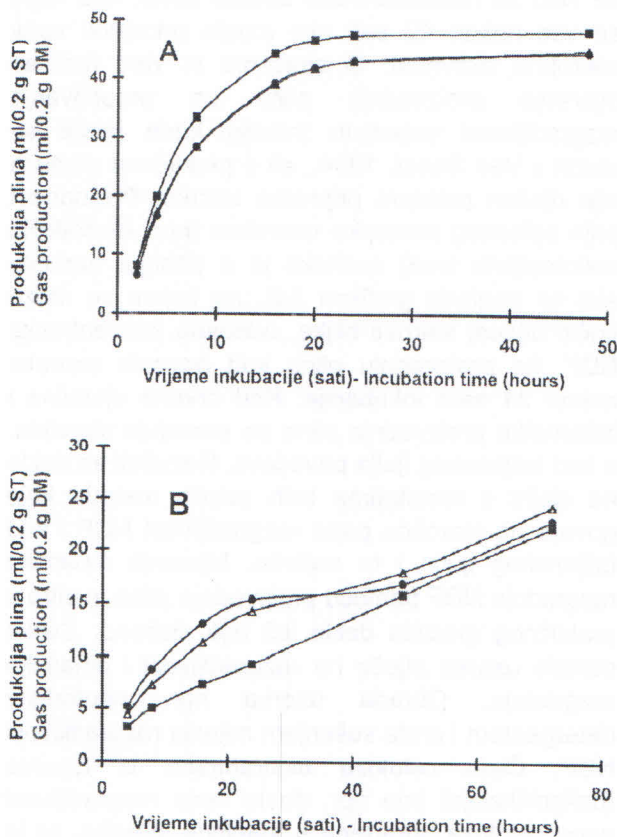
djeteline, najveća kod talijanskog ljulja a kod inkarnatke proizvodnja plina pada najsporije sa starošću. Rezultati su prilično slični rezultatima in sacco razgradljivosti NDF.

Dinamika razgradnje krme može se dosta dobro ocijeniti mjerenjem proizvodnje plina kroz dalje razdoblje. Kod ljulja proizvodnja plina bila je najveća i najbrža, a kod inkarnatke i djeteline manja (grafikon 4-A). Tim principom i metodom ne može se mjeriti razgradljivost NDF, jer je doprinos staničnih stijenki ka proizvodnji plina dosta malen. Pretežan dio plina tvori se do 16 sati inkubacije, a u početnom se razdoblju prije svega vrši razgradnja lakotopljivih ugljikohidrata i bjelančevina. Imajući u vidu taj moment uzorci su ispirani vodom, tako da su odstranjene vodotopljive tvari i isprani uzorci izloženi mikrobnj razgradnji. Proizvodnja plina na ispranim uzorcima (grafikon 4-B) bila je u prosjeku najbrža i najveća kod crvene djeteline, malo manja kod inkarnatke a najsporija i najmanja kod talijanskog ljulja. Kod tih uzoraka proizvodnja plina je bila dosta uočljiva i nakon 70 sati inkubacije, što ne važi za neekstrahirane uzorke krme, kod kojih se već nakon 40 sati nije mogla primijetiti veća mikroba aktivnost. O značenju in vitro metode mjerenja proizvodnje plina za proučavanje razgradljivosti pojedinih frakcija krme može se složiti s Van Soest, 1994., ali s praktičnog gledišta nije riješen problem pripreme uzorka. Prikadnost prije opisanog postupka uzorcima (npr. ekstrakcija vodotopljivih tvari) svakako je u pitanju, naročito ako se pogleda grafikon 3-B, na kojem se može uočiti utjecaj starosti biljke, odnosno koncentracije NDF, na proizvodnju plina kod ispranih uzoraka nakon 24 sata inkubacije. Kod crvene djeteline i inkarnatke proizvodnja plina se smanjuje starošću, a kod talijanskog ljulja povećava. Rezultati se dakle ne slažu s rezultatima svih ostalih metoda koje govore da starošću pada razgradljivost NDF i kod talijanskog ljulja i to najbrže. Mjerenje dinamike razgradnje NDF pomoću proizvodnje plina in vitro s praktičnog gledišta dakle još nije riješeno. Svaka obrada uzorka utječe na razgradljivost i dinamiku razgradnje. Obrada uzorka npr. neutralnim detergentom i onda sušenjem mijenja razgradljivost NDF. Čista celuloza ekstrahirana iz lucerne (delignifikacija) ima npr. dosta veću razgradljivost nego celuloza ugrađena u stanične stijenke, ali je

brzina njene razgradnje sporija (Van Soest, 1994.). Pored kemijske obrade na brzinu razgradnje utječe i obično mljevenje uzorka, čime se povećava površina enzimima dostupnih mjesta u staničnoj stijenci. Tako je i ispiranje uzoraka vodom vjerojatno do neke mjere promijenilo razgradljivost i dinamiku razgradnje NDF. Mogao se promijeniti i sadržaj nekih tvari u NDF, npr. tanina, a ujedno se postavlja i pitanje, da li je kod svih vrsta biljaka slična i vodotopljivost pojedinih brzorazgradljivih tvari.

Grafikon 4. Kumulativna proizvodnja plina kod neekstrahiranih uzoraka (A) i uzoraka kojima su bile ekstrahirane vodotopljive tvari (B) talijanskog ljulja (■), crvene djeteline (●) i inkarnatke (Δ)

Graph 4. Cumulative gas production in unextracted samples (A) and in samples with extracted water-soluble substances (B) of Italian rye-grass (■), red clover (●) and crimson clover (Δ)



Za mjerenje dinamike razgradnje NDF nije prikladna ni enzimatska in vitro metoda. Na tablici 2 vidi se da je već nakon 6 sati inkubacije probavljeno 75 do 80% NDF i produžavanje inkubacije ne doprinosi bitno većoj probavljivosti. Razlike u probavljivosti NDF između 16, 24 i 48 sati inkubacije su minimalne i nisu značajne.

Na razgradljivost staničnih stijenki dakle utječu starost i vrsta biljke. Razgradljivost NDF inkarnatke kreće se između razgradljivosti NDF kod ljulja i crvene djeteline. Babnik i Resnik-Čepon, 1991. utvrdili su, da se razgradljivost suhe tvari kod inkarnatke ne razlikuje od razgradljivosti kod ljulja unatoč većem sadržaju lignina. Niža topivost suhe tvari kod inkarnatke kompenzirana je većom razgradljivošću NDF naročito hemiceluloze. U pogledu hranjive vrijednosti kod inkarnatke naročito je zanimljiv veći sadržaj hemiceluloze i njena veća razgradljivost nego kod crvene djeteline.

## ZAKLJUČAK

Na in sacco razgradljivost staničnih stijenki utječu starost i vrsta biljke. Razgradljivost hemiceluloze je bila najveća kod talijanskog ljulja i najmanja kod crvene djeteline, a nasuprot tome razgradljivost celuloze je bila veća kod crvene djeteline nego kod ljulja i inkarnatke. Ocjena in vitro probavljivosti staničnih stijenki enzimatskom metodom kod pojedinih uzoraka može biti pristrana, a metoda je neprikladna i za ocjenjivanje dinamike razgradnje. Test fermentabilnosti proveden na uzorcima kojima su bile prethodno ekstrahirane vodotopljive tvari, pokazao se zanimljivim, ali pitanje pripreme uzorka još nije riješeno. U pogledu hranjive vrijednosti kod inkarnatke naročito je zanimljiv veći sadržaj hemiceluloze i njena veća razgradljivost nego kod crvene djeteline.

## LITERATURA

1. Babnik, D., M. Resnik (1991.): Kemična sestava in hranilna vrednost inkarnatke, črne detelje ter mnogocvetne ljulke ob prvi košnji. Zb. Biotehniške fak., Univ. v Ljubljani, Kmetijstvo (Živinoreja), 58:135-148.
2. Fisher, D. S., J. C. Bruns, K. R. Pond (1989): Kinetics of in vitro cell-wall disappearance and in vivo digestion. *Agron. J.* 81:25-33.

3. Goering, H. K., P. J. Van Soest (1970): Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some application). US Dep. Agric. Handb., No. 379.
4. Gruber, L., A. Schauer, Th. Guggenberger (1997): Bedeutung der Grundfutterqualität und deren Bestimmung durch in vitro- und in vivo- Methoden. Bericht über das alpenländische Expertenforum »Grundfutterqualität und Grundfutterbewertung«, BAL Gumpenstein, 21.-22. Jänner 1997, 49-80.
5. Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, W. Schneider (1979): The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. J. Agric. Sci. 93:217-222.
6. Orskov, E. R., M. Ryle (1990): Energy nutrition in ruminants. Elsevier applied science London and New York, 149.
7. Orskov, E. R., I. McDonald (1979): The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. 92: 499-503.
8. Rihs, T. (1985): In vitro Verdaulichkeit der organischen Substanz (IVOS). Methodenblatt. FAG, CH-1 725 Posieux, Schweiz. 4 s.
9. Statgraphics (1991): Statistical graphics system by Statistical Graphics Corporation, STSC Inc. Version 5, Rockville.
10. Van Soest, P.J. (1994): Nutritional ecology of the ruminant. Cornell university press-Ithaca and London (second edition), 476 s.

#### SUMMARY

First cut samples of different maturity were submitted to in sacco degradability, fermentability test and in vitro enzymatic digestibility in order to study degradability of cell walls of Italian rye-grass, red clover and crimson clover. Investigations showed insignificant differences in degradability of cell walls (NDF) after 16 hours incubation in the rumen in Italian rye-grass (49.1%), red clover (50.9%) and crimson clover (47.3%). Degradability of hemicellulose was the highest in Italian rye-grass (47.1%), in crimson clover it was 39.4% and it was the lowest in red clover (29.5%). On the other hand, degradability of cellulose was higher in red clover than in Italian rye-grass and crimson clover. Fermentability test carried out on samples in which water-soluble substances were extracted previously proved interesting. Estimation of in vitro digestibility of cell walls using enzymatic method in particular samples may be partial and it was found inadequate for the evaluation of degradation dynamics. Higher lignin content in crimson clover did not influence the degradability of cell walls negatively.