

METABOLISMO NITROGENADO: DIFERENÇAS ENTRE RUMINANTES E MONOGÁSTRICOS¹

Introdução

A principal função dos animais de produção é fornecer proteína (carne, ovos e leite) de elevado valor nutricional. O conhecimento do metabolismo protéico desses animais é um importante fator para otimizar sua função econômica. Por outro lado, os produtos finais do metabolismo protéico (amônia, ácido úrico e uréia) são potenciais poluidores do ambiente, o que requer constante preocupação por parte dos nutricionistas formuladores de dietas (Sakomura, 2014).

A compreensão do metabolismo nitrogenado depende da digestão e absorção do nitrogênio na forma de proteína, peptídeos e aminoácidos; da síntese de proteína; da excreção do nitrogênio (via fezes, via urina e nas interrelações entre os produtos da excreção) e dos mecanismos de controle da biossíntese da proteína (Bergner, 1989).

O objetivo desta revisão é mostrar as diferenças no metabolismo nitrogenado em animais ruminantes e não ruminantes.

Diferenças anatômicas e tipos de digestão

Há dois tipos de digestão ocorrendo em todos os animais, com diferenças importantes dependendo do trato gastrointestinal (TGI) dos animais. A digestão hidrolítica prevalece em animais carnívoros, esses animais têm pouca fermentação e alta dependência de suas enzimas para hidrolise das macromoléculas dos alimentos. A digestão fermentativa é predominante nos animais herbívoros que possuem um grande local próprio para fermentação em cada uma das partes do trato. Esses animais dependem da fermentação realizada pelos microorganismos presentes no TGI (McDonald, 1995).

As aves não possuem um local para fermentação e por isso recebem dietas com baixos teores de fibras, os suínos têm capacidade para realizar a digestão hidrolítica e fermentativa, entretanto animais em confinamento recebem dietas muito semelhante a dieta ofertada as aves e portanto não necessitam realizar a fermentação (Peixoto & Maier, 1993). Ruminantes possuem digestão basicamente fermentativa. Os equinos realizam a digestão fermentativa em diferente local e em menor taxa quando comparados aos ruminantes. Ruminantes jovens são como animais

¹ Pires, P.G.S. Metabolismo nitrogenado: diferenças entre ruminantes e monogástricos. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015. 10 p.

monogástricos, em função da dobra retículo-omaso (goteira esofágica) que leva o leite direto para o omaso e então para o abomaso.

Digestão das proteínas em não-ruminantes

As proteínas sofrem desnaturação protéica ao chegarem ao trato gastrointestinal através da ação do ácido clorídrico (HCl), secretado pelas células parietais das glândulas gástricas. Posteriormente, é desdobrada em polipeptídeos menores no estômago, através da pepsina, uma endopeptidase produzida na glândula pilórica em resposta ao estímulo da gastrina (Sakomura, 2014). A pepsina possui maior afinidade por ligações peptídicas envolvendo um grupo carboxila de um aminoácido aromático (Phe, Thp ou Try) e mais lentamente por ligações peptídicas que envolvam a leucina e os resíduos ácidos (Sakomura, 2014). A contribuição do estômago no processo de digestão de proteínas é em torno de 20% (González & Silva, 2006).

O suco pancreático continua rompendo em di ou tri-peptídeos através da tripsina, que cliva ligações que envolvam Lys e Arg, a quimiotripsina, que hidrolisa ligações que envolvam aminoácidos aromáticos (Phe, Thp ou Try), e a elastase, esta menos específica que as anteriores, que cliva as ligações envolvendo aminoácidos alifáticos (Val, Leu, Ile). A secreção das enzimas pancreáticas é estimulada pela presença colecistoquinina (CCK). O bicarbonato presente no suco pancreático age neutralizando o pH da digesta ácida oriunda do estômago, proporciona um ambiente favorável para a ativação e ação das enzimas pancreáticas (Sakomura, 2014).

A absorção dos produtos finais da hidrólise das proteínas pode ser dar na forma de di, tri ou tetra-peptídeos. O transporte de peptídeos é independente da ação de peptidases e da atividade de transportadores de aminoácidos, estando acoplada ao cotransporte de um próton. No jejuno, a absorção de 15 a 30% dos aminoácidos livres é realizada através de transportadores localizados na membrana do enterócito, e 70 a 85% da absorção acontece na forma de peptídeos. No íleo a absorção acontece na forma de aminoácidos livres (Peixoto & Maier, 1993).

Os D-AA são absorvidos como tal e dentro da célula vão sofrer transaminação para L-AA, esses AA são preferencialmente absorvidos em relação aos D-AA, provavelmente pela especificidade do sistema de transportadores. Há transportadores específicos para di, tri, AA neutros, AA ácidos e AA básicos (Sakomura, 2014).

A absorção dos produtos da digestão protéica na forma de aminoácidos livres apresenta particularidades, principalmente em relação ao sistema de transporte. Tal sistema é saturável, por ser dependente de transportadores. Cada aminoácido apresenta uma velocidade de absorção, em função de sua afinidade por seu carreador específico (McDonald, 1995).

Digestão das proteínas em ruminantes

Em animais ruminantes, as proteínas oriundas da dieta são degradadas pelos microorganismos do rúmen até aminoácidos, que posteriormente serão reutilizados pelas bactérias para sintetizar suas próprias proteínas. A concentração e degradação ruminal das proteínas variam amplamente de acordo com o tipo de alimento ingerido. Plantas leguminosas apresentam maior teor protéico do que gramíneas e proteínas de alimentos de origem vegetal são amplamente degradadas quando comparadas as de origem animal (McDonald, 1995).

Como os polissacarídeos, a degradação das proteínas no ambiente ruminal é efetuada por sistemas multienzimáticos associados à membrana celular bacteriana. Inicialmente, as moléculas protéicas são hidrolisadas em oligopeptídeos, que são hidrolisados por aminopeptidases, liberando dipeptídeos e estes, por sua vez, são hidrolisados por dipeptidases liberando os aminoácidos (Kozloski, 2011). Após a degradação extracelular, os peptídeos e aminoácidos resultantes são prontamente captados pelas células bacterianas ruminais, de modo que suas concentrações no fluido ruminal normalmente são muito baixas (McDonald, 1995).

As bactérias do rúmen ao realizar a síntese protéica podem utilizar aminoácidos e fontes de nitrogênio não proteico neste processo, como a amônia, nitratos e amidas (Kozloski, 2011).

Os ácidos nucléicos constituem a menor fração entre os compostos nitrogenados do alimento (5-9%) e normalmente são totalmente degradados no rúmen por nucleases extracelulares bacterianas. O produto liberado é uma mistura de nucleotídeos, nucleosídeos e bases nitrogenadas, além de ribose e fosfato, os quais são todos captados e metabolizados pelos microorganismos (Kozloski, 2011).

A uréia é um composto nitrogenado de origem não-proteica que pode ser incorporada na dieta de ruminantes, mas que também chega ao rúmen via saliva ou diretamente do sangue via transepitelial. Este composto é hidrolisado pela enzima urease no rúmen, liberando amônia. A hidrólise enzimática da uréia é termodinamicamente favorável, com variação negativa da entalpia em torno de 10 a 15 kcal/mol (McDonald, 1995).

Metabolismo das proteínas em não-ruminantes

Diferentemente dos tecidos vegetais, os tecidos animais sintetizam apenas alguns aminoácidos, de forma que o restante deve ser fornecido via dieta. Os aminoácidos essenciais não são sintetizados ou são em quantidades inferiores as necessidades dos animais, enquanto que os não-essenciais são sintetizados a partir do esqueleto de carbono da glicose ou de outros aminoácidos e dos grupos amino de aminoácidos em excesso (Sakomura, 2014).

São considerados aminoácidos essenciais: arginina (Arg), lisina (Lys), histidina (His), leucina (Leu), isoleucina (Ile), valina (Val), metionina (Met), treonina (Tre), triptófano (Trp) e fenilalanina (Phe). Os semi-essenciais são sintetizados a partir de aminoácidos essenciais

durante o metabolismo dos animais: tirosina (Tyr) e cistina (Cys). Os outros AA podem ser sintetizados pelo animal a partir da proteína dietética: alanina (Ala), ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), glicina (Gly), serina (Ser) e prolina (Pro) (Wallace & Chesson, 2008).

Nas dietas práticas, a metionina é o primeiro aminoácido limitante e a lisina o segundo para frangos de corte e poedeiras (Ravidran & Bryden, 1999). Alguns aminoácidos podem ser classificados como exigidos pela espécie, como a arginina pelas aves, que não apresentam a enzima carbamil-fosfato-sintetase, que catalisa a primeira reação do ciclo da uréia (Sakomura, 2014).

A arginina também é um aminoácido essencial para gatos, já que esses animais tem baixa capacidade de sintetizar ornitina a partir do ácido glutâmico, em consequência da baixa atividade das enzimas pirrolina-5-carboxilase sintase e ornitina aminotransferase (BAKER, 2005). O excesso de lisina dietética antagoniza com a arginina em frangos, ratos e cães, mas não em suínos e gatos (Sakomura, 2014).

A taurina é essencial para gatos, esta pode ser sintetizada a partir da cisteína, mas a taxa dessa síntese não é compatível com as necessidades desses animais em determinadas circunstâncias (O'Donnell III et al., 1981). Gatos alimentados por mais de um ano com dietas deficientes em taurina, podem apresentar cegueira total (Stades et al., 1999). Podem-se observar ainda alterações cardíacas como cardiomiopatia dilatada (Nelson e Couto, 2006).

Outros podem ser classificados como condicionalmente não essenciais dependendo da idade, do estado fisiológico, da disponibilidade do substrato para a conversão e capacidade absorviva do animal (Sakomura, 2014)

A biodisponibilidade de aminoácidos é definida como a proporção de aminoácidos ingeridos através da dieta que são absorvidos e convertidos potencialmente adequados para o metabolismo ou síntese de proteínas (Lewis & Bayley, 1995).

Cistina, cisteína e metionina são as principais fontes de S nas dietas dos animais. Metionina é um importante doador de grupo metil em várias reações de transmetilação, incluindo a síntese de vitamina colina e da creatina (Sakomura, 2014).

Quando uma proteína é ingerida via alimentação, a eficiência de sua hidrólise determina o grau de absorção dos AA individuais e contribui para o seu valor nutricional. O valor nutricional da proteína também é dado pelo seu balanço de aminoácidos absorvidos. A absorção das proteínas se dá via absorção de AA ou di e tripeptídeos. Somente nas primeiras 24 horas de vida é que recém-nascidos absorvem proteínas intactas por pinocitose (McDonald, 1995).

A síntese de aminoácido pode ocorrer através da aminação, transaminação ou desaminação. Na aminação o grupo α -amino se origina de íons amônio (McDonald, 1995). Na transaminação (transferência do grupo para um α -cetoácido), um par de α -aminoácidos é interconvertido em um par de α -cetoácidos. A maioria dos aminoácidos, mas nem todos (lisina, treonina, prolina e hidroxiprolina), são substratos para a transaminação (Sakomura, 2014).

A desaminação é uma reação que resulta na perda de amônia e na conversão do aminoácido em seu cetoácido correspondente, ocorre no fígado e no rim. Este pode ser oxidado para formação de energia, usado para síntese de glicose ou convertido em gordura (McDonald, 1995).

A quantidade de amônia é formada pelas bactérias intestinais a partir da proteína alimentar e da uréia presente nos fluidos secretados no trato gastrointestinal. O fígado é responsável por retirar a amônia do sangue portal, assim o sangue que deixa o fígado é virtualmente livre de amônia (Sakomura, 2014).

A amônia pode ser excretada como uréia em mamíferos ou como ácido úrico em aves. A glutamina é um transportador de amônia, além de ser a principal fonte energética para o intestino, e os produtos nitrogenados derivados da glutamina (alanina, prolina e citrulina) são liberados na veia portal (Sakomura, 2014). São dois os mecanismos para o transporte de íons amônio dos tecidos extra-hepáticos para o fígado ou para os rins: a síntese de glutamina e o ciclo glicose-alanina (Motta, 2011).

Após a proteólise a maioria das proteínas e aminoácidos está no músculo esquelético, sob necessidade de energia essa proteína é degradada e os grupos amino dos aminoácidos são transferidos para a glutamina e a alanina e então transportadas para o fígado ou rins. A produção de novo da alanina no músculo serve como transporte de nitrogênio e como transporte de combustível da região periférica para a região esplênica. A alanina encontra-se na ligação do metabolismo protéico e o energético (Sakomura, 2014).

Metabolismo das proteínas em ruminantes

Em função da presença de microorganismos ruminais, o modo de utilização das proteínas nos ruminantes difere totalmente dos monogástricos. Estes microorganismos caracterizam-se por seu alto potencial em sintetizar todos os AA, inclusive os essenciais. Assim, os ruminantes são mais independentes em relação da qualidade da dieta. Além disso, tornam-se possível suplementar os alimentos com nitrogênio não-protéico (NNP) como sais de amônio ou uréia (McDonald, 1995).

Durante a passagem do alimento pelo rúmen, parte da proteína é degradada a peptídeos pelas proteases. Estes são posteriormente catabolisados a aminoácidos e os últimos à amônia, ácidos graxos e CO₂.

Os produtos da degradação formados no rúmen, em particular a amônia, são usados por microorganismos na presença de fontes de energia (carboidratos) para a síntese de proteína e outros constituintes celulares dos microorganismos, como ácidos nucléicos (Kozloski, 2011).

A grande maioria dos aminoácidos absorvidos pelos ruminantes é oriunda da proteína microbiana sintetizada no rúmen. As exigências dietéticas de proteína metabolizável para

ruminantes são atendidas mediante a absorção no intestino delgado da proteína microbiana verdadeira e da proteína dietética não degradada no rúmen. A proteína microbiana pode suprir as exigências da proteína metabolizável para bovinos de corte a uma taxa de 50 a 100%, sendo considerada fonte de boa qualidade, devido a sua alta digestibilidade, em torno de 80%, e ao seu perfil em aminoácido (NRC, 2000).

A proteína microbiana contém maior proporção de metionina e lisina do que a proteína de concentrados protéicos de origem vegetal, e após a proibição da utilização de alimentos de origem animal em dietas destinadas a ruminantes no Brasil, não existem fontes que atendam melhor aos requerimentos de aminoácidos do animal que a proteína microbiana (Verbic, 2002).

Os compostos nitrogenados que são liberados no rúmen durante a degradação protéica são indispensáveis para o crescimento microbiano ruminal (Verbic, 2002). A degradação da proteína alimentar no rúmen é um fator importante que afeta o aporte de aminoácidos para o intestino delgado. A velocidade e a quantidade de proteína degradada no rúmen podem condicionar a quantidade de proteína microbiana sintetizada no rúmen e determinar a quantidade total de proteína não degradada no rúmen que chega ao duodeno (Stern et al., 1994).

As exigências dos microrganismos ruminais para compostos nitrogenados são atendidas pela proteína dietética degradada e pelo nitrogênio metabólico endógeno proveniente da oxidação de aminoácidos, que é reciclado para o rúmen através do sangue ou da saliva. Há uma forte correlação entre o nível de proteína degradada proveniente da dieta e a síntese de proteína microbiana (Hoover & Stokes, 1991). A máxima eficiência e o maior aporte de proteína microbiana para o duodeno é obtido em dietas contendo 10 a 13% de proteína degradada no rúmen na matéria seca para vacas em lactação. Entretanto, esses níveis podem ser alterados de acordo com a categoria animal, o nível de produção, o estágio fisiológico, etc.

Bovinos em fase de crescimento ou recria, têm maior exigência protéica. Com isso, o fornecimento de proteína microbiana, somente, não é suficiente para atender às exigências dos animais (NRC, 2000). A proteína disponível no intestino delgado é composta pela proteína microbiana sintetizada no rúmen e pela proteína dietética que escapou da degradação ruminal, também chamada de proteína de escape ou “by-pass”.

A percentagem de proteína degradada depende, entre outros fatores do tipo de proteína dietética e da população microbiana do rúmen. A proteína “by-pass” é a proteína que escapa da degradação ruminal, através da proteção de algum tipo de tratamento ou pela baixa degradabilidade ruminal do alimento (McDonald, 1995).

Parte da amônia liberada no rúmen não pode ser usada pelos microorganismos e é transformada em uréia no fígado. A maior parte que não é utilizada pelo animal é excretada como uréia. Outra parte pode ser reciclada via saliva (McDonald, 1995). A absorção da amônia está diretamente relacionada com a sua concentração no rúmen e aumenta com o aumento do

pH do fluido ruminal, com isso conclui-se que sua absorção ocorre por difusão passiva da sua forma dissociada (Kozloski, 2011).

Células microbianas (bactérias e protozoário) que contém proteína como os seus componentes principais passam, junto com proteínas da dieta que não foram alteradas, para os demais compartimentos e após para o intestino delgado. A proporção da proteína total que é digerida no rúmen, varia de 70 a 80% ou mais para a maioria das dietas a 30-40% para as menos solúveis (Kozloski, 2011).

A digestão e absorção da proteína microbiana e dietética no intestino delgado se dão da mesma forma que para espécies monogástricas, isto é, com o auxílio de proteases endógenas (Kozloski, 2011).

Uso da uréia (NNP)

Por definição, nitrogênio não protéico ou NNP é todo nitrogênio que não se apresenta na forma polipeptídica (Haliburton & Morgan, 1989). A ureia $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$ é um sal granulado muito higroscópico. É fonte de N para os microorganismos do rúmen. Possui equivalente protéico de 262 a 281%, ou seja, cada 1 kg de uréia pode ser transformado em 2,62 a 2,81 kg de proteína (McDonald, 1995).

A recomendação para o emprego da uréia é baseada em novos conhecimentos de taxas de degradabilidade protéica no rúmen, do teor de NNP da forragem e do nível adequado de amônia e energia dentro do rúmen (Lucci, 1997). Uma correta suplementação com NNP na dieta só contribuirá de maneira positiva, se esta disponibilizar a amônia necessária para as bactérias do rúmen.

Aspectos práticos da utilização da uréia

- Período de ajuste: 2 a 4 semanas.
- Baixo nível de proteína orgânica na dieta. O uso da uréia pode diminuir os custos de produção, diminuindo a proporção da inclusão de proteína verdadeira na dieta.
- Não administrar uréia em animais com jejum maior de 36 horas.
- Iniciar gradativamente o consumo, partir de 30 g/dia até 150 g animal adulto/dia.
- Não interromper bruscamente o uso da uréia.
- Relação N: S deve ficar entre 10/1 e 15/1. Usar sulfato de Ca ou Na. Se houver deficiência de S, a síntese de AA sulfurados ficará prejudicada.
- Não permitir o alto consumo (100 a 200 g) em pouco tempo (1 a 2 horas).

Síntese de uréia e ácido úrico

A síntese de uréia é realizada no fígado por cinco reações (duas mitocondriais e três citosólicas) do ciclo da uréia ou ciclo de Krebs-Henseleit (Figura 1).

As enzimas que participam do ciclo são: (1) carbamoil-fosfato-sintetase, (2) ornitina-transcarbamoilase, (3) arginino-succinato-sintetase, (4) arginino-succinase e (5) arginase. As enzimas (1) e (2) são mitocondriais e as enzimas 3-5 são citosólicas (Motta, 2011).

A uréia é proveniente, de dois grupos amino, um da amônia e outro do aspartato, e de um carbono fornecido pelo bicarbonato. Para produzir uma molécula de uréia são necessárias 4 ligações fosfato (3ATP e 1P~P). Além disto, 0,9 mol de ATP é usado na excreção. Assim o custo total é de 4,9 mol de ATP (ou 0,43MJ) por 1 mol de uréia.

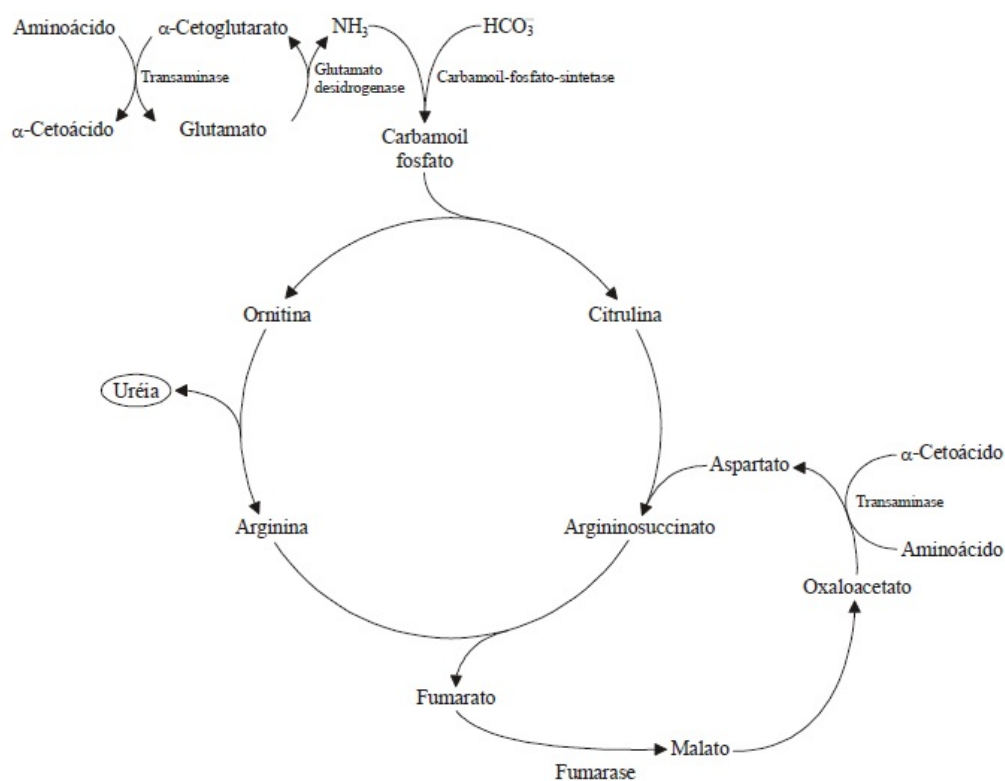


Figura 1. Ciclo da uréia. Fonte: Motta (2011).

A regulação do ciclo da uréia é realizada através da carbamoil-fosfato-sintetase I mitocondrial que é ativada alostericamente pelo *N*-acetilglutamato, produzido a partir do glutamato e de acetil-CoA em reação catalisada pela *N*-acetilglutamato-sintase, que é ativada pela arginina. Quando a quebra metabólica de aminoácidos aumenta, a concentração do

glutamato eleva e estimula a síntese do N-acetilglutamato que, por sua vez, aumenta a síntese de uréia (Motta, 2011).

As aves excretam ácido úrico, ao invés de uréia. A biossíntese do ácido úrico ocorre no fígado e rins. A glicina é um dos precursores do ácido úrico, o que o torna altamente exigida em aves. Mesmo que sintetizada nos tecidos, pode faltar em animais em crescimento. O último passo desta síntese é a conversão da xantina a ácido úrico que é controlada pela xantina oxidase, que contém molibdênio (McDonald, 1995).

Considerações finais

O conhecimento do metabolismo nitrogenado de ruminantes e animais monogástricos pode nos levar a ter o conhecimento mais próximo possível dos mecanismos capazes de otimizar o fornecimento de proteína com reflexos sobre o rendimento dos produtos finais (carne, leite e ovos), além da redução da poluição ambiental já que o excesso de aminoácidos ingerido em animais monogástricos serão catabolizados em compostos poluidores (nitrogênio) e, portanto, devem ter sua produção minimizada pela indústria ligada às cadeias produtivas da carne, ovos e leite.

Referências

- BERGEN, W.G.; WU, G. Intestinal nitrogen recycling and utilization in health and disease. *Journal of Nutrition*, Recent Advances in Nutritional Sciences, p. 821-825, 2009.
- BAKER, H. D. Comparative Nutrition and Metabolism: Explication of open questions with emphasis on protein and amino acids. *Agricultural Sciences*. v. 102, n.50, p. 17897-17902, 2005.
- GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 2.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. 357p.
- HALIBURTON, J. C.; MORGAN, S. E. Nonprotein nitrogen-induced ammonia toxicosis and ammoniated feed toxicity syndrome. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, v.5, n.2, p.237-249, 1989.
- HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *Journal of Dairy Science*. v. 74 p.3630-3644, 1991.
- KOZLOSKI, G. V. Bioquímica dos ruminantes. 3 ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2011, 216p.
- LEWIS, A. J.; BAYLEY, H. S. Amino acid bioavailability. In: Ammerman, C.B.; Baker, D.H.; Lewis, A.J. (Eds.), *Bioavailability of Nutrients for Animals – Amino Acids, Minerals, Vitamins*. Academic Press, San Diego, CA, p. 35-65, 1995.
- LUCCI, C.S. Nutrição e manejo de bovinos leiteiros. São Paulo: Manole Ltda, 1997. 169p.
- MCDONALD et al. *Animal Nutrition*. 5th ed. Longman Scientific and Technical: New York. 1995. 607p.
- MOTTA, V. T. Bioquímica, Editora Medbook, 2ed, 2011, 488p.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). *Nutrient requirements of beef cattle*. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy, 2000. 242p.
- NELSON, R.W., COUTO, G. C. Distúrbios do sistema cardiovascular. In: *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 89-90, 2006.

- O'DONNELL III, J.A., ROGERS, Q. R., MORRIS, J.G. Effect of diet on plasma taurine in the cat. The Journal of Nutritional. p.1111-1116, 1981.
- RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W.L. Amino acid availability in poultry – in vitro and in vivo measurements. Australian Journal of Agricultural Research, v. 50, p. 889-908, 1999.
- SAKOMURA, N. et al. Nutrição de Não Ruminantes, Jaboticabal: Funep, 2014. 678 p.
- STADES, F.C. et al. Fundamentos de Oftalmologia Veterinária. São Paulo: Manole, 1999.
- STERN, M.S.; CALSAMIGLIA, S.; ENDRES, M.I. Dinámica de metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. In X CURSO DE ESPECIALIZACION FEDNA. Madrid, 10 y 11 de Noviembre, 1994.
- VERBIC, J. Factors affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets containing forages. Viehwirtschaftliche Fachtagung, Annals... Germany, 2002, p. 24-25.
- WALLACE, J.R. & CHESSON, A. Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding. John Wiley & Sons, p. 100-103, 2008.