

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**COMENTE SOBRE O EFEITO DOS IONÓFOROS SOBRE O
FLUXO DE PEPTÍDEOS E AMINOÁCIDOS NO DUODENO:
CASEÍNA HIDROLISADA X PROTEÍNA DIETÉTICA**

Trabalho apresentado como parte das
exigências do Exame de Qualificação
de Doutorado em Zootecnia

Professor Examinador: Augusto César de Queiroz
Aluno: Luciano da Silva Cabral

I – INTRODUÇÃO:

Como conseqüência da fermentação pré-gástrica, os ruminantes têm seu requisito em aminoácidos satisfeito por duas principais fontes: a proteína microbiana sintetizada no rúmen, a qual é considerada como sendo de boa qualidade em função do seu perfil em aminoácidos e digestibilidade intestinal; e a proteína dietética que escapa à fermentação ruminal, que é digerida no intestino delgado.

Adicionalmente, os microrganismos do rúmen convertem compostos nitrogenados (N) não-protéicos (NNP) de origem dietética ou endógena, em proteína verdadeira. A utilização do N endógeno, cujo evento é conhecido como reciclagem de N, o qual chega ao rúmen na forma de uréia através da saliva e difusão pelo epitélio ruminal, torna-se de vital importância em condições de baixa ingestão de N. O NRC (1985) considera que o N reciclado pode atingir 70% da proteína ingerida em dietas com menos de 5% de PB. Desta forma, a reciclagem de N no rúmen torna os ruminantes mais eficientes na conservação da proteína do que outras espécies em baixos planos de nutrição (KENNEDY e MILLIGAN, 1980).

Entretanto, o contrário pode ser dito quando se tratam de rebanhos de elevado potencial genético, onde tem-se os requisitos em proteína aumentado. Nestas circunstâncias, geralmente são utilizados suplementos protéicos de alta qualidade, os quais por serem extensivamente degradados no rúmen, podem ainda não atender os requisitos protéicos destes animais. Este problema decorre, em parte, da falta de acoplamento entre a degradação e a síntese de proteína microbiana, haja vista, a taxa na qual a energia é gerada para crescimento microbiano, não é em sua maioria, sincronizada com a mais rápida degradação protéica. Desta forma, quantidades substanciais de aminoácidos e peptídeos resultantes da proteólise são deaminados e utilizados na produção de energia, ao invés de serem incorporados na proteína microbiana. Com isso, uma parcela significativa da proteína é convertida a amônia, a qual pode difundir-se através do epitélio ruminal e ser excretada na urina como uréia. Como resultado disto, a eficiência de utilização da proteína nos ruminantes, sob estas condições, é substancialmente inferior à dos não-ruminantes (Beitz, 1972, citado por BRODERICK et al., 1991), refletindo desta forma, na relação proteína:energia metabolizável da dieta (NRC, 1989), a qual, é em vacas de leite, 50% superior a de

porcas lactantes (NRC, 1988) muito embora, a relação proteína:energia do leite secretado por ambas as espécies seja semelhante.

Com base no que foi colocado acima e, considerando que os suplementos protéicos são os ingredientes mais onerosos na alimentação animal, o controle da taxa e da extensão de degradação da proteína dietética no rúmen tem despertado grande interesse dos nutricionistas de ruminantes.

II – DEGRADAÇÃO DA PROTEÍNA:

As proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, desta forma, para serem utilizados pelos microrganismos do rúmen, necessitam de serem quebradas à moléculas mais simples, como aminoácidos ou pequenos peptídeos. Este processo de quebra da molécula protéica em suas unidades formadoras (aminoácidos), é comumente denominado proteólise, que envolve a ação de moléculas com atividade de hidrólise (enzimas), num processo envolvendo água. Na nutrição de ruminantes, o desaparecimento da proteína da dieta por ação microbiana é referido como **degradação** ou **fermentação**, entretanto, os termos têm significados diferentes, pois, o primeiro, refere-se ao processo geral, no qual incluem-se a solubilização, hidrólise extracelular, transporte de aminoácidos ou peptídeos, deaminação e a formação de produtos finais (NH₃, AGVs, CO₂, CH₄); já o segundo termo, refere-se somente aos passos finais do processo, ou seja, deaminação e formação de produtos finais.

O processo de degradação da proteína é ilustrado na Figura 1, donde pode ser visualizado que o primeiro passo envolve a hidratação e solubilização da proteína, uma vez que o passo seguinte depende da presença de água. A proteólise é o segundo passo teoricamente, mas que depende da adsorção prévia do microrganismo ao substrato por meio de suas estruturas específicas de aderência (exopolissacarídeos ou glicocálix), uma vez que a maior parte das proteases estão aderidas à superfície do microrganismo, numa estratégia de concentrar os produtos resultantes da proteólise. Adiante, os aminoácidos e peptídeos (até 600 daltons de peso molecular) resultantes são transportados para o interior da célula, envolvendo gasto de ligações fosfato ou consumo de gradiente eletroquímico e, finalmente, os aminoácidos no interior da célula podem ser incorporados na proteína microbiana ou fermentados até AGVs e NH₃ com

concomitante liberação de energia, sendo que o destino depende da disponibilidade de energia e da espécie microbiana.

As bactérias são consideradas os principais microrganismos proteolíticos do rúmen, embora, protozoários e fungos também exerçam este tipo de atividade, mas em menor extensão.

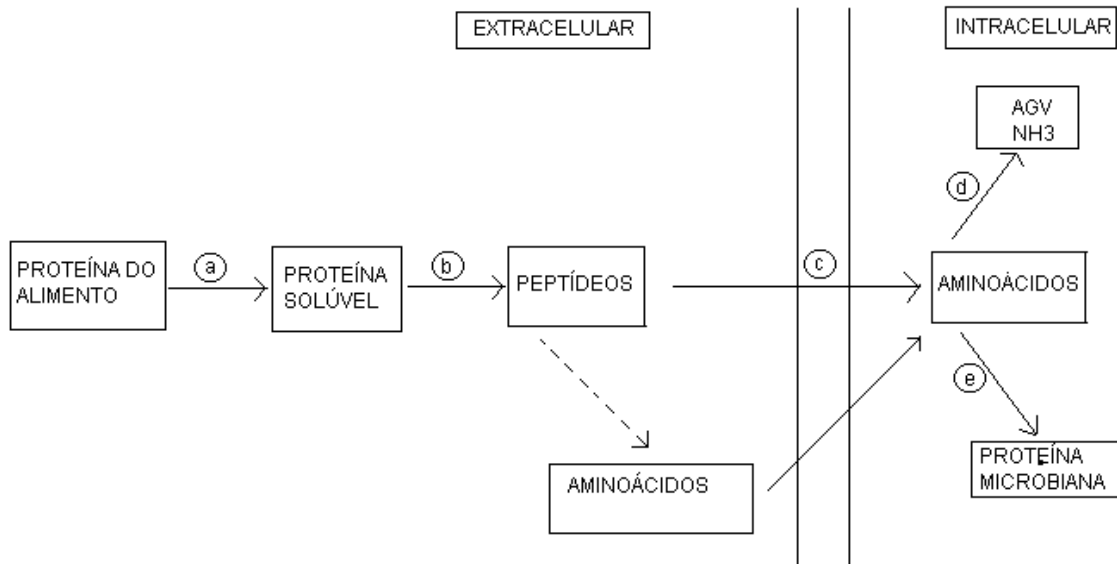


FIGURA 1 – Representação esquemática da degradação da proteína no rúmen, onde: (a) hidratação e solubilização, (b) proteólise, (c) assimilação ou transporte de peptídeos e aminoácidos para o interior da célula microbiana, (d) fermentação e (e) síntese de proteína microbiana.

WILLIAMS e COLEMAN (1988), verificaram que a defaunação promovia redução da concentração de NH_3 no rúmen, concluindo com isso, que os protozoários ciliados são ativos na deaminação. Adicionalmente extratos de protozoários foram 3 vezes mais ativos que extratos de bactérias na deaminação e, a refaunação resultou em aumento na atividade deaminativa (WALLACE et al. 1987). Entretanto, protozoários intactos foram muito menos ativos que bactérias em produzir NH_3 e, desta forma, provavelmente, a atividade deaminativa dos protozoários afeta a proteína microbiana, ao invés da proteína dietética (HINO e RUSSELL, 1987).

Até recentemente, tem sido aceito que a solubilização da proteína é o passo limitante na degradação, que proteólise é o sinônimo de degradação e, que a maioria, se não todas, das mais importantes bactérias do rúmen já foram isoladas. Estas teorias foram aos poucos sendo refutadas devido às seguintes observações: houve grande diferença na quantidade de N precipitado no fluido ruminal quando utilizou-se TCA ou ácido tungstico, culturas mistas de bactérias produziam mais NH_3 que a melhor

produtora isolada e, ionóforos reduziram a produção de NH_3 de culturas mistas, mas as espécies mais ativas na produção de NH_3 conhecidas até o momento são pouco sensíveis a ionóforos.

A pressuposição de que a proteólise e não os demais passos eram limitantes à degradação da proteína era suportado pela observação de que a concentração de aminoácidos livres no fluido ruminal era relativamente baixas. Entretanto, WINTER et al. (1964), notaram que o ácido tungstico era capaz de precipitar 7 vezes mais N solúvel no fluido ruminal que o TCA. Desta forma, além de proteínas, o ácido tungstico consegue precipitar peptídeos. Quando culturas mistas de bactérias foram incubadas *in vitro* com caseína, pequena parcela da caseína degradada foi recuperada como proteína celular ou NH_3 e, a comparação dos resultados da reação com Nihidrina antes e depois da hidrólise com HCl, indicaram que o pool de N-não protéico e não- NH_3 , era composta de pequenos peptídeos. Desta forma, as evidências levam a crer que a utilização de peptídeos é o passo limitante à degradação de proteínas no rúmen.

PITTMAN et al. (1967) sugeriram que *Bacterioides ruminicola* assimilou peptídeos com 16 aminoácidos, entretanto, não exclui-se a possibilidade de que longos peptídeos tivessem sido hidrolisados antes do transporte. A maioria das bactérias ruminais são gram-negativas, cuja membrana externa atua como uma barreira seletiva para muitas substâncias. Entretanto, as porinas, facilitam a entrada de nutrientes com peso molecular de 600 daltons, o que significa que somente peptídeos com 5 aminoácidos são permeáveis e portanto, transportáveis.

Bactérias ruminais usam peptídeos mais rapidamente que aminoácidos livres, provavelmente porque o gasto energético de transportar um peptídeo seria o mesmo de um aminoácido somente, sendo então mais eficiente.

O número de resíduos de aminoácidos na cadeia do peptídeo e sua hidrofobicidade afetam a sua utilização, sendo os peptídeos de menor tamanho e hidrofílicos utilizados numa taxa mais elevada (CHEN et al. 1987). Estudos *in vitro* também indicaram que bactérias do rúmen utilizam peptídeos contendo prolina numa taxa relativamente lenta e, que o conteúdo de prolina dos peptídeos era inversamente correlacionado com a taxa de desaparecimento ruminal (YANG e RUSSELL, 1992).

III – PRODUÇÃO DE AMÔNIA:

O acúmulo de NH_3 no rúmen reflete um desacoplamento na disponibilidade do N e energia da dieta. Quando culturas mistas de bactérias foram incubadas *In Vitro* com pequenas quantidades de misturas de carboidratos e caseína, o acúmulo de NH_3 foi inversamente proporcional à taxa de fermentação dos carboidratos. Houve pequeno acúmulo de NH_3 na taxa de fermentação de carboidratos de 7%/h, a qual é bem inferior à taxa de crescimento de muitas espécies de bactérias no rúmen, indicando que o acúmulo excessivo de NH_3 *in vivo* deve ser consequência da baixíssima taxa de fermentação dos carboidratos. A taxa de fermentação de carboidratos tem pouco efeito sobre a quantidade de peptídeos ou aminoácidos transportados na célula microbiana, entretanto, a sua disponibilidade tem um efeito significativo na produção e utilização de NH_3 (RUSSELL et al., 1983).

Quando culturas mistas de bactérias foram incubadas com um excesso de caseína, em todas as taxas de crescimento, 64% dos aminoácidos foram utilizados para fins de síntese de proteína microbiana. Embora o acúmulo de NH_3 na taxa de fermentação dos carboidratos de 7%/h era mínima, o total de amônia produzida representou 36% do N-aminoácido transportado, sendo esta fração insensível aos carboidratos.

Muitas bactérias do rúmen são incapazes de produzir NH_3 , mas até recentemente, as principais produtoras eram consideradas como sendo *Megasphaera elsdenii*, *Bacterioides ruminicola*, *Selenomonas ruminantium*, *Eubacterium ruminantium* e *Butyrivibrio fibrisolvens*, sendo a *B. ruminicola* a maior produtora. Nestes estudos, somente *M. elsdenii* foi capaz de crescer utilizando peptídeos como fonte de energia, entretanto, a taxa de crescimento era muito lenta. Adiante, foi observado que culturas mistas de bactérias do rúmen apresentavam atividade específica de produção de NH_3 superior ao das melhores culturas examinadas isoladamente.

Resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* confirmam o efeito na “economia” de proteína dos ionóforos, o qual, aparentemente afetaria a deaminação ao invés da proteólise. Quando culturas mistas incubadas com caseína, foram tratadas com monensina e lasalocida, houve 50% de redução na produção de NH_3 (RUSSELL e MARTIN, 1984). Este efeito dos ionóforos era de difícil explicação, uma vez que as bactérias mais ativas na produção de NH_3 eram resistentes. Desta forma, sugeriu-se que as bactérias ativas na produção de NH_3 ainda não tinham sido isoladas do rúmen e, que estas seriam sensíveis a ionóforos (RUSSELL et al. 1988).

Estudos *in vitro* com elevadas concentrações de caseína permitiram isolar três bactérias, as quais tem alta atividade específica de produção de NH₃ (Tabela 1), apresentaram rápido crescimento somente com peptídeos ou aminoácidos como fonte de energia, são sensíveis a ionóforos e, estavam presentes em elevado número no rúmen (> 10⁷/ml fluido ruminal)

Tabela 1 – Capacidade de bactérias do rúmen em produzir NH₃, para crescer na presença de monensina e taxa de crescimento a partir de aminoácidos ou peptídeos.

Organismo	Produção de NH ₃ (nmol.mg proteína.min.)	Sensibilidade a monensina	Taxa de crescimento (h ⁻¹)
Cultura mista	30	-	-
<i>M. elsdenii</i>	19	Não	<0,05
<i>S. ruminantium</i>	15	Não	0
<i>B. ruminicola</i>	11	Não	0
Linhagem C	346	Sim	0,53
Linhagem F	318	Sim	0,43
Linhagem SR	367	Sim	0,34

As linhagens isoladas foram incapazes de utilizar 23 fontes diferentes de carboidratos e, portanto, são bactérias fermentadoras de aminoácidos e peptídeos obrigatórias que, entretanto, não são proteolíticas. A linhagem C, hoje identificada como *Peptostreptococcus anaerobius*, e cresce rapidamente (0,5 h⁻¹) se aminoácidos ou peptídeos estão presentes no meio. As linhagens F e SR foram também identificadas como *Clostridium sticklandii* e *Clostridium aminophilum* (YANG e RUSSELL, 1993).

Embora, o número mais provável destas bactérias no rúmen seja de 5% das bactérias que utilizam carboidratos, elas apresentam atividade específica de produção de amônia 20 vezes maior que as espécies anteriormente isoladas. A linhagem F é a mais numerosa, o que pode estar associado a sua resistência a pH menor que 5,5.

IV – MECANISMO DE AÇÃO DOS IONÓFOROS:

Os critérios de classificação de microrganismos mais utilizados são: forma da célula (cocos, bastonete, espiral), tamanho e coloração de gram. A coloração de gram baseia-se nas diferenças existentes nos componentes da parede celular, sendo considerado microrganismo gram-positivo, aquele cuja coloração do envoltório celular após adição de corantes específicos, permanece roxa, o que indica ausência de uma

membrana externa; já a coloração rosa-claro, característico de microrganismo gram-negativo, indica a presença da membrana lipídica externa, a qual foi removida juntamente com os corantes pela adição de álcool.

A membrana ou parede celular desempenha funções muito importantes nos microrganismos, como manter a integridade do citossol, protegendo-o de fatores externos; transporte e excreção de compostos; suportar o turgor celular; localização de sistemas enzimáticos responsáveis pela digestão extracelular e transporte de nutrientes; geração de gradiente eletroquímico e geração de energia.

Como citado acima, bactérias gram-negativas apresentam a membrana externa, a qual confere resistência a substâncias presentes no meio, como os ionóforos e, obviamente, bactérias gram-positivas, devido a ausência desta membrana externa, são sensíveis. Ionóforos, são compostos do grupo de poliéters cíclicos que transportam cátions através da bicamada lipídica das membranas celulares (LARDY, 1968; Pressman, 1968, citado por RUSSELL, 1987).

Muitas bactérias do rúmen expõem prótons para fora da membrana celular, mantendo o interior mais alcalino. Este gradiente de pH (ΔpH) cria um gradiente de prótons, o que significa dizer que o citossol é mais negativo, formando então, um potencial elétrico ($\Delta\psi$), o qual compõe a Força Próton-Motriz Total (Δp), que é a soma de $Z\Delta\text{pH}$ e $\Delta\psi$. A expulsão de prótons fornece um meio de manter um pH intracelular mais favorável, mas a Força Próton-Motriz gerada pelo potencial transmembrana pode ser utilizado na síntese de ATP ou assimilação de solutos.

RUSSELL (1987), notou que no cultivo de *S. bovis*, sem a presença de ionóforo, esta bactéria mantinha o pH interno ao redor de 7,08, quando o pH externo era 6,65. A adição de monensina ao ambiente de incubação, causou uma inversão do gradiente de pH através da membrana celular, tornando o interior mais ácido. Esta inversão reflete a falta de habilidade da bactéria para expelir prótons provenientes da produção de lactato ou do influxo, na presença de monensina. A cultura controle manteve um gradiente (interno/externo) de K^+ de 70 vezes e, na adição de monensina, este foi reduzido para 15 vezes. O meio de crescimento apresentava 10 vezes mais Na^+ que K^+ e, o gradiente de Na^+ era somente 2,7 vezes, mas na adição de monensina, este foi aumentado. A alteração do gradiente de K^+ na adição de monensina, indica o efluxo de K^+ , o qual é acompanhado pelo influxo de H^+ e do seu acúmulo, reduzindo desta forma o pH intracelular. O acúmulo de H^+ no meio intracelular pode levar a sérios danos

na atividade do microrganismo, principalmente, da atividade enzimática, desta forma, o excesso de H⁺, é expelido da célula num processo que consome ligações fosfato (ATP), resultando então, na inibição do crescimento das espécies microbianas sensíveis aos ionóforos (Figura 2).

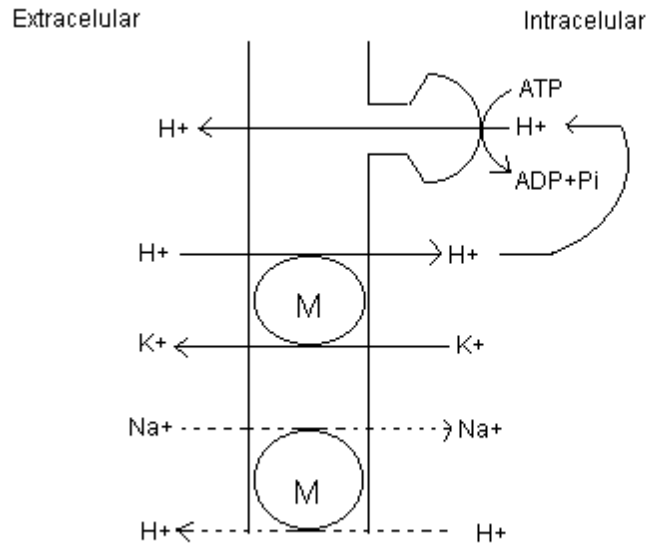


FIGURA 2 – Representação esquemática do mecanismo de ação de ionóforos proposto em bactérias Gram-positivas do rúmen.

V – EFEITO DE IONÓFOROS NO FLUXO ABOMASAL DE AMINOÁCIDOS E PEPTÍDEOS:

YANG e RUSSELL (1993) infundiram proteína hidrolisada no rúmen, a concentração de aminoácidos e peptídeos foi reduzida em uma taxa logarítmica e, aumentou as concentrações de NH₃. Entre as fontes protéicas utilizadas, a proteína de hidrolisada da soja desapareceu numa taxa mais rápida que a caseína hidrolisada e a gelatina. O fornecimento de 350 mg de monensina por dia aos animais, causou redução na taxa de desaparecimento de aminoácidos e peptídeos e da concentração de NH₃.

Mesmo na ausência de monensina, a infusão da proteína hidrolisada da soja não permitiu acúmulo de aminoácidos e peptídeos, ao contrário da gelatina e caseína.

Este efeito da monensina em reduzir a taxa de desaparecimento de aminoácidos e peptídeos no rúmen, principalmente através da redução da sua fermentação à amônia, poderia aumentar a passagem destes para o duodeno. GOODRICH et al. (1984), relataram que as respostas à adição de ionóforos eram maiores quando a dieta continha

proteína verdadeira. POOS et al. (1979), observaram que a monensina aumentou o fluxo de aminoácidos para o duodeno, mas em vários outros trabalhos, este mesmo fluxo não foi alterado na utilização de ionóforos.

Considerando que a absorção de aminoácidos no rúmen é ausente, a taxa de desaparecimento destes no rúmen é função da utilização pelos microrganismos e da passagem para o duodeno. YANG e RUSSELL (1993) notaram que com o aumento da taxa de desaparecimento de aminoácidos e peptídeos havia redução da sua passagem para o duodeno, sendo então, a utilização pelos microrganismos o maior responsável pelo desaparecimento.

O efeito da adição de monensina na passagem de aminoácidos e peptídeos do rúmen parece depender da proteína em questão. Sem a utilização de monensina, somente 6% dos aminoácidos e peptídeos da proteína hidrolisada da soja escaparam do rúmen, enquanto que para a gelatina e a tripticase estes valores foram de 2 a 4 vezes maiores. Para a proteína da soja, a adição de monensina reduziu em 60% a taxa de desaparecimento de aminoácidos e peptídeos, entretanto, teve pouco efeito na passagem desta fração para o duodeno, pois, houve grande utilização pelos microrganismos. Contrariamente, para a tripticase e gelatina hidrolisada, o fornecimento de monensina aos animais aumentou a passagem de aminoácidos e peptídeos para o duodeno de 19 para 50%.

A explicação para tal fato foi proposta por observações realizadas em experimentos *In Vitro*, nos quais, foi encontrado que a composição da proteína pode afetar a utilização de aminoácidos e peptídeos pelos microrganismos do rúmen. Nestes estudos, observou-se que a taxa de utilização de peptídeos ricos no aminoácido prolina era lenta e que a quantidade deste aminoácido era inversamente relacionada à taxa de desaparecimento ruminal. Considerando que a tripticase apresenta elevada concentração de prolina em sua proteína, as conclusões dos resultados obtidas em estudos que a utilizam para medir o efeito de ionóforos no escape de aminoácidos e peptídeos no rúmen deve ser vistas com cuidado. Pois, as fontes protéicas comumente utilizadas na alimentação de ruminantes (proteína da soja), por apresentarem baixo teor deste aminoácido, tendem a não limitar a sua utilização pelos microrganismos do rúmen, não afetando desta forma, o seu escape para o duodeno, mesmo que a adição de ionóforos reduza a sua fermentação a amônia. Adicionalmente ao conteúdo de prolina, a concentração de aminoácidos hidrofóbicos também tem sido relacionada à redução da

utilização pelos microrganismos e, possivelmente, ao aumento do fluxo de aminoácidos e peptídeos para o duodeno, quando da utilização de ionóforos.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- BRODERICK, G.A., WALLACE, R.J., ORSKOV, E.R. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. In: PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF DIGESTION AND METABOLISM IN RUMINANTS. *Proceedings...* Seventh International Symposium on Ruminant Physiology, Academy Press .
- CHEN, G., STROBEL, H.J., RUSSELL, J.B., SNIFFEN, C.J. 1987. The effect of hydrophobicity on the uptake and deamination of peptides by ruminal bacteria in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2021-2025.
- GOODRICH, R.D., GARRETT, J.E., GAST, D.R., KIRICK, M.A., LARSON, D.A., MEISKE, J.C. 1984. Influence of monensin on the performance of cattle. *J. Anim. Sci.*, 58:1481-1498.
- HINO, T., RUSSELL, J.B. 1987. Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 64:261-270.
- KENNEDY, P.M., MILLIGAN, L.P. 1980. The degradation and utilisation of endogenous urea in the gastrointestinal tract of ruminants: A review. *Can. J. Anim. Sci.*, 60:205-221.
- LARDY, H. 1968. Influence of antibiotics and cyclic polyethers on ion transport in mitochondria. *Fed. Proc.*, 27:129.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC . 1985. *Ruminal nitrogen usage*. National Academy Press, Washington, DC.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. 1989. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 6th Rev. Ed., National Academy Press, Washington, DC.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. 1988. *Nutrient Requirements of Swine*. 7th Rev. Ed., National Academy Press, Washington, DC.
- PITTMAN, K.A., LAKASHAMANAN, S., BRYANT, M.P. 1967. Oligopeptide uptake by *Bacteroides rumenicola*. *J. Bacter.*, 93: 1499-1508.
- POSS, M.I., HANSON, T.L., KLOPFENSTEIN, T.J. 1979. Monensin effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. *J. Anim. Sci.*, 48:1516-1524.
- RUSSELL, J.B., SNIFFEN, C.J., VAN SOEST, P.J. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.*, 66: 763-775.

- RUSSELL, J.B., MARTIN, S.A. 1984. Effect of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen microorganisms in vitro. *J. Anim. Sci.*, 59: 1329-1338.
- RUSSELL, J.B. 1987. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: Effects on ion flux and protonmotive force. *J. Anim. Sci.*, 64:1519-1525.
- RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J., CHEN, G. 1988. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 872-877.
- WALLACE, R.J., BRODERICK, G.A., BRAMMALL, M.L. 1987. Microbial protein and peptide metabolism in rumen fluid from faunated and ciliate-free sheeps. *Br. J. Nutr.*, 58:87-93.
- WILLIAMS, A.G., COLEMAN, G.S. 1988. The rumen protozoa. In: *The rumen microbial ecosystem*. (P.M. HOBSON, ed.), pp. 77-128. Elsevier Applied Science, London, England.
- WINTER, K.A., JOHNSON, R.R., DEHORITY, B.A. 1964. Metabolism of urea nitrogen by mixed cultures of rumen bacteria grown on cellulose. *J. Dairy Sci.*, 47: 793-797.
- YANG, C.M.J., RUSSELL, J.B. 1992. Resistance of proline-containing peptides to ruminal degradation in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3954-3958.
- YANG, C.M.J., RUSSELL, J.B. 1993. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(10): 3250-3254.