

UOVS-SASOL-BIBLIOTEEK 0241164



11102887800122000018

SEISOENSVARIASIE IN DIE  
AMINOSUURSAMESTELLING VAN  
RUMENPROTOSOë

deur

Johannes Jacobus le Roux Cilliers

Verhandeling  
voorgelê ter vervulling van die  
vereistes vir die graad

Magister Scientiae

in die

FAKULTEIT NATUURWETENSAPPE

in

BIOCHEMIE

aan die

UNIVERSITEIT VAN DIE ORANJE-VRYSTAAT

Studieleier : Dr. P.J. du Toit

Bloemfontein

Februarie 1978

## INHOUDSOPGAWE

BEDANKINGS		BL.
		(i)
LYS VAN AFKORTINGS		(iii)
<u>HOOFSTUK 1</u>	INLEIDING	1
<u>HOOFSTUK 2</u>	LITERATUUROORSIG	4
2.1	INLEIDING	4
2.2	DIE HERKOUER	6
2.2.1	Algemeen	6
2.2.2	Deurvloei van voedsel deur rumen sonder afbreking	10
2.2.3	Degradering van proteïen en aminosure in die rumen	11
2.2.4	Invloed van die aan- of afwesigheid van proteïen, aminosure en nie-proteïenstikstof in die rantsoene van herkouers	16
2.2.5	Swaelmetabolisme	18
2.3	PROTOSOË	21
2.3.1	Algemene aspekte	21
2.3.2	Protosoë in die rumen	23
2.3.2.1	Invloed van die aan- of afwesigheid van protosoë in die rumen	25
2.3.2.2	Koolhidraatmetabolisme van protosoë	28
2.3.2.3	Aminosuurmetabolisme van protosoë	31
2.3.2.4	Vetsuurmetabolisme van protosoë	33
2.3.2.5	Nukleotiedmetabolisme van protosoë	37
2.4	GLIKOSIEDHIDROLASES	38
2.4.1	Algemeen	38
2.4.2	Eienskappe van die amilase molekule	39

		BL.
2.4.3	Koolhidrases in rumenprotosoë	40
<u>HOOFSTUK 3</u>	EKSPERIMENTELE PROSEDURE	42
3.1	PROEFDIERE EN MONSTERING	42
3.1.1	Proefdiere	42
3.1.2	Toestande waaronder die skape aangehou is	42
3.1.3	Monstertrekking	44
3.2	FRAKSIONERING EN ISOLERING VAN RUMENPROTOSOË	45
3.2.1	Voorlopige ondersoeke	45
3.2.1.1	Gebruik van digtheidsgradiënte	45
3.2.1.2	Gebruik van mikrosiwwe	46
3.2.1.3	Vasstelling van optimale detergentkonsentrasie en sentrifugale snelheid	46
3.2.1.4	Gebruik van verskillende suspenderingsoplossings	47
3.2.2	Fraksioneringsprosedure	48
3.3	ANALITIESE METODEDES	50
3.3.1	Stikstofbepaling	50
3.3.2	Koolhidraatbepalings	52
3.3.3	Hidrolise van monsters	52
3.3.3.1	Suurhidrolise	52
3.3.3.2	Alkaliëse hidrolise	53
3.3.3.3	Ensimatiese hidrolise	54
3.3.4	Aminosuurontledings	54
3.3.4.1	Foute in pH by buffer 3,28	54
3.3.4.2	Foute in pH by buffer 5,28	54

		BL.
3.3.4.3	Korreksies vir die verlies van aminosure tydens suurhidrolise	55
3.3.4.4	Berekening van verdunning na vriesdroging van gehidroliseerde monsters	55
3.4	STUDIES OP HIDROLITIESE ENSIEME IN RUMENPROTOSOË	56
3.4.1	Aktiwiteitsbepaling	56
3.4.1.1	Reagense	56
3.4.1.2	Inkubasieprosedure	57
3.4.2	Proteïenbepalings	57
3.4.3	Analitiese jelelektroforese	58
3.4.4	Suiweringsprosedure	59
3.4.4.1	Homogenisering (stap 1)	59
3.4.4.2	Etanolfraksionering (stap 2)	60
3.4.4.3	Chromatografie op DEAE-sellulose (stap 3)	60
3.4.4.4	Jelfiltrasie deur Biogel-P60 (stap 4)	61
3.4.4.5	Chromatografie deur DEAE-sellulose (stap 5)	62
3.4.5	Karakterisering	62
<u>HOOFSTUK 4</u>	RESULTATE EN BESPREKING	64
4.1	MONSTERNEMING EN PROEFTOESTANDE	64
4.2	FRAKSIONERING EN ISOLERING VAN RUMENPROTOSOË	65
4.2.1	Analitiese bepaling	65
4.2.2	Voorlopige ondersoek ten opsigte van fraksioneringsprosedure	66
4.2.3	Finale fraksioneringsprosedure	72
4.3	AMINOSUURSAMESTELLING	82
4.3.1	Opbrengs, herhaalbaarheid en standaardisering	82

	BL.
4.3.2 Aminosuursamestelling van verskillende fraksies	84
4.4 VERGELYKENDE STUDIES VAN SKAPE OP VERSKILLENDE RANTSOENE	107
4.5 STUDIES OP HIDROLITIESE ENSIEME	118
4.5.1 Suiwering van die ensiem	118
4.5.2 Eienskappe van die ensiem	123
<u>HOOFSTUK 5</u> GEVOLGTREKKINGS	129
<u>HOOFSTUK 6</u>	137
OPSOMMING	137
SUMMARY	140
<u>HOOFSTUK 7</u> BYVOEGSELS	143
BYVOEGSEL I                      REËNVALSYFERS	143
BYVOEGSEL II                      STATISTIESE EN ANDER BEREKENINGS VAN RESULTATE	144
BYVOEGSEL III                      AMINOSURE IN GROEPE VOLGENS SYKETTINGSEIENSKAPPE	151
BYVOEGSEL IV                      REKENAARPROGRAMME VIR UNIVACREKENAAR	155
LITERATUURVERWYSINGS	158

BEDANKINGS

Die skrywer wil hiermee sy dank uitspreek teenoor die volgende persone en instansies:

- a) Aan dr. P.J. du Toit wat as studieleier opgetree het en sonder wie se advies en leiding hierdie verhandeling nie moontlik sou wees nie.
- b) Aan prof. P.L. le Roux, hoof van die Departement Biochemie, vir sy belangstelling getoon in hierdie werk.
- c) Aan mnr. P.L. van Biljon van die Departement Biochemie vir die ver-skaffing van 'n hemisellulose monster geïsoleer uit Themeda triandra.
- d) Aan die personeel van die proefplaas Sydenham vir hulle hulp met die versorging van die proefdiere asook aan die personeel van die Departement Kleinveekunde, naamlik prof. A. Smith, dr. P.S. Pretorius en mnr. J.E.J. du Toit vir hulp met die organisering van die proef.
- e) Aan mnr. J.E.J. du Toit van die Departement Kleinveekunde vir die gebruik van sy reeks proefdiere vir ontledings asook inligting in verband met die diere.
- f) Aan die personeel van die rekensentrum, veral mejj. I. van den Berg, N. Bürmann en S. van der Walt vir hulle hulp tydens die skryf van programme.
- g) Aan mnr. H. Rautenbach van die Departement Biometrie vir hulp en advies by die statistiese ontleding van data.
- h) Aan mnr. J.A. van den Berg van die Departement Weidingsleer vir inligting oor die weikamp waarin die proefdiere gehou is.
- i) Aan mnr. C.P. Reynolds vir tegniese hulp verleen tydens die trek van monsters en in die laboratorium.

- j) Aan mnr. D. de Lange en mnr. A. Louw van die N.I.V.S. op Irene vir triptofaanbepalings deur hulle uitgevoer.
- k) My opregte dank aan mej. C.M. Steyn vir haar ondersteuning, volgehoue belangstelling en hulp by die oorskryf van die manuskrip.
- l) Aan mev. R. Steyn vir die taalkundige nasien van die verhandeling.
- m) Aan my ouers wil ek baie dankie sê vir hulle volgehoue belangstelling en morele ondersteuning, veral aan my vader, prof. J.L. le R. Cilliers vir sy organisering van die tik en bind van die verhandeling.

Die lys sou ook nie volledig wees as ek nie Hom, van wie, deur wie en tot wie alles is, ook bedank vir die vermoëns aan my gegee en die geleentheid aan my gegun om hierdie werk te kon doen nie.

Hierdie verhandeling word in dankbare erkenning aan my ouers opgedra.



LYS VAN AFKORTINGS

Ala	alanien
Asp	aspartiensuur
Arg	arginien
B	bakteriese fraksie
BV <sub>H</sub>	bovloeistof hoë sentrifugering (28 000 x g)
BV <sub>L</sub>	bovloeistof lae sentrifugering (100 en 1 000 x g)
Glu	glutamiensuur
Gly	glisien
His	histidien
Ile	isoleusien
K1	perskoekvloeistof 1
K2	perskoekvloeistof 2
K3	perskoekvloeistof 3
Leu	leusien
Lys	lisien
Met	metionien
MHA	metionienhidroksianaloog
P	protosoönfraksie
PK	perskoek
Pro	prolien
PS1	protosoönsediment 1
PS2	protosoönsediment 2
PS3	protosoönsediment 3
PS4	protosoönsediment 4
RCP	rumen ciliata protosoë
RM	heelmonster

RV1	rumenvloeistof 1
RV2	rumenvloeistof 2
Ser	serien
Thr	treonien
Tyr	tirosien
Val	valien
W1	wasoplossing 1
W2	wasoplossing 2
W3	wasoplossing 3
W4	wasoplossing 4

## HOOFSTUK 1

INLEIDING

Een van die belangrikste landboubedrywe in die Republiek van Suid-Afrika is die veebedryf. In die verband is skaapboerdery dwarsoor die land van groot belang. In die droër dele soos die Suid-Vrystaat en Kaapland is dit dan ook een van die belangrikste boerderyaspekte. Dieper kennis betreffende skape in die besonder en die herkouer in die algemeen, kan uit die aard van die belang van veeboerdery net bydra tot voordele vir die bedryf. In die opsig word dan ook baie aandag aan rumenwerking gegee (Barnett & Reid, 1961; Phillipson, 1969).

Wat die fyner aspekte van rumenwerking betref, is heelwat werk reeds gedoen op mikroörganismes wat anaërobies in die rumen voorkom. Navorsers het reeds aangetoon dat die algemene toestand van veral jong herkouers sonder protosoë swakker is as dié waar protosoë in die rumen voorkom (Borhami, El-Shazly, Abou Akkada & Ahmed, 1967; Clemens, Woods & Arthaud, 1974a; Whitelaw, Eadie, Mann & Reid, 1972). Bakteriële populasies wat in die rumen voorkom, is grootliks al geïdentifiseer en onder verskillende omstandighede ondersoek (Hungate, 1966). Hoewel die verskillende hoofspesies protosoë wat in die rumen voorkom reeds beskryf is (Barnett & Reid, 1961), is die spesifieke rol wat rumenprotosoë verrig nog onbekend, veral aangesien die herkouer wel sonder protosoë kan oorleef (Eadie & Hobson, 1962). Hierdie navorsing is dan onder andere ook daarop gemik om te probeer vasstel watter rol protosoë in die rumen speel. In hierdie verband is aminosuurontledings van rumenprotosoë en ander rumenfraksies

uitgevoer.

Die studies wat hier beskryf word, is veral gerig op aspekte van rumenwerking en wel by skape wat op algemene weiding aangehou is.

'n Groep van ses skape is bloot op Digitaria eriantha en Themeda triandra aangehou met genoeg water beskikbaar vir hulle behoeftes.

Geen byvoeding soos bv. kragvoer is aan die diere verskaf nie. Monsters is elke drie weke vir ontleding getrek. Aspekte wat dan ondersoek is en hier gerapporteer word, het hoofsaaklik betrekking op die relatiewe bydraes van die verskillende tipes organismes en ander fraksies wat in die rumen voorkom t.o.v. die voorsiening van aminosure aan die dier.

Hiervoor is die rumenvloeistof gefraksioneer en ondersoek m.b.t.

stikstofinhoud en aminosuursamestelling. Aangesien die proef oor 'n tydperk van 'n jaar uitgevoer is, kan variasies van aminosuursamestelling dan ook met wisseling van seisoene gevolg word. Benewens hierdie waarnemings is ook 'n aanvang gemaak met ondersoeke betreffende die hidrolitiese ensieme wat in die rumen voorkom. Met betrekking tot hierdie ondersoeke is 'n koolhidrase ensiem wat in die protosoönfraksie voorkom, ondersoek en gedeeltelik gekarakteriseer.

'n Belangrike uitvloeisel uit die ondersoek is die direkte aansluiting van hierdie waarnemings by die herkouer. Omdat daar nie met suiwer kulture gewerk is nie, kan waarnemings geredelikerwys op die dier van toepassing gemaak word. Hoewel die verkryging van relatief suiwer protosoönpreparate uit die rumen moeilik is, is 'n herhaalbare tegniek goed ontwikkel. Verder beïnvloed rantsoensamestelling ook die relatiewe hoeveelhede van verskillende groepe organismes in die rumen.

Ondersoeke soos in hierdie proef uitgevoer en wat oor 'n lang tydperk gestrek het, behoort dus 'n aanduiding te gee van die seisoenale effek wanneer diere slegs op die veld gehou word. Die invloed van 'n rantsoen op die herkouer kan ook met hierdie metode vasgestel word en vergelykings kan dan tussen rantsoene getref word. In die verband is 'n reeks monsters vanaf skape wat op spesifieke rantsoene aangehou is dan ook ondersoek. Benewens die waargenome verskille in die samestelling van die rumenfraksies het die resultate tot beduidende verskille betreffende rumenpopulasies gelei.

Hoewel hier hoofsaaklik gekonsentreer is op die relatiewe bydraes van verskillende fraksies tot die aminosuurbehoefte van die dier, kan hierdie tipe studies nog verder gevoer word. In die verband kan ondersoeke van die werklike mataboliese rol van groepe organismes, bakterieë en protosoë, dan heel moontlik lei tot verdere interessante resultate. Studies van hierdie aard gekoppel aan proewe vir die vasstelling van optimum toestande vir groei of wolproduksie behoort tot interessante resultate te lei. Moontlik kan op dié wyse optimale voersamestelling asook die uitwerking van byvoeding vasgestel word.

Heelwat tyd is bestee aan die ontwikkeling van 'n herhaalbare fraksioneringsprosedure. Dit was nodig aangesien analitiese bepalinge op hierdie fraksies oor 'n tydperk van 'n jaar uitgevoer sou word. So-danige studies wat oor so 'n lang tydperk gestrek het, is nog nie tot dusver uitgevoer nie. Hierdie resultate behoort dus tot 'n mate nuwe moontlikhede vir beter gekontroleerde proewe oor langer tydperke te skep. In die verband word veral gedink aan proewe waar hierdie tipe werk tesame met produksieproewe uitgevoer word.

## HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG2.1 INLEIDING

In die rumen word beide protosoë en bakterieë aangetref wat komplekse polimeriese substrate afbreek. Produkte wat vorm, word daaropvolgend deur die herkouer benut (Barnett & Reid, 1961 en Baldwin, 1976a). Hierdie mikroorganismes het ook tot gevolg dat rumenstof met 'n baie konstante biologiese waarde na die ware pens deurbeweeg (Muth & Oldfield, 1969; Purser & Buecher, 1966). Hoewel die aminosuursamestelling van bakterieë nie deur die rantsoen beïnvloed word nie, kan rantsoensamestelling 'n groot invloed op die relatiewe hoeveelhede van beide bakterieë en protosoë hê (Chaplin & Jones, 1973; Maeng, Van Nevel, Baldwin & Morris, 1976).

Volgens Chapula (1975) en Lewis & Emery (1962) word proteïene en aminosure in die rumen afgebreek en na mikrobiese proteïene omgeskakel. Die vinnige afbreking van sekere aminosure in die rumen kan selfs voedings tekorte in die herkouer tot gevolg hê (Neudoerffer, Duncan & Horney, 1971), sodat die deurvloei van sekere voedingstowwe deur die rumen sonder afbreking, 'n verbetering in die kondisie van die herkouer tot gevolg het (Clark, 1975). Proteïene word onder andere gemetaboliseer tot vetsure en ammoniak wat ook 'n bron van stikstof vir die herkouer is (Chapula, 1975). Volgens Maeng & Baldwin (1976a) kan ureum in die rantsoen egter as belangrike bron van stikstof vir die herkouer dien. Dit is meer ekonomies as wanneer stikstof slegs vanaf proteïene en aminosure afkomstig is, sodat die dier stikstof vanaf ander bronne

verkry eerder as deur afbreking van byvoorbeeld essensiële aminosure wat as sulks opgeneem word.

Alhoewel die herkouer volgens Eadie et al. (1962) sonder protosoë kan oorleef, lyk dit asof die protosoë se teenwoordigheid in die rumen voordele vir die gasheer inhou. So lei die teenwoordigheid van baie ciliata tot meer konstante toestande in die rumen (Whitelaw et al., 1972), met die gevolg dat die omskakeling vanaf 'n hoë na 'n lae kwaliteitsrantsoen nie so 'n geweldige invloed op die herkouer het nie (Borhami et al., 1967). Die teenwoordigheid van groot getalle Entodinium caudatum kan byvoorbeeld asidose in die rumen help verhoed by 'n skielike verandering na 'n styselrantsoen. Die rede hiervoor is dat E. caudatum styselkorrels as 'n geheel opneem en oor 'n lang periode metaboliseer met die vrystelling van slegs klein hoeveelhede melksuur (Abou Akkada & Howard, 1960).

Protosoë kan proteïene en aminosure baie ekonomies bekom deur die opname van bakterieë. Epidinium is in staat om self aminosure te sintetiseer sodat dit baie minder bakterieë opneem as Entodinium wat die vermoë van onderlinge omskakeling van aminosure verloor het (Coleman & Laurie, 1974a). Volgens Coleman (1968) kan Entodinium caudatum ook nie ribose vanaf ander koolhidrate sintetiseer nie, en kan dit dus slegs vanaf opgeneemde bakterieë verkry word.

Protosoë het ook 'n invloed op die hidrogenering van onversadigde vetsure (Christopher, Raymond & Moore, 1973). Verskille in vetsuur-konsentrasies word in diere met en sonder protosoë gevind. Volgens Clemens, Woods & Arthaud (1974b) geld hierdie verskille nie net by

vetsure in die serum nie, maar ook by gedeponeerde vette.

## 2.2 DIE HERKOUER

### 2.2.1 Algemeen

Herkouers kan in teenstelling met ander diere groot hoeveelhede vesel, bv. sellulose, as voedsel benut. Hierdie benutting is afhanklik van die aanwesigheid van mikroörganismes hoofsaaklik in die rumen en in 'n mindere mate in die sekum en kolon van die herkouer (Barnett & Reid, 1961). Komplekse polimeriese verbindings word deur die mikroörganismes afgebreek en die herkouer benut daaropvolgend die metaboliese produkte.

Die rumen wat deel uitmaak van die dermkanaal van die herkouer, staan ook bekend as die grootpens. In die rumen kom benewens bakterieë ook protosoë voor. Beide groepe organismes is verantwoordelik vir die fermentasie of afbreking van stysel, sellulose en ander polimeriese koolhidrate asook proteïene. Produkte wat so gevorm word, word dan deur die herkouer benut. Hierdie laasgenoemde produkte is onder andere vlugtige vetsure, aminosure en vitamïnes. Die vitamïnes tiamien, riboflaviën, nikotiënsuur, piridoksien, pantoteënsuur, biotien, foliënsuur, sianokobalamien en vitamien K word bv. so gevorm. Vitamïnes word op die wyse in groot genoeg hoeveelhede aan die dier voorsien sodat dit nie in die rantsoen ingeneem hoef te word nie (Muth & Oldfield, 1969). Kortketting vetsure, gevorm deur mikroörganismes, voorsien in meer as 50% van die herkouer se energiebehoefte (Barnett et al., 1961).

Studies betreffende die biologiese waarde van mikrobiëse proteïen



in die rumen dui volgens Muth & Oldfield (1969) daarop dat rantsoen= proteïen met 'n hoë biologiese waarde se voedingswaarde in werklikheid in die rumen verlaag word. Hierteenoor word koolhidrate, anorganiese stikstof en swael met lae biologiese waardes se voedingswaarde egter in die rumen verhoog. Dit het tot gevolg dat rumenstof met 'n meer konstante biologiese waarde na die ware pens deurbeweeg. Hierdie verwerkte, oftewel mikrobiëse proteïen, oorspronklik vanaf die benutte voedingstof afkomstig wat dan na die ware pens van die herkouer beweeg, is dus in 'n totaal veranderde vorm.

Aminosure wat in die dunderm van herkouers geabsorbeer word, is afkomstig vanaf mikrobiëse en protosoönproteïen, nie-gedegradeerde of beskermde voedselproteïen en aminosure wat deur die rumen beweeg. Eersgenoemde proteïene word dan deur verteringsensieme tot aminosure gehidroliseer (Chapula, 1975).

Purser & Buechler (1966) het aminosuurontledings op 22 verskillende tipes rumenbakterieë gedoen. Van die organismes wat die meeste in die rumen voorkom wanneer veselstof gevoer word, is gebruik. Min verskille in die aminosuursamestelling van die organismes is verkry. Hierdie resultate word later aangegee. Hieruit blyk dat die amino= suursamestelling van bakteriese proteïen wat dan aan die herkouer beskikbaar is, baie konstant is en nie van rantsoen afhanklik is nie.

Rantsoensamestelling het egter 'n belangrike rol in die bepaling van die hoeveelhede en tipes organismes wat in die rumen voorkom.

Volgens Chaplin & Jones (1973) veroorsaak 'n rantsoensamestelling wat

asidose tot gevolg het dat streptococci in die rumen vanaf  $9 \times 10^5$  tot  $1 \times 10^9$  binne 18 uur toeneem, m.a.w. 'n 1 000-voud toename. Lactobacilli kon eers nie waargeneem word nie, maar vertoon getalle van tot  $9 \times 10^8$  binne 48 uur onder hierdie toestande. Melksuur= konsentrasie het vanaf 1,0 mM tot 100 mM toegeneem binne 18 uur. Vlugtige vetsure in die rumen het afgeneem, terwyl  $\text{NH}_3$ -stikstof onder die toestande drievoudig toegeneem het.

'n Herkouer soos die skaap, kan tot 10% van sy liggaamsmassa verloor indien die dier vir 48 uur van water onthou word. Hierdie verlies aan liggaamsmassa kan egter binne 10 minute herstel word deur die inname van genoegsame water. Indien waterverlies egter meer as 30% is, neem dit een tot twee dae om die liggaamsmassa te herstel. Anatomiese organe geassosieer met vertering in herkouers, bv. die rumen, speel blykbaar 'n rol in hierdie vinnige opname van water (Hungate, 1966).

Volgens Abe & Fumio (1973) word 'n afname in protosoöngetalle in 'n kunsrumen met 'n hoë verdunningstempo, m.a.w. 'n vinnige vloei deur die rumen, gevind. Beperkte voedselinname asook beperkte water= inname verminder die getalle holotriche protosoë in die rumen. Dit is egter nog steeds moontlik om holotriche protosoë in diere wat nie rumen ciliata protosoë (RCP) bevat nie, onder hierdie toestande te vestig (Dehority & Males, 1974). Met toenemende verdunningstempo word verminderde outolise van bakterieë, verminderde opname van bakterieë deur protosoë, asook 'n verandering in die mikrobiese samestelling van die rumen gevind (Kennedy, Christopherson & Milligan,

1976).

In aansluiting hierby het Chapula (1975) waargeneem dat 'n rantsoen wat sout bevat 'n verhoogde vloeï deur die rumen veroorsaak as gevolg van 'n groter opname van water. Meer proteïen en ander voedingstowwe word dus vir 'n korter periode aan mikrobiëse degradering blootgestel. So is vasgestel dat met 'n rantsoen wat 20% sout bevat 'n verdubbeling in die inname van water en 'n verhoogde produksie van wol verkry word. Dit kan heelwaarskynlik toegeskryf word aan 'n verhoogde beskikbaarheid van nie-gedegradeerde proteïen en ander voedingstowwe, met 'n hoë biologiese waarde, aan die dier.

Volgens Weller & Pilgrim (1974) was die protosoönkonsentrasie in die uitvloeï uit die rumen, relatief tot 'n oplosbare merker wat aanhoudend direk in rumen toegedien is, gewoonlik minder as 20% van die ooreenstemmende protosoönkonsentrasie in die rumenvloeïstof. Protosoë voorsien verder 20% van die herkouer se voedingstowwe (Barnett & Reid, 1961). Vlugtige vetsure wat die rumen verlaat, is minder as 75% van die konsentrasies wat in die rumen voorkom. 'n Groot hoeveelheid vetsure word in die rumen omgesit na gas en word ook vir ander metaboliese prosesse van die mikroörganisme gebruik.

Uit bogenoemde volg dat voedingstowwe in 'n rumen wat 'n hoë verdunningsstempo het, vir korter tye aan mikrobiëse afbreking blootgestel word, sodat meer vry aminosure en onafgebreekte proteïene die ware pens bereik. Dieselfde resultaat kan bereik word deur voedingstowwe teen mikrobiëse afbreking in die rumen te beskerm deur byvoorbeeld

enkapsulering en chemiese modifisering.

### 2.2.2 Deurvloei van voedsel deur rumen sonder afbreking

Proteïene en aminosure wat oplosbaar is in rumenvloeistof word baie vinnig in die rumen gehidroliseer en gedeamineer deur ensieme vanaf mikroörganismes afkomstig. Omdat proteïenbronne varieer in hul oplosbaarheid is die graad van degradering ook varieerbaar (Chapula, 1975; Clark, 1975; Mangan, 1972).

Volgens Chapula (1975) kan vanaf 40% tot soveel as 80% van die rantsoenproteïen in die rumen gedegradeer en omgeskakel word na mikrobiële proteïene. Die proteases van bakterieë in die rumen is op die seloppervlakte geleë. Beide ekso- en endopeptidases word so aangetref. Bakteriële proteases is konstitutiewe of altyd voorkomende ensieme en is onafhanklik van metaboliese kontrole, m.a.w. nie-induseerbaar. Byvoeging van addisionele ureum het geen invloed op die tempo of graad van degradering van proteïen wat in die rantsoen voorkom nie.

Voedingstekorte kan ontstaan by herkouers as gevolg van hierdie hidrolise en afbreking van voedselbestanddele. Daarby is mondelinge toediening van medisyne moeilik aangesien dit ongunstige uitwerking op die mikroörganismes van die rumen kan hê. Medisyne kan ook deur die mikroörganismes gemetaboliseer of afgebreek word (Neudoerffer et al., 1971). Om soortgelyke probleme te voorkom en die degradering van proteïen en aminosure teen te werk, is o.a. hitte- en chemiese behandeling, enkapsulering of die gebruik van aminosuur-

analöö al toegepas (Chapula, 1975; Neudoerffer et al., 1971).

Volgens Clark (1975) het die deurvloei van sekere voedingstowwe deur die rumen, sonder afbreking deur die mikroörganismes, 'n verbetering in die kondisie van lakterende koeie en skape tot gevolg gehad.

Om die direkte invloed van voedingstowwe wat deur die rumen vloei te bestudeer, is kaseïen na die rumen toegedien. Hierdie behandeling het 'n toename in melkproduksie van een tot vier kg per koei per dag, asook 'n toename in melkproteïenopbrengs van 10 tot 15% tot gevolg. Hierby sluit ook die waarneming betreffende verhoogde vloei deur die rumen as gevolg van 'n verhoogde soutinname aan. Die rumen veroorsaak dus nie noodwendig optimale benutting van voedingstowwe nie. Blykbaar funksioneer die rumen die effektiëfste indien 'n lae graad voer gebruik word. Wanneer 'n hoë biologiese waarde proteïen toegedien word veroorsaak die rumen dus eintlik 'n verlaging in die effektiewe benutting van die voedingstof. Indien proteïen in die rantsoen beskermde groepe het, sodat dit nie maklik afgebreek kan word nie, sal die herkouer ook hierdie hoë biologiese waarde proteïen kan benut.

### 2.2.3 Degradering van proteïen en aminosure in die rumen

Kaseïen het 'n halfleeftyd van slegs 5,6 tot 21,5 minute en word dus vinnig in die rumen afgebreek. Vanuit die kaseïen word volgens Mangan (1972) peptiede, vry aminosure en laastens ammoniak gevorm. Tot 43% van die kaseïenstikstof word as ammoniak in die rumenvloeistof gevind. Valien, leusien, isoleusien en lisien is teenwoordig in die vry vorm as 25, 27, 21 en 28% onderskeidelik van die hoeveelheid oor=

spronklik teenwoordig in die kaseïen. Daarteenoor was die ander aminosure slegs in ongeveer 6% van die oorspronklike hoeveelhede nog as intakte vrye aminosure teenwoordig.

Lewis & Emery (1962) het in vitro studies op die relatiewe tempo van deaminering van aminosure deur rumenmikroörganismes uitgevoer. Kaasdoekfiltreerde rumenvloeistof en gewaste suspensies van rumenbakterieë is vir hierdie doel gebruik. Volgens die resultate verkry kan aminosure in drie groepe ingedeel word t.o.v. die relatiewe tempo waarteen deaminering plaasvind. Die aminosure Ser, Cys, Asp, Thr en Arg word feitlik volledig gedeamineer; Glu, Phe, Lys, Cys Cys vorm 'n intermediêre groep, terwyl Trp,  $\delta$ -amino-valeriaansuur, Met, Ala, Val, Ile, ornitien, His, Gly, Pro en Hypro baie stadig gedeamineer word. 'n Mengsel van drie of vier aminosure is nie meer gedeamineer as wanneer die aminosure alleen teenwoordig is nie. Die relatiewe tempo's van 24 uur se in vitro afbreking word in tabel 2.1 aangetoon. Slegs  $10 \mu\text{mol}/\text{cm}^3$  aminosuur is by kaasdoekfiltreerde rumenvloeistof of gewaste suspensie van rumenbakterieë gevoeg. Die tempo van afbreking was vinniger en vollediger in rumenvloeistof as in gewaste selsuspensies.

Deur  $\text{NH}_3$ -vorming te meet tydens die katabolisme van die optiese isomere van ses aminosure is die resultate soos in tabel 2.2 aangetoon, gevind. Beide isomere van sekere aminosure, bv. serien en triptofaan word ewe goed afgebreek. Die L-isomere van aspartiensuur, lisien, treonien en fenielalanien word geredelik afgebreek, maar die D-enantiomorfe vorms stadig of glad nie. Soos in tabel 2.3 aangetoon,

Tabel 2. 1

Persentasie individuele aminosure afgebreek deur rumenvloeistof en 'n gewaste selsuspensie oor 24 uur.

Aminosuur	% Afbreking	
	Rumenvloeistof	Gewaste selsuspensie
L-serien	100	99
L-sisteïen	99	85
L-aspartiensuur	95	86
L-treonien	83	69
L-arginien	80	57
L-fenielalanien	75	21
L-glutamiensuur	64	57
L-lisien	57	37
L-sistien	47	34
DL-triptofaan	37	15
L-histidien	33	14
L-metionien	32	18
L-ornitien	29	14
L-valien	29	11
L-alanien	28	14
L-leusien	24	11
L-isoleusien	22	10
glisien	10	2
L-hidroksiprolien	9	2
L-prolien	8	1

Tabel 2.2

Persentasie afbreking van optiese isomere van ses aminosure

Aminosuur	Medium	% Afbreking		
		L	DL	D
serien	rumenvloeistof	100	100	
serien	gewaste selsuspensie	99	99	
aspartiensuur	rumenvloeistof	95	53	
treonien	rumenvloeistof	83	42	
fenielalanien	rumenvloeistof	75	44	
lisien	rumenvloeistof	57	41	
triptofaan	gewaste selsuspensie	19	17	15

Tabel 2.3

Ammoniakproduksie vanuit ses aminosure deur rumenvloeistoffraksie.

Inkubasie is vir 8 uur gedoen.

Aminosuur	Ammoniak-N (mg/100 ml)		
	Teoretiese opbrengs	Werklike opbrengs	% afbreking
L-arginien	56,04	24,14	43
L-aspartiensuur	14,01	5,16	37
L-serien	14,01	4,52	32
L-sisteïen	14,01	4,39	31
L-lisien	28,02	2,56	18
DL-triptofaan	14,01	1,82	13



kan gesien word dat arginien in die 8 uur van inkubasie ongeveer 5 keer soveel ammoniak gevorm het as die ander aminosure wat ondersoek is (Lewis en medewerkers, 1962).

Die hoofmetaboliet van die metabolisme van L-triptofaan deur rumenmikroörganismes is 3-metielindool wat dan in die bloed geabsorbeer word. Indien L-triptofaan in té groot hoeveelhede ingeneem word, het dit akute pulmonale emfiseem tot gevolg (Yokoyama, Carlson & Dickenson, 1973).

Schwab, Clay & Satter (1975) het rantsone waarin sekere aminosure nie teenwoordig was nie aan lakterende koeie toegedien. Op 'n vergelykende basis van hoeveelheid melk (kg) en melkproteïen (g) gelewer, is bevind dat lisien die eerste beperkende faktor was, met treonien die daaropvolgende. Metionien en isoleusien was skynbaar die volgende beperkende faktore. Dit is baie moeilik om essensiële aminosure in die rumen te bepaal omdat daar bakterieë en protosoë is wat self aminosure sintetiseer. Hier word dus slegs faktore benodig vir optimale groei bepaal.

Volgens Chapula (1975) is die proses van mikrobiëse proteïenbiosintese energie-afhanklik. Daarom is die hoeveelheid dieetproteïen wat na mikrobiëse proteïen omgeskakel word, 'n belangrike aspek van stikstofekonomie. Ammoniak is die primêre bron van stikstof vir rumenbakteriese groei. Ammoniak kan egter net so doeltreffend en meer ekonomies, deur nie-proteïenstikstof voorsien word. Die hoofdoel van deaminering van aminosure mag dus die vorming van vertakte

ketting vetsure, benodig deur sekere rumenbakteriese spesies, asook ammoniakvorming vir proteïenbiosintese in die rumen wees. Min is bekend omtrent energie-omsettings tydens rumendeaminering, maar dit lyk asof hoë-energieverbindings vorm na die deaminering van aminosure. Oor hierdie onderwerp is daar egter min verdere inligting beskikbaar.

#### 2.2.4 Invloed van die aan- of afwesigheid van proteïen, aminosure en nie-proteïenstikstof in die rantsoene van herkouers

Volgens Al-Rabbat, Baldwin & Weir (1971) is 61% van mikrobiiese stikstof afkomstig van ammoniak en slegs 39% vanaf aminosuur- en peptiedstikstof. Aansienlik meer mikrobiiese proteïen word gevorm wanneer beide ureum en aminosure in 'n rantsoen ingesluit is (Hume, 1970). Maeng & Baldwin (1976a) vind met in vitro gewaste selsuspensies van rumenbakterieë dat 75% ureum plus 25% aminosure meer stimulerend op bakteriële groei is as 100% ureum. Proteïenhidrolisate verkry van mikroorganismes van herkouers wat ureum as enigste stikstofbron kry, se aminosuurpatrone is soortgelyk aan dié van herkouers wat proteïenbevattende rantsoene kry (Oltjen, 1969).

In proewe waar ureum as enigste stikstofbron aan koeie gevoer is, het die byvoeging van 0; 15; 30 en 45 mg aminosuurstikstof in die plek van ureum, opbrengste van 326,0; 444,4; 497,3 en 527,3 g melkproteïen onderskeidelik per dag gelewer (Maeng & Baldwin, 1976b). In die bloedplasma van herkouers wat proteïenvrye rantsoene ontvang, is die konsentrasies van die essensiële\* aminosure laer, terwyl hoër konsen-

---

\*Die begrip "essensiële" word nie in hierdie of in ander literatuur duidelik gedefinieer t.o.v. spesifieke aminosure nie.

trasies glisien en serien teenwoordig is. Onder hierdie toestande word ook verlaagde konsentrasies van vertakte ketting vetsure gevind, hoewel die sintese van die "B"-vitamines skynbaar normaal is (Oltjen, 1969)

Volgens Maeng et al. (1976a) is die optimum verhouding van nie-proteïen- tot aminosuurstikstof vir mikrobiëse groei 75% ureum-N en 25% aminosuur-N. Van die bygevoegde aminosure is 53% in mikrobiëse selle geïnkorporeer, 14% is gefermenteer tot CO<sub>2</sub> en vlugtige vetsure, terwyl 33% in die bovloeistof gebly het. Beide 100% ureum en 100% aminosure in die groeimedium was ongunstig vir maksimale groei. Rantsoene wat verskillende konsentrasies proteïene bevat sal dus 'n invloed hê op konsentrasies van beide protosoë en bakterieë.

Groot hoeveelhede stysel in die voer veroorsaak dat mikrobiëse proteïenbiosintese vanaf <sup>14</sup>C-gemerkte aminosure toeneem, terwyl fermentasie van aminosure afneem. Mikrobiëse groei, hoeveelhede aminosure geïnkorporeer in mikrobiëse selle, vlugtige vetsuur- en CO<sub>2</sub>-konsentrasies is afhanklik van die hoeveelheid stysel wat in die rumen agterbly (Maeng et al., 1976b).

Herkouers benodig dus stikstofbronne soos aminosure en ureum. Die toediening van slegs een van genoemde twee stikstofbronne is egter ongunstig vir maksimale groei en het 'n afname in konsentrasie van mikroörganismes in die rumen tot gevolg. Deur lg. konsentrasies van herkouers wat op verskillende rantsoene is te vergelyk kan dus sekere afleidings i.v.m. die waarde van 'n rantsoen gemaak word. Uit 'n landboukundige en ekonomiese oogpunt is dit baie belangrik

omdat sekere byvoegings tot spesifieke rantsoene tot optimale groei-toestande kan lei.

#### 2.2.5 Swaelmetabolisme

Swael en swaelbevattende verbindings word baie vinnig in die rumen-gemetaboliseer. Slegs spoorhoeveelhede anorganiese swael bly bv. binne 3 tot 5 uur na voeding met 'n rantsoen wat 0,15% totale swael en 0,2% natriumsulfaat bevat, oor (Lofgreen, Weir & Wilson, 1953). Volgens Kulwich, Struglia & Pearson (1957) word gemerkte swael soos in  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  vinnig in die spysverteringskanaal geabsorbeer en uitgeskei. Urinêre  $^{35}\text{S}$ , uitgeskei in die eerste dag, was ongeveer 35%, terwyl die totale vierdaagse uitskeiding 49% van die oorspronklike dosis was. Ongeveer 17% van die  $^{35}\text{S}$  word vinnig in die faeces uitgeskei. Die verskyning van  $^{35}\text{S}$  in die faeces vind lank voor die verskyning van ander voedselresidu's, wat deur die hele dermkanaal moet beweeg, plaas. Hieruit kan afgelei word dat  $^{35}\text{S}$  in die faeces afkomstig is van die vinnige opname van  $^{35}\text{S}$  vanuit die rumen en verteeringskanaal, waarna dit in die ingewande en gal uitgeskei is.

Volgens Muth & Oldfield (1969) word swaelbevattende aminosure wat in die rantsoen van 'n herkouer voorkom grootliks of totaal by aankoms in die rumen gedeamineer. Die gedeamineerde swaelverbindings dien dan as bron van swael vir anabolisme deur die rumenmikroörganismes. Swaelbevattende aminosure kan in die rumen tot so 'n mate afgebreek word dat die swael 'n sulfiedpoel vorm. Volgens McMenniman, Ben-Ghedalia & Elliot (1976) is daar 'n direkte verband tussen swael in

die sulfiedpoel en totale swael in rumenbakterieë. Hierdie verhouding geld slegs as daar min of geen voorafgevormde aminosure in die rantsoen is, sodat swaelbevattende aminosure de novo gevorm moet word. Hieruit kan afgelei word dat grasrantsoene wat 'n hoë inkorporering van sulfiedswael in mikroorganismes het, 'n laer vlak van rantsoenstikstof bevat. Indien 'n rantsoen egter aansienlike hoeveelhede voorafgevormde aminosure bevat, word tot 44% van die totale swael en 72% sistienswael wat in bakterieë geïnkorporeer word, nie vanaf die rumensulfiedpoel verkry nie. Met protosoë was die hoeveelheid sulfiedswael inkorporering altyd laer as die waargenome waardes vir die bakteriese monster. 'n Rede hiervoor is dat protosoë aminosure verkry deur intakte opname.

Rantsoene bevat egter nie altyd genoeg swaelbevattende aminosure nie. Byvoeging van 0,5% metionien of sulfaat by rantsoene het 'n beter uitwerking op wolproduksie as byvoeging van dieselfde hoeveelheid van die element swael (Garrigus, Mitchell, Hale & Albin, 1950). Beide <sup>35</sup>S en gemerkte natriumsulfaat het die vorming van gemerkte sistien in wolproteïen tot gevolg (Hale & Garrigus, 1953). Volgens Keener, Teeri, Harrington & Baldwin (1953) is gemerkte <sup>35</sup>S, afkomstig van swaeldioksied wat gebruik is by die preservering van kuilvoer, in melk- en bloedproteïen gevind na voeding met die kuilvoer.

Deur aan lakterende koeie rantsoene waarin sekere aminosure nie teenwoordig is nie toe te dien, het Schwab et al. (1975) vasgestel dat metionien een van die beperkende faktore vir groei is en dat dit in die rantsoen teenwoordig moet wees. Volgens Gil, Shirley &

Moore (1973) toon die vry suur en kalsiumsout van metionienhidroksianaloog (MHA) en DL-metionien identiese groeistimulering op bakterieë. MHA het egter geen invloed op die aminosuursamestelling van bakteriese proteïene nie.

Mikroörganismes van die rumen neem met in vitro studies 10 tot 40% van die swael van gemerkte sulfaat op (Lofgreen et al., 1953). Volgens Kulwich et al. (1957) gee die bepaling van  $^{35}\text{S}$  in bloed 'n verdere aanduiding van die snelle absorpsie van swael. Alhoewel maksimale  $^{35}\text{S}$  konsentrasies binne een tot drie uur na toediening in die bloed gevind word, kan herkouters volgens Clark (1975) en Neudoerffer et al. (1971) voedingstekorte kry as gevolg van hidrolise en afbreking in die rumen. So word gemerkte metionien en S-metiel-L-sistien volgens Merricks & Salsbury (1975) in die rumen afgebreek na o.a.  $^{35}\text{S}$ -gemerkte metaantiol en  $\text{H}_2\text{S}$ .

Indien voedingstowwe deur 'n kapsule wat sonder afbreking deur die rumen kan beweeg, omsluit word, sal die herkouer baie daarby kan baat. In die werklike pens en ingewande van die herkouer verteer die omhullende matriks (bv. 'n koalienversadigde vetkapsule) om die voedingstowwe vry te stel vir absorpsie. In vitro en in vivo studies toon aan dat 60 tot 65% metionien, wat met behulp van 'n kapsule toegedien is, in die ingewande geabsorbeer word (Neudoerffer et al., 1971).

Swael vorm dus 'n belangrike bestanddeel wat in die rantsoen voorsien moet word (Schwab et al., 1975). Selfs die swael van  $\text{SO}_2$  gebruik vir die preservering van kuilvoer, word na voeding met die kuilvoer in melk-

en bloedproteïen aangetref (Keener et al., 1953). Volgens Muth & Oldfield (1969) word swaelbevattende aminosure totaal of tot 'n groot mate gedeamineer en 'n sulfiedpoel word gevorm (McMenniman et al., 1976). Metionien is volgens Schwab et al. (1975) 'n beperkende faktor vir groei. Dit kan egter teen afbreking in die rumen beskerm word deur dit toe te dien met 'n kapsule wat bestand is teen afbreking deur mikroörganismes. In die normale omstandighede egter, moet die metionien voorsien word deur intakte mikroörganismes en aminosure wat deur die rumen beweeg. In die verband kan die protosoë as maklike bron van proteïen in die verteringskanaal, dus ook 'n belangrike funksie vervul.

Dit is egter onwaarskynlik dat hoë konsentrasies swaelbevattende aminosure vry en selfs gebonde in die rumenvloeistof of mikrobiëse populasies sal voorkom. Dit is dan ook 'n aspek wat bewys word deur die lae waardes vir die swaelbevattende aminosure in die onderskeie rumenfraksies.

## 2.3 PROTOSOË

### 2.3.1 Algemene aspekte

Protosoë is eukariotiese, eensellige organismes wat membraangebode organelle soos o.a. 'n nukleus, mitochondria en lisosome bevat. Selle van alle hoër organismes, beide plant en dier van die hoër Protista, is eukarioties. Bakterieë, virusse en rickettsias in teenstelling, is almal laer Protista en prokarioties.

Volgens Manwell (1961) kom protosoë wydverspreid voor en word byna orals behalwe in die lug aangetref. Protosoë word in moerasse, damme, mere en strome gevind. Baie spesies word in die see gevind terwyl 'n dosyn of meer spesies selfs in die Dooie See, wat 'n geweldige hoë soutkonsentrasie het, aangetref word. Die gunstigste habitat is egter plante en die liggame van diere waar voedsel binne maklike bereik is.

Omtrent 20% van alle protosoë is parasiete of simbiote (Manwell, 1961). Protosoë het egter ook parasiete en simbiote. Buiten sekere fungi (Sphaerita en Nucleophaga) word protosoë meestal deur bakterieë aangeval.

Vrylewende protosoë kan in drie groepe ingedeel word en wel volgens die bewegingsorganelle. Vorme met flagella word mastigophora of flagellata genoem. Spesies met pseudopodia is bekend as sarcodina en dié met cilia as ciliophora. Daar is ook nog 'n vierde groep bekend as sporosoë waarvan al die lede parasiete is (Grell, 1973; Manwell, 1961).

Volgens Grell (1973) het 'n paar protosoënsesies onmisbaar geword vir die gashere waarin diesulkes voorkom. 'n Voorbeeld is die flagellata wat in die ingewande van termiete voorkom. Hierdie insekte het die vermoë verloor om hout te metaboliseer. In die afwesigheid van die parasitiese fauna eet die insek nog steeds maar sterf van honger vanweë 'n onvermoë om die voedsel wat ingeneem word, te metaboliseer. 'n Soortgelyke situasie word in die rumen gevind waar veselstof soos sellulose asook stysel deur mikroorganismes gemetaboliseer word.



### 2.3.2 Protosoë in die rumen

Volgens Barnett & Reid (1961) bevat 'n tipiese rumenpopulasie ongeveer 30 protosoönspesies. Getalswys kan dit meer as  $1 \times 10^6$  organismes per gram rumeninhoud uitmaak, terwyl soveel as  $50 \times 10^9$  bakterieë per gram rumeninhoud aangetref word. In die rumen word veral ciliata aangetref en wel spesies soos in tabel 2.4 aangetoon. Daar is bereken dat protosoë tot 20% van die herkouters se voedingstowwe kan voorsien.

Tabel 2. 4

Klassifikasie van ciliata wat in die rumen aangetref word.

Orde	Genus	Spesies
Holotrich	<u>Isotricha</u>	<u>I. prostoma</u>
		<u>I. intestinalis</u>
	<u>Dasytricha</u>	<u>D. ruminantium</u>
Oligotrich	<u>Diplodinium</u>	
	<u>Entodinium</u>	<u>E. caudatum</u>
	<u>Epidinium</u>	<u>E. simplex</u>
	<u>Ophryoscolex</u>	

Ciliata leef in die rumen onder toestande wat feitlik permanent anaërobies is. Hierdie protosoë maak van anaërobiese weë vir respiratoriese metabolisme gebruik. Die meeste spesies kan 'n lae  $\text{CO}_2$ -konsentrasie verdra, maar 'n te hoë konsentrasie vergiftig egter sekere spesies. Epidinium spp. benodig  $\text{CO}_2$ -gas vir volle aktiwiteit. Indien die herkouer oornag uitgehonger sou word, is die gas in die

rumen hoofsaaklik stikstof. As voedsel ingeneem word, sal tyd verloop tydens fermentasie om genoeg CO<sub>2</sub>-gas te produseer om die rumenvloeistof te versadig (Oxford, 1958; Sleight, 1973).

Volgens Sleight (1973) mag die afskeiding van sekere metaboliese produkte die pH in die rumen verander. Lae pH het tot gevolg dat rumenprotosoë afsterf. Clemens, Woods & Arthaud (1974a) het hiervan gebruik gemaak om protosoë uit die rumens van proefdiere te verwyder d.m.v. 'n rantsoen van gelatineerde koring. Lg. voedselbron het 'n daling in pH tot gevolg wat lei tot die afsterwing van protosoë in die rumen.

Entodinium simplex kan nie in vitro in die afwesigheid van bakterieë gekweek word nie. Deur <sup>14</sup>C-gemerkte Escherichia coli by 'n E. simplex kultuur te voeg is waargeneem dat 'n enkele protosoön  $1,1 \times 10^4$  E. coli maksimaal kan opneem. Dit is ekwivalent aan 200 bakterieë per protosoön per minuut. Na 30 minute was slegs 12% van die opgeneemde bakterieë nog sigbaar. Vyftig persent van die <sup>14</sup>C is deur die protosoë behou. Na homogenisering en sentrifugering was 40% hiervan teenwoordig in die oordeckende vloeistof, sodat dit moontlik in proteïen omgesit was (Coleman, 1969). Kennedy et al. (1976) beweer verder dat tot 40% van die rumenbakterieë deur protosoë opgeneem kan word.

Sekere bakterieë soos E. coli, Clostridium welchii en Lactobacillus casei se teenwoordigheid het 'n vermeerdering in die getalle van Epidinium caudatum tot gevolg. In proewe waar twee verskillende soorte bakterieë aan die protosoë verskaf is, is gevind dat die

bakterieë geabsorbeer word in die verhouding waarin dit teenwoordig was (Coleman, 1969). Volgens Coleman & Laurie (1974b) vind lise van <sup>14</sup>C-gemerkte B. megaterium in die teenwoordigheid van Epidinium egter plaas sonder opname van bakterieë. Hierdie bevinding dui op die uitskeiding van 'n ekstrasellulêre ensiem wat die lise van bakterieë tot gevolg het.

#### 2.3.2.1 Invloed van die aan- of afwesigheid van protosoë in die rumen

Tot onlangs is die funksie van protosoë om as voedsel vir die herkouer te dien, bevraagteken. Voorheen is dit aangeneem dat fermentasie in die rumen hoofsaaklik deur bakterieë uitgevoer word terwyl uitskeidings deur die protosoënsel van minder belang is. Die vraag of protosoë se aan- of afwesigheid in die rumen 'n groot invloed op die herkouer in die algemeen sal hê, moet nog beantwoord word. Die onderwerp word dus hier breedvoerig behandel met die doel om bogenoemde vraag te probeer beantwoord. Terselfdertyd word die relatiewe bydrae van die protosoë ondersoek.

Volgens McNaught, Owen, Henry & Kon (1954) is biologiese waardes van 81 en 80 vir die proteïene van bakterieë en protosoë verkry. Die ooreenstemmende waardes vir ware verteerbaarheid was 74 en 91% onderskeidelik. Hiervolgens lyk dit asof die omsetting van bakteriese of rantsoenproteïene in protosoënpoteïene voordelig vir die gasheer kan wees.

Sekere bakterieë word nie in die spysverteringskanaal van herkouers afgebreek nie. Die proteïene van hierdie bakterieë is dus nie vir

die gasheer beskikbaar nie. Bakterieë wat deur die protosoë as voedselbron benut word, word binne die protosoön ensimaties afgebreek. Op hierdie manier is die bakteriese proteïen dan aan die gasheer beskikbaar aangesien protosoë maklik in die spysverteringskanaal afgebreek word (Pounden & Hibbs, 1950).

Tellings van sellulolitiese bakterieë neem geweldig af sodra 'n rumen ciliata protosoë (RCP) vrye herkouer met protosoë geïnkuleer word. Opname van bakterië deur protosoë is egter nie alleenlik verantwoordelik vir so 'n geweldige afname in bakteriese getalle nie. 'n Ander rede hiervoor is dat bakterieë en protosoë kompeteer vir dieselfde substraat. In die afwesigheid van protosoë is daar meer substraat beskikbaar vir bakteriese groei, en gevolglik lei dit tot hoër getalle bakterieë (Eadie & Hobson, 1962).

Slegs 'n klein massaverskil word tussen RCP-vrye kalwers en kalwers met die normale rumenflora aangetref (Pounden & Hibbs, 1950). Normale kalwers was egter swaarder en in 'n beter kondisie as die RCP-vrye kalwers. Hierteenoor vind Eadie & Gill (1971) dat die afwesigheid van protosoë nie opmerklike groot veranderinge in die volwasse herkouer teweegbring nie. Daar was geen verskil in totale proteïenstikstof en oplosbare koolhidrate in die rumen onder beide toestande nie.

Volgens Borhami et al. (1967) het geïnkuleerde kalwers vinniger gegroei as dié wat geen protosoë bevat nie. Die uitwerking was die grootste in dié diere waar 'n hoë kwaliteitsrantsoen vervang

is deur een met 'n lae kwaliteit na 45 tot 75 dae. Diere wat hoër kwaliteitsrantsoene vir 120 dae ontvang het, het nie sulke uitstaande verskille getoon nie.

Deur lammers met verskillende spesies protosoë (Entodinium, Diplodinium, Isotricha, Ophryoscolex) en 'n kombinasie van genoemde vier spesies te inokuleer, het Christiansen, Kawashima & Burroughs (1965) vergelykings met RCP-vrye lammers getref. Waarnemings is t.o.v. pH,  $\text{NH}_3^-$ , totale vlugtige vetsuurkonsentrasie en verhoudings tussen sure in die rumen, gemaak. Lammers waar protosoë teenwoordig is, het 'n vinniger massa-toename as RCP-vrye diere getoon. Die pH in die rumenvloeistof was laer terwyl vetsuur- en  $\text{NH}_3^-$ -vlakke hoër was as in die RCP-vrye lammers. Lammers waarin enkele protosoënsesies geïnokuleer is, toon dieselfde tendens as dié waarin meer protosoënsesies voorkom.

Aansienlike verskille is waargeneem tussen geïnokuleerde en RCP-vrye diere t.o.v. konsentrasies van ureum in die bloed en glukose in die plasma. Die hoër konsentrasie glukose in die plasma van RCP-vrye diere word toegeskryf aan die hoër propioonsuurkonsentrasie in die rumen. Die verskille waargeneem t.o.v. bloed ureumkonsentrasie kan verklaar word aan die hand van hoër ammoniakkonsentrasie in die rumen, wat hoër is as gevolg van die afwesigheid van protosoë (Whitelaw, Eadie, Mann & Reid, 1972).

Teenwoordigheid van protosoë in die rumen lei tot 'n hoër vlugtige vetsuurkonsentrasie, laer  $\text{NH}_3^-$ -konsentrasie asook 'n laer pH.

'n Afname in propioonsuur- tot bottersuurverhouding en 'n toename

in propioonsuur- tot asynsuurverhouding word ook verkry (Abou Akkada & El-Shazly, 1964; El-Shazly et al., 1967). Die belangrike rol wat protosoë in die lipiedmetabolisme het sal later bespreek word. Toe= stande in die rumen is volgens Whitelaw et al. (1972) meer konstant in die teenwoordigheid van groot getalle ciliata as in hul afwesigheid. Veranderinge in die aantal ciliata is in ooreenstemming met veranderinge in rumen pH en verhoudings van vlugtige vetsure.

Volgens bg. resultate kan afgelei word dat herkouers wel sonder protosoë kan klaarkom en dat lg. se funksies dan deur bakterieë oor= geneem word (Eadie et al., 1962). Soos egter gesien kan word hou die teenwoordigheid van protosoë voordele vir die gasheer in, bv. konstanter toestande in die rumen (Whitelaw et al., 1972) en omska= keling van bakteriese en rantsoenproteïene in makliker verteerbare protosoönproteïene. Protosoönteenoordigheid kan dan ook as 'n buffer by die skielike omskakeling van 'n hoë na 'n lae kwaliteitsrantsoen dien (Borhami et al., 1967).

#### 2.3.2.2 Koolhidraatmetabolisme van protosoë

Koolhidrate soos glukose, fruktose en sukrose word geredelik in die rumen afgebreek. Laktose, maltose en galaktose word minder effektief benut terwyl stysel en sellulose ook stadig gemetaboliseer word (Barnett & Reid, 1961). Fermentasie van glukose geskied so vinnig dat dit feitlik nie na toediening waargeneem kan word nie. Drie= koolstof (3C) verbindings soos pirodruiwesuur en melksuur wat in die rumen voorkom word uitsluitlik via die glikolitiese weg gevorm

(Phillipson, 1969).

Volgens Abou Akkada, Hobson, Hobson & Howard (1959) word tydens die metabolisme van koolhidrate vlugtige vetsure soos bottersuur, propioon= suur, asynsuur en mieresuur in die molêre verhoudings 51 : 10 : 35 : 4 gevorm.

Glukose het volgens Abou Akkada & Howard (1960) geen invloed op die opname van stysel deur Entodinium caudatum nie. Koolhidraatbehoefte van hierdie protosoön word slegs deur die fermentasie van styselkorrels bevredig. Die relatiewe verspreiding van koolstofatome in die produkte gevorm vanuit die metabolisme van of stysel of glukose deur E. caudatum en ander protosoë, is soos in tabel 2.5 opgesom. Volgens hierdie tabel vorm Entodinium dus baie min melksuur. 'n Groot inname van stysel kan egter nadelig vir herkouers wees as gevolg van die vinnige produksie van groot hoeveelhede melksuur wat dan 'n afname in pH in die rumen veroorsaak. Die teenwoordigheid van groot getalle Entodinium spp. kan dus voordelig wees vir die gasheer waarin dit voorkom omdat so 'n situasie dan verhoed word. Entodinium neem styselkorrels as 'n geheel op en stoor dit voor metabolisering oor 'n lang periode plaasvind. Klein hoeveelhede melksuur word dan onder hierdie toestande gevorm.

Tabel 2. 5

Relatiewe verspreiding van koolstofatome in gevormde produkte.  
 Waardes uitgedruk as persentasie koolstof van totale koolstof  
 in uitgangstowwe.

Organisme en substraat	Produkte		
	Melksuur	vlugtige vetsure	CO <sub>2</sub>
<u>Isotricha</u> + <u>Dasytricha</u> (reserwe stysel)	53	32	15
<u>Isotricha</u> + <u>Dasytricha</u> (bygevoegde glukose)	38	44	18
<u>Dasytricha</u> (bygevoegde glukose)	49	31	22
<u>Entodinium caudatum</u> (opgeneemde stysel)	2	80	19

Eudiplodinium medium metaboliseer nie eenvoudige suikers nie, maar benut wel stysel, amilopektien, amilose en toon 'n hoë aktiwiteit teenoor hemiselluloses. Xilane word vinniger gedegradeer as arabane maar e.g. lei nie tot die vorming van soveel vlugtige vetsure as lg. nie. Geen sellulosevertering vind plaas nie, maar proteolitiese aktiwiteit word t.o.v. gelatien en kaseïen gevind. Selvrye ekstrakte van E. medium kan ook koolhidrate metaboliseer, net soos die intakte organisme, met die hoogste koolhidrase aktiwiteit teenoor xilaan as substraat (Naga & El-Shazly, 1968).



Volgens Howard (1958) kan die holotriche protosoë Dasytricha en Isotricha vry van ander spesies verkry word deur glukose by rumen= vloeistof in 'n houer te voeg. Hierdie toestande lei tot die vorming van relatief groot hoeveelhede amilopektien in die betrokke protosoë wat veroorsaak dat lg. as 'n wit laag na die bodem afsak. Metabolisme van galaktose lei tot dieselfde eindproduk. Galaktose word gedeeltelik in glukose omgesit soos aangedui deur 'n toename in die amilopektieninhoud van die sel, maar word egter stadiger as glukose gemetaboliseer.

Holotriche protosoë benut, in teenstelling met oligotriche protosoë, by voorkeur vrye koolhidrate eerder as onoplosbare sellu= lose, rysstysel of hemisellulose. 'n Uitsondering is egter Dasytricha wat ook lg. koolhidrate kan benut.

Hieruit kan afgelei word dat met 'n sekere rantsoen slegs dié protosoë in die rumen aangetref sal word wat die voedsel kan metaboliseer. So het protosoë blykbaar 'n belangrike rol by die metabolisering van stysel, sellulose en hemisellulose in die rumen. Ensiemstudies behoort ook 'n aanduiding te gee van watter tipe substrate deur verskillende protosoënspesies benut en gemetaboliseer kan word.

#### 2.3.2.3 Aminosuurmetabolisme van protosoë

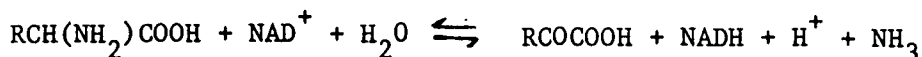
Volgens Coleman (1967a) het Entodinium caudatum 'n definitiewe

maar beperkte vermoë om vrye aminosure intrasellulêr te konsentreer. Hierdie aktiewe proses, wat slegs by lae eksterne konsentrasies belangrik is, word deur 'n hele paar verbindings geïnhibeer, soos bv. p-fluorofenielalanien wat fenielalanien inbouing of opname inhibeer. Hierdie aktiewe proses van opname is temperatuursensitief, word geaffekteer deur soutkonsentrasie in die medium en het 'n definitiewe maksimale snelheid wat afhanklik is van die aard van die aminosuur.

In die skaaprumen, die natuurlike habitat van entodiniomorfe protosoë, is die inhoud van die rumen arm aan maklik metaboliseerbare verbindings soos suikers en aminosure. Die rumeninhoud bevat egter tot  $10^{10}$  bakterieë per  $\text{cm}^3$  sodat protosoë aminosure meer ekonomies kan bekom deur die opname van intakte bakterieë (Coleman, 1967b).

Volgens Coleman et al. (1974a) is die volume van Epidinium  $360\ 000\ \mu\text{m}^3$  en die van Entodinium  $65\ 000\ \mu\text{m}^3$ . Ten spyte van die veel groter volume van Epidinium word baie minder bakterieë as deur Entodinium opgeneem, maar e.g. kan  $^{14}\text{C}$ -gemerkte glukose vinniger benut. Hierdie glukose word vir die sintese van intrasellulêre polisakkariede en minstens agt aminosure gebruik aangiesien 15% van die  $^{14}\text{C}$  in gevormde proteïen verskyn. Hieruit kan dus gesien word dat Epidinium in staat is om proteïen vanaf styselkorrels te sintetiseer. Entodinium kan nie op hierdie wyse proteïene sintetiseer nie. Entodinium caudatum het verder die vermoë vir die onderlinge omskakeling van aminosure verloor,

maar kan volgens Coleman (1967b) nog oksidatiewe deaminering teweegbring volgens die reaksie :



Sommige voorlopers vir aminosuurbiosintese word deur die vinnige katabolisme van styselkorrels na  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ , miere-, asyn-, propioon- en bottersuur voorsien. Hierdeur word 'n voorraad "aktiewe" asetaat en formaat gevorm wat vir asetilering en formilering van aminosure kan dien (Coleman, 1967b).

Sekere protosoë is dus in staat om aminosure vanuit ander voedselbronne te sintetiseer terwyl ander spesies aminosure hoofsaaklik vanuit eksterne bronne soos bakterieë en proteïen verkry.

'n Opmerklike reaksie van aminosure is die vinnige deaminering, metabolisering en uitskeiding van produkte. Aangesien protosoön-aminosure en proteïene uiteindelik makliker beskikbaar is vir die gasheer kan hulle 'n funksie verrig in die voorsiening van aminosure aan die dier. Ondersoeke t.o.v. aminosuursamestellings van fraksies behoort te wys of protosoë dalk 'n belangrike funksie het t.o.v. voorsiening van sg. essensiële aminosure aan die dier, veral onder toestande waar die voer arm is aan aminosure.

#### 2.3.2.4 Vetsuurmetabolisme van protosoë

Inkubering van linoleïensuur met die kaasdoekfiltreerde rumeninhoud van skape toon aan dat die omsetting van linoleïensuur na  $\text{C}_{18:1}$  trans-11-mono-enoësuur en later in steariensuur groot=

liks geassosieer is met die voedselpartikelfraksie. Voedseldeeltjies voorsien 'n belangrike sentrum vir adsorpsie van lipiede (Christopher, Raymond & Moore, 1973). In die afwesigheid van protosoë is die linoleïensuurvlak hoër as die olie- en steariensuurvlakke in serumlipiede. 'n Byvoeging van 5% onversadigde vet by die rantsoen het die totale bloedlipiede effens laat toeneem. Aansienlik hoër serum linoleïensuurvlakke is verkry nadat olie by die rantsoen gevoeg is (Clemens, Woods & Arthaud, 1974a).

In die afwesigheid van rumenprotosoë bereik meer onversadigde vetsure die bloedvatsisteam. Sodoende is meer vetsure vir deponering in vetweefsel van die liggaam beskikbaar. RCP-vrye diere behoort dus meer onversadigde vetsuurdeponering te ondervind. Dit is egter nie die geval nie. Clemens et al. (1974b) beweer dat daar 'n ander faktor in die weefsel is wat vetsure hidrogeneer. Blykbaar het protosoë dus nie so 'n belangrike rol by die hidrogenering van onversadigde vetsure nie.

Daar word aansienlike verskille in die deponering van margarien- ("margaric"), stearien- en linoleïensuur in die weefsel van diere met of sonder protosoë in die rumen gevind. 'n Agt- tot twaalfvoud verskil in serum linoleïensuur dui op 'n faktor wat, tesame met mikrobiëse hidrogenering, verantwoordelik is vir 'n hoë graad van onversadigheid wat in herkouervet aangetref word. 'n Groter hoeveelheid margariensuur word in RCP-vrye diere gevorm hoofsaaklik aangesien meer bakterieë teenwoordig is as in diere wat ook protosoë in die rumen bevat. Daar is verder ook 'n aansienlike verskil in

die graad van onversadigheid in onderhuidse vet in vergelyking met ingewandsvet soos in tabel 2.6 aangetoon (Clemens et al., 1974b).

Volgens Ash & Baird (1973) verteenwoordig aktivering die eerste stap in die metabolisme van asetaat, propioonaat en butiraat. By pH 6,3 word 35% <sup>14</sup>C-gemerkte melksuur omgeskakel na asynsuur, 9% na propionaat terwyl 33% herwin is uit die waterige residu met behulp van eterekstraksie. Die res (23%) word aangetref in ander vetsure en fermentasiegasse (Bruno & Moore, 1962).

E. caudatum neem cholien baie vinnig op en skakel dit uitsluitlik om na fosfatidielcholien. Die vinniger opname van cholien teenoor die stadiger opname van etanolamien vervul 'n fisiologiese rol vir die organisme ten opsigte van groei en oorlewing. Bakterieë wat etanolamien bevat kan aanhoudend deur die protosoë opgeneem word, maar die opname van cholien is beperk tot kort periodes nadat die herkouer voedselbevattende cholien ingeneem het. Fosfatidielcholien is na slegs 10 minute van blootstelling deur alle membrane versprei (Broad & Dawson, 1975).

Protosoë vervul dus tesame met 'n faktor wat in weefsel voorkom, 'n belangrike funksie by die hidrogenering van onversadigde vetsure in die rumen. Voedselpartikels voorsien 'n belangrike aanhegtingspunt tydens hidrogenering van die onversadigde vetsure. In die herkouer vervul die protosoë dus 'n fisiologiese rol omdat vetsure met verskillende grade van versadigheid in RCP-vrye en normale diere gedeponeer word.

Tabel 2.6

Vetsuursamestelling (molare %) van sojaboonolie asook bloedserum en liggaamsweefsel van osse met en sonder protosoë

Monster	Molare % van aangeduide vetsuur							
	C <sub>14:0</sub>	C <sub>14:1</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>17:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>
Sojaboonolie	0,10	-	9,90	0,40	-	2,40	28,90	50,70
<u>Bloedserum</u>								
Osse met protosoë	0,69	0,14	19,06	2,10	1,02	32,35	19,82	24,82
Osse sonder protosoë	0,63	0,20	17,84	2,17	1,55	29,79	18,29	29,69
<u>Liggaamsweefsel</u>								
Osse met protosoë	3,70	1,13	30,78	4,43	0,81	14,69	43,02	1,14
Osse sonder protosoë	3,74	0,95	31,28	4,86	1,15	13,14	42,92	1,89

### 2.3.2.5 Nukleotiedmetabolisme van protosoë

Volgens Coleman (1968) word ribose nie vanaf ander koolhidrate in protosoë gesintetiseer nie. Suspensies van E. caudatum inkorporeer purien- en pirimidienbassis, ribose en fosfaat afkomstig vanaf bakteriese nukleïensuur in protosoënnukleïensuur. Bewyse is verkry dat bakteriese nukleïensuur tot individuele nukleotiede afgebreek word voor inbouing in protosoënnukleïensuur plaasvind.

E. caudatum is ook in staat om vry puriene en pirimidine in nukleïensure in te bou. Uridien en uridien-5'-monofosfaat word meer effektief as urasiel gebruik vir urasiel inbouing in protosoënnukleïensuur. Protosoë vorm dus polinukleotiede makliker vanaf nukleosiede as van die aparte boustene van die verbindings. Dit kan heelwaarskynlik toegeskryf word aan 'n tekort van ribose in die protosoë.

Wanneer <sup>14</sup>C-gemerkte adenien, guanien en urasiel aan E. caudatum verskaf word, word die gemerkte verbindings versprei tussen die selreserwe en die nukleïensuur van die organisme. Blykbaar word guanien dus in adenien en urasiel in sitosien omgeskakel. Adenien en guanien word in die medium na 'n mengsel van hipoxantien en xantien afgebreek. Urasiel en timien word gereduseer na hul dihidroderivate. <sup>14</sup>C-timien word slegs in die selreserwe geïnkorporeer (Coleman, 1968). Hieruit blyk die belangrikheid van die opneem van bakterieë sodat verbindings, byvoorbeeld ribose vir nukleotiedmetabolisme, op die mees ekonomiese wyse bekom kan word.

## 2.4 GLIKOSIEDHIDROLASES

### 2.4.1 Algemeen

Amilase is die eerste ensiem wat in 1898 uit 'n alkoholpresipitaat van moutekstrak verkry is. Hierdie termostabiele bestanddeel is diastase genoem as gevolg van die vermoë om stysel na suikers om te skakel (Dixon & Webb, 1964). Amilases word in feitlik alle plante, diere en mikroörganismes aangetref. Groot hoeveelhede word in uitskeidingsorgane soos die pankreas asook in speeksel van hoër diere aangetref. Kleiner hoeveelhede word in serum, urine, lewer en spiere gevind, terwyl die speeksel van vleisetende diere geen amilase bevat nie (Street, 1963; Rick & Stegbauer, 1974).

Verskeie soorte hidrolases wat op verskillende tipe bindings inwerk, word gevind. Hidrolases kan op onder andere ester-, eter-, peptied-, C-N- (nie peptiedbindings), suuranhidried-, -C-C-, halied-, P-N- asook glikosielbindings inwerk. Glikosidases sluit ook ensieme in wat N-glikosiel- en S-glikosielverbindings kan hidroliseer. Ware glikosidases sluit nie net ensieme in wat inwerk op eenvoudige glikosiede nie, maar ook ensieme soos amilases wat glikosiedbindings in polisakkariede kan hidroliseer.  $\alpha$ -Amilase is 'n endo-amilase wat hoofsaaklik in diere aangetref word terwyl  $\beta$ -amilase 'n ekso-amilase in plante is.  $\alpha$ -Amilase hidroliseer glikosidiese bindings in die middel van die polisakkariedkettings terwyl  $\beta$ -amilase  $\beta$ -maltose vanaf die nie-reducerende eindes deur inversie vorm (Dixon & Webb, 1964).



Van die belangrikste industriële gebruik van amilase is die afbreek van styselagtige endosperm na suikers sodat gis op laasgenoemde produk kan inwerk tydens die brou van bier. Amilases word ook gebruik by die opklaring van die strukture van komplekse, hoë molekulêre massa koolhidrate (Whitaker, 1974).

#### 2.4.2 Eienskappe van die amilase molekule

$\alpha$ -Amilases geïsoleer uit diere, se aktiwiteit word grootliks deur die teenwoordigheid van monovalente ione beïnvloed (Dixon et al., 1964). 'n Divalente ioon soos kalsium het 'n stabiliserende invloed op die amilase molekule. Volgens Vallee, Stein, Summerwel & Fisher (1959) is hierdie kalsium stewig en spesifiek gebonde.

Molekulêre massas van amilases geïsoleer uit verskillende bronne kan verskil. So is die molekulêre massas van  $\alpha$ -amilases geïsoleer uit B. stearothermophilus, B. subtilis, pankreas en mout onderskeidelik 15 500; 48 700; 45 000 en 59 000.  $\beta$ -Amilase uit patats het egter 'n molekulêre massa van 152 000. Aminosuuranalises van die vier  $\alpha$ -amilases toon duidelike verskille terwyl die algemene patroon by die twee dierlike ensieme soortgelyk is (Junge, Stein, Neurath & Fisher, 1959; Manning & Campbell, 1961; Stein, Junge & Fisher, 1960).

Beide  $\alpha$ - en  $\beta$ -amilases kan in kristallyne vorm verkry word. Volgens Manning & Campbell (1961) kan kristallyne  $\alpha$ -amilase geïsoleer uit Bacillus stearothermophilus 90% aktiwiteit behou na 1 uur by 90° C. Muus & Vnenchak (1964) stel vas dat speekselamilase wat drie keer geherkristalliseer is en slegs een piek tydens ultrasentrifugasie gee,

in vier bande met diskontinue elektroforese skei. Wolf & Taylor (1967) het 8 isosieme uit menslike speekselamilase gekry terwyl Aw (1966) isoamilases uit urine geskei het op sellulose asetaat by 200 volt vir een uur.

#### 2.4.3 Koolhidrases in rumenprotosoë

Hoë molekulêre massa koolhidrate soos stysel en sellulose, maar ook lae molekulêre massa polisakkariede soos hemiselluloses word in die rumen afgebreek (Halliwell, 1957; Halliwell, 1974; Howard, 1957a). 'n Metode vir die suiwing van hemisellulase word deur Bailey, Clarke & Wright (1962) en Bailey & Gaillard (1965) beskryf.

Volgens Christie & Porteous (1957) en Howard (1957b) het holotriche protosoë 'n kragtige koolhidraat-fermenterende sisteem. Selvrye ekstrakte, berei deur protosoönselle te breek, bevat verskeie ensieme. Volgens Howard (1959) is die mate van hidrolise deur selvrye ekstrakte van Dasytricha en Isotricha ten opsigte van di-, tri-, en polisakkariede, in ooreenstemming met die van die lewende organismes. Dasytricha ruminantium het aansienlike sellobiase en  $\beta$ -glukosidase aktiwiteit maar slegs matige maltase aktiwiteit. Ekstrakte van Isotricha intestinalis en I. prostoma bevat feitlik geen maltase nie terwyl slegs spoorhoeveelhede sellobiase en  $\beta$ -glukosidase teenwoordig is. Isotricha bevat egter aansienlike invertase aktiwiteit (Mould & Thomas, 1957).

Volgens Mould et al. (1957) het  $\alpha$ -amilase geïsoleer uit Isotricha

'n optimum pH by 4,8 terwyl dié uit Dasytricha optima by 5,0 en 6,0 het. Mould & Thomas (1958) het hierdie amilases met behulp van elektroforese op 'n styselkolom geskei.

Hidrolitiese ensieme vervul 'n baie belangrike rol in die rumen ten opsigte van metabolisering van sellulose, stysel en hemisellulose. In die somer bevat gras baie stysel en in die winter weer baie sellulose. Omdat nie alle protosoë en bakterieë beide hierdie substrate kan benut nie, sal slegs die mikroorganismes wat die spesifieke substraat kan benut, oorleef. So kan metaboliese studies met organismes van diere wat op spesifieke rantsoene is veral op ensiemvlak interessante resultate lewer. In die verband behoort dus meer protease aktiwiteit in diere te wees wat op 'n hoë proteïnrantsoen is.

## HOOFSTUK 3

EKSPERIMENTELE PROSEDURE3.1 PROEFDIERE EN MONSTERING3.1.1 Proefdiere

Ses merinoskape, drie volbek en drie sestand is in hierdie proef gebruik. Die skape was voorheen deur die Departement Kleinveekunde in voedingsproewe gebruik. 'n Veearts van die universiteit, dr. H.G.J. Coetzee (Departement Diere-anatomie en -fisiologie en Veessiektes), het die skape vir gesondheid gekeur. Voordat met die proef begin is, is al ses skape geskeer. Hoewel die skape gesond was, was hulle in 'n swakkerige kondisie. Na slegs 'n paar weke in die veld onder proeftoestande was hulle egter in 'n beter kondisie wat met verloop van tyd redelik konstant gebly het. Selfs deur die wintermaande het die skape genoeg weiding en water beskikbaar gehad. Geeneen van die skape het ook enige siekte of parasiete onder lede gehad nie. Dr. Coetzee het die algemene gesondheidstoestand van die skape gekontroleer. Mnr. A. Pieterse (Departement Kleinveekunde) het die skape drie keer gedoseer met binnespiers Trodax inspuitings.

3.1.2 Toestande waaronder die skape aangehou is

Die ses skape is op 'n proefplaas van die U.O.V.S., Sydenham net buite Bloemfontein aangehou. Die kamp waarin hulle aangehou is, is 11,5 ha groot, met weiding wat uit rooigras (Themeda triandra) asook

vingergras (Digitaria eriantha), tesame ongeveer 70% van die totale weiding, bestaan. Die volgende plantsoorte kom in klein hoeveelhede voor om tesame ongeveer 25% van die gewasse uit te maak:

- a) Eragrostis chloromelas (krulblaar)
- b) Eragrostis obtusa (douvatgras)
- c) Panicum stapfianium (rooibuffelsgras)
- d) Tragus koelerioides (wortelsaadgras)
- e) Cymbopogon plurinodis (terpentyngras)
- f) Cynodon hirsutus (fynkweek)
- g) Setaria flabellata (kruipmannagras)
- h) Sporobolus funbriatus

Verder kom ongeveer 5% bossies voor, naamlik Helichrysum dregearnum (bergankerkaroo), Lycium spp. (kniedoring), Pentzia globosa (bitterkaroo), Aster muricatus (bloublommetjie), Chrysocoma termifolia (bitterbos), Nestlera conferta (perdekaroo).

Bedags kon die skape dwarsdeur die kamp wei. Geen byvoeding soos kragvoer is gegee nie. 'n Gekombineerde dikalsiumfosfaat - soutlek (1 : 1) is verskaf en water was vrylik beskikbaar. Snags is die diere in 'n beskermde skuiling geplaas sonder enige voeding of water. Laasgenoemde was nodig as 'n voorsorgmaatreël teen moontlike veediefstalle.

Voor monsterring is die skape vir 15 uur in 'n skuur sonder voeding of water gehou. Direk na monsterring is die skape weer onder proeftoestande in die veld geplaas.

'n Groep skape wat op spesifieke rantsoene onder gekontroleerde toestande binneshuis aangehou is (mnr. J.E.J. du Toit, Departement Kleinveekunde) is ook eenmalig vir monsterring gebruik. Die skape was in vier groepe verdeel en het rantsoene bestaande uit wisselende hoeveelhede mieliestronke, mieliemeel, lusern en hoë proteïenkonsentraat ontvang. Tesame met die resultate word meer inligting oor die rantsoene en toestande gegee.

### 3.1.3 Monstertrekking

Elke drie weke is ongeveer  $250 \text{ cm}^3$  rumenmonster met behulp van 'n maagbuis van elke skaap getrek. Die maagbuis was via 'n  $1\,000 \text{ cm}^3$  Buchnerfles aan 'n suigpomp (Arthur H. Thomas Co., Scientific apparatus, Phila., P.A., U.S.A.) gekoppel. 'n Plastiekpyp met 'n deursnit van 2,0 cm wat as maagbuis gebruik is, is versigtig in die slukderm van die skaap afgestoot. 'n Bekoopmaker, verskaf deur mnr. J.E.J. du Toit van die Departement Kleinveekunde, is gebruik om die bek van die skaap oop te hou. Om te verhoed dat te veel druk teen die peristaltiese bewegings in die slukderm uitgeoefen word, is die pyp slegs effens gedruk. In werklikheid het die skaap dus self die pyp ingesluk. Die lengte van die maagbuis om tot in die rumen te kom verskil van skaap tot skaap, maar daar is vasgestel dat 'n lengte van ongeveer 65 cm gewoonlik geskik is. Sodra die maagbuis in die rumen is, is die suigpomp waarvan die sterkte van die suigkrag gereguleer kon word, aangeskakel. Aanvanklik is die druk baie laag gehou (66,57 tot 83,28 kPa). Die maagbuis is gedurig met kort bewegings heen en weer beweeg om moontlike verstoppings tydens die trek van die monster te verhoed. Soos meer rumenmonster in die maagbuis ingetrek word, word die suigkrag verhoog na ongeveer 44,57 kPa.

Sodra die monster in die plastiekpyp gesien kon word, is die pyp uitgehaal met die pomp nog steeds aan. Nadat die monster in 'n 1 000 cm<sup>3</sup> Buchnerfles ingetrek is, word die pomp afgeskakel. Hierna word die prosedure herhaal tot ongeveer 250 cm<sup>3</sup> rumenmonster van elke skaap getrek is. Hierdie monster word dan in 'n termosfles bewaar totdat dit verder verwerk kon word. Die het geskied direk na aankoms by die laboratorium om ongeveer 09h30. Tydens monsterneming is plastiekhandskoene vir beskerming teen moontlike infeksie gedra.

### 3.2 FRAKSIONERING EN ISOLERING VAN RUMENPROTOSOË

#### 3.2.1 Voorlopige ondersoeke

##### 3.2.1.1 Gebruik van digtheidsgradiënte

Proewe is uitgevoer om vas te stel of die digthede van bakterieë, protosoë en voedselpartikels tot so 'n mate verskil dat 'n skeiding met behulp van digtheidsgradiënte teweeggebring sou kon word (Martin & Ames, 1961; Trautman, 1964). Gradiënte is voorberei deur in 17 proefbuis opeenvolgend afnemende konsentrasies sukrose te plaas. Die lineêre gradiënt, vanaf byvoorbeeld 5% tot 20% m/v sukrose, is verkry deur 2,0 cm<sup>3</sup> uit elke proefbuis, vanaf nr. 1 tot 17, in die sentrifugebuis met behulp van 'n peristaltiese pomp in te pomp. Menging is tot 'n minimum beperk.

'n Uitswaai-tipe rotor is by 5<sup>o</sup> C gebruik. Met die gradiënt wat vanaf 5% tot 20% strek is by 1 000 x g gesentrifugeer vir 10 minute. Gradiënte vanaf 20% tot 40% (m/v), 40% tot 60% (m/v) en 40% tot 65%

(m/m) sukrose is ook gebruik. Daar is in hierdie gevalle by 100 x g, 5° C, vir 5 minute gesentrifugeer. Na sentrifugering is 2 cm<sup>3</sup> fraksies uit die sentrifugebuis verkry deur versigtig hierdie volume van bo af met 'n pasteurpipet wat aan 'n peristaltiese pomp gekoppel is, af te suig. Hierdie fraksies is mikroskopies ondersoek om die verspreiding van materiaal in die gradiënte vas te stel.

### 3.2.1.2 Gebruik van mikrosiwwe

Omdat protosoë en bakterieë wisselende groottes het, is gepoog om die rumenmonster nadat dit uitgepers is, met behulp van siwwe in fraksies, naamlik protosoë, bakterieë en veselmateriaal te skei. Sentrifugale tegnieke kon moontlik hierna gebruik word om bakterieë wat nog teenwoordig mag wees, te verwyder. Die monster is in 0,01 M fosfaatbuffer (pH 7,2) wat 0,144 M NaCl bevat, gesuspendeer. 'n Reeks siwwe met groottes 422, 211, 152 en 38 µm is gebruik. Fraksies wat op die verskillende siwwe agtergebly het, is herwin en mikroskopies ondersoek om suiwerheid te bepaal.

### 3.2.1.3 Vasstelling van optimale detergentkonsentrasie en sentrifugale snelheid.

Uitgeperste rumenmonster (500 cm<sup>3</sup>) is in 8 sentrifugebuis gegooi. Vier is by 100 x g en die res by 200 x g vir 1 min by 5° C gesentrifugeer, maar verder is albei reekse eenders behandel. Sedimente is in 0,9% NaCl oplossings wat 0,25; 0,5; 1,0 en 1,5 dm<sup>3</sup> Brij-35 bevat, gesuspendeer. Die wasprosedure is onder bogenoemde twee sentrifugeringstoestande uitgevoer. Na drie wasprosesse is die bovloei-



stof afgesuig en die protosoönsediment in gedistilleerde water gesuspendeer. Hierop is stikstof- en koolhidraatbepalings uitgevoer. Die fraksies is ook mikroskopies ondersoek om suiwerheid vas te stel.

Monsters is ook ondersoek deur die orde van verskillende sentrifugeringsstappe (soos in die finale fraksioneringsprosedure aangedui) te wissel. Waar gewoonlik eers teen lae omwentelinge en daarna teen hoë omwentelinge gesentrifugeer is, is hierdie prosedure in omgekeerde orde uitgevoer. Spesifieke toestande word tesame met die resultate genoem.

#### 3.2.1.4 Gebruik van verskillende suspenderingsoplossings

Omdat boraatsoute komplekse met koolhidrate vorm, is 0,1 M boraatbuffer pH 7,5 as suspenderingsmiddel gebruik. Uitgeperste rumenvloeistof is aan die volgende vier behandelings onderwerp, sentrifugering by 100 x g, 5° C vir 1 min : slegs boraatbuffer; boraat + 0,05% Brij-35; 0,9% NaCl + 0,05% Brij-35; 0,9% NaCl. Die boraatoplossing (0,2 M) se pH is met behulp van 2 M fosforsuur aangepas tot pH 7,5. Hierna is die molariteit deur verdunning aangepas tot 0,1 M. Na drie wassiklusse onder genoemde toestande is die protosoönfraksie by 5° C teen 1 000 x g vir 10 minute gesentrifugeer sodat die benvloeistof wat detergent en soute bevat, afgedekanteer kon word. Die protosoönsediment is in gedistilleerde water gesuspendeer en stikstof- en koolhidraatbepalings is hierop uitgevoer. Monsters is ook mikroskopies ondersoek.

### 3.2.2 Fraksioneringsprosedure

Na aanleiding van die resultate van voorlopige studies en ondersoek is 'n gestandaardiseerde fraksioneringsprosedure verder deurgaans gevolg. Die verkrygte rumenmonster is goed gemeng en  $100 \text{ cm}^3$  verteenwoordigende monster is gehou vir verdere analises. In 'n  $2 \text{ dm}^3$  maatsilinder is die massa en volume van die res van die monster bepaal. Dit was gewoonlik ongeveer  $1,5 \text{ dm}^3$  met 'n massa van ongeveer  $1,5 \text{ kg}$ . Die  $100 \text{ cm}^3$  monster wat gehou is, is met 'n Ultra-Turrax (Janke & Kunkel KG) fyngeslaan en in 'n  $1 \text{ dm}^3$  rondebolfles gevriesdroog. Die res van die monster is verder gebruik vir fraksionering.

Voedseldeeltjies en gras is van die rumenvloeistof geskei deur die rumenmonster deur middel van 'n handpers deur 8 lae kaasdoek te pers. Hieruit word 'n vloeistof bekend as rumenvloeistof 1 (RV1) verkry, asook 'n saamgeperste koek, bekend as perskoek (PK) wat in die kaasdoek agterbly. Die perskoek is daarna in  $500 \text{ cm}^3$   $0,9\% \text{ NaCl}$  wat  $0,05\% \text{ Brij-35}$  bevat, gesuspendeer. Na deeglike menging word die gesuspendeerde perskoek weer deur 8 lae kaasdoek gepers. Hierdie vloeistof staan bekend as perskoekvloeistof 1 (K1). Hieropvolgend word die proses herhaal om ook perskoekvloeistof 2 (K2) en perskoekvloeistof 3 (K3) te verkry. Hierdie hersuspenderings is uitgevoer om soveel protosoë as moontlik uit die perskoek te verwyder. Die finale uitgeperste perskoek is toe in kleiner stukke gebreek en gevriesdroog. Na droging is die heelmonster en perskoek in 'n hamermeul met  $0,75 \text{ mm}$  sif fyngemaal om 'n verteenwoordigende monster te verkry waarop analises gedoen kan word. Hersuspenderingsvloeistowwe K1, K2 en K3 is gekombineer en het 'n finale volume van ongeveer  $1,5 \text{ dm}^3$  gegee.

RV1 is vir 10 min teen 1 000 x g by 5° gesentrifugeer en rumenvloeistof 2 (RV2) plus protosoönsediment 1 (PS1) is verkry. RV2 kan gedialiseer en gesentrifugeer word om oplosbare fraksie 1, bakterieë en 'n nie-dialiseerbare oplosbare fraksie, te verkry. Die gekombineerde perskoekvloei-stoffraksies (K1, K2 en K3) word dan op dieselfde wyse behandel. Hierdie bovloeistof word met RV2 gekombineer en die protosoönsediment 2 (PS2) word met PS1 gekombineer.

Die gekombineerde protosoönsediment bevat beide bakterieë en protosoë. Om die bakterieë te verwyder word die sediment hersuspendeer in 0,9% NaCl wat 0,05% Brij-35 bevat, gevolg deur sentrifugering teen 100 x g vir 1 min by 5° C. Hieruit word 'n bovloeistof (wasoplossing 1 of W1) verkry wat hoofsaaklik uit gesuspendeerde bakterieë bestaan, asook 'n protosoönsediment 3. Die prosedure word dan herhaal om W2, W3 en W4, asook PS4, PS5 en uiteindelik 'n finaalgesuiwerde protosoönfraksie (P) te verkry. Laasgenoemde protosoönfraksie bestaan uit 'n redelike suiwer protosoönpreparaat waarop verdere studies toe uitgevoer is. Tydens die heel laaste stap van die wasproses is sentrifugering by 1 000 x g uitgevoer sodat die protosoë redelik vas kon sedimenteer en die bovloeistof, wat NaCl en Brij-35 bevat, kwantitief afgesuig kon word. Dit was nodig om te verhoed dat te veel soute saam met die protosoönfraksie agterbly. Hierdie fraksie is gevriesdroog.

Hierdie prosedure is egter vereenvoudig deur RV1 dadelik met K1, K2 en K3 te kombineer. Na sentrifugering onder die gewone toestande teen 1 000 x g is hierdie bovloeistof met W1, W2, W3 en W4 gekombi-

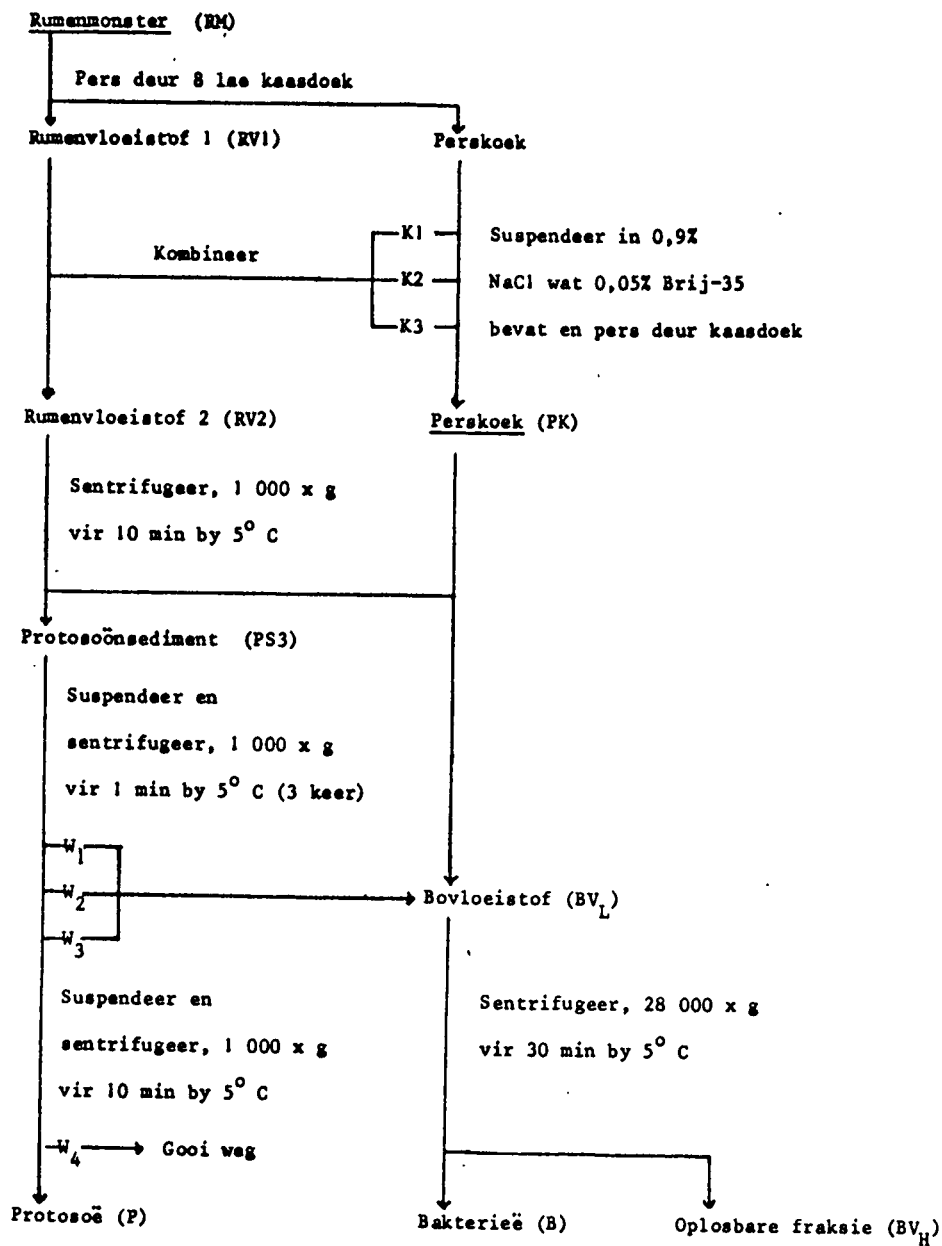
neer om  $BV_L$  te gee. Hierdie gekombineerde volume is akkuraat bepaal en 'n spesifieke volume daarvan is teen  $28\ 000 \times g$  by  $5^\circ C$ , vir 30 minute gesentrifugeer om 'n bakteriese fraksie (B) en 'n helder bo-vloeistof ( $BV_H$ ) te verkry. Die bakteriese sediment is hierna in gedistilleerde water gesuspendeer met behulp van die Ultra-Turrax nadat een druppel silikon teenskuimmiddel bygevoeg is. Hierdie fraksie is ook verder ontleed en omgerek asof die hele bakteriese fraksie herwin is. Die verloop van hierdie prosedure word in die vloei-diagram (figuur 3.1) opgesom.

### 3.3 ANALITIESE METODES

#### 3.3.1 Stikstofbepaling

Stikstofbepalings is uitgevoer deur die mikro-Kjeldahlmetode soos beskryf deur Diamond & Denman (1973) te gebruik. Die verteringsmengsel is opgemaak deur  $CuSO_4$  (3,0 g);  $H_2SeO_3$  (2,0 g); en  $Na_2SO_4$  (100,0 g) op te maak tot  $500,0\ cm^3$  en hierby  $500\ cm^3$  gekonsentreerde  $H_2SO_4$  te voeg. Vir oordistillering in versadigde boorsuur is die monster alkalies gemaak met  $5\ cm^3$  50% NaOH wat 1 mg Na-alisariensulfonaat per  $100\ cm^3$  NaOH bevat. Indikator vir die boorsuur is volgens Plummer (1971) opgemaak. Terugtitrering van die oorgedistilleerde ammoniak is met gestandaardiseerde  $\pm 0,01\ N\ HCl$  gedoen.

Herwinsproewe is uitgevoer om optimale tyd van vertering te bepaal. Die herhaalbaarheid van die metode is ook ondersoek.



Figuur 3.1

Vloei-diagram vir die verkryging van verskillende fraksies waarop verdere analyses op vergelykende basis gedoen kan word.



### 3.3.2 Koolhidraatbepalings

Die Antroonmetode van koolhidraatbepaling soos beskryf deur Plummer (1971) is gebruik. 'n Standaardkromme is met glukose as standaard (2 tot 10 mg glukose/100 cm<sup>3</sup>) opgestel.

### 3.3.3 Hidrolise van monsters

#### 3.3.3.1 Suurhidrolise

Van 'n gevriesdroogde monster is ongeveer 0,10 g akkuraat tot 4 desimale in 'n gemerkte dikwandproefbuis afgemeet. Geen monster moet aan die wande van die proefbuis vassit nie. Hierby word 2,0 cm<sup>3</sup> konstantkokende HCl (6 N) gevoeg (Vogel, 1968). Die buis word dan in 'n glasblaasvlam verhit en getrek om 'n dun gedeelte met 'n dik wand in die proefbuis te verkry. Na afkoeling word die buis aan 'n vakuumpomp verbind. Dit is belangrik dat die druk tydens verseëling bekend is. Die proefbuis is toegesmet by die uitgetrekte gedeelte sodra 'n lesing van minder as 6,67 Pa verkry is. Die druk in die buis moet so laag wees om te verhoed dat die teenwoordigheid van suurstof tot oksidasie en verliese van aminosure lei. Hierna word die buise vir presies 22 uur in 'n oond by 110° C geplaas.

Na hidrolise word die buise oopgemaak en kwantitatief met behulp van dubbelgedistilleerde water op 'n sinterglasfilter (porositeit 3) oorgebring. Terwyl ligte suiging toegepas word, is die monster in 'n 100 cm<sup>3</sup> platboomfles ingewas. Die volume in die opvangfles het ongeveer 30 cm<sup>3</sup> beloop en die oormaat water is met behulp van 'n roterende

verdamer onder 'n druk van ongeveer 700 Pa by 35° C ingedamp tot 'n volume van ongeveer 1 cm<sup>3</sup>. Die spiraal in die verdamer is verkoel tot -5° C en 'n vaste NaOH-val is gebruik.

Na indamping is die monster finaal gedroog in 'n vriesdroogapparaat van glas by 'n druk van 0 tot 6.67 Pa met vloeibare stikstof as verkoeling. Indien suurdampe na hierdie prosedure nog geruik kon word, is die monster in 5 cm<sup>3</sup> dubbelgedistilleerde water opgelos, vasge-ys en op dieselfde wyse behandel.

Die gedroogde monster is met buffer pH 2,2\* verdun vir aminosuuranalise.

#### 3.3.3.2 Alkaliese hidrolise

Alkaliese hidrolise is aanvanklik met 8N NaOH en 6N KOH onder reflux uitgevoer volgens Alexander & Block (1960). As gevolg van verliese en polimerisering wanneer NaOH gebruik word, is Noltmann, Mahowald & Kuby (1962) se tegniek, naamlik hidrolise met 4N Ba(OH)<sub>2</sub> onder vakuum gebruik. Tyd van optimale hidrolise in Pyrex proefbuis was 36 uur by 110° C. Die hidrolisaat is verder op dieselfde wyse behandel as onder suurhidrolise bespreek. Na verdunning is die monster op die kort kolom van die aminosuurontleder met buffer pH 5,28\* geskei. Triptofaan verskyn voor lisien op die verkrygte chromatogram.

---

\* Sien aminosuurontledings

### 3.3.3.3 Ensimatiese hidrolise

Triptofaan is ook volgens die metode van Sasaki, Abrams & Horecker (1975) bepaal na hidrolise van die proteïen met 'n mengsel van chimotripsien en pronase. Die triptofaan word daaropvolgend fluoro-metries bepaal.

### 3.3.4 Aminosuurontledings

Aminosuurontledings is op 'n Beckman model 120 C aminosuurontleder uitgevoer. Die prosedure soos in die "Beckman amino acid analyzer instruction manual" (1966) beskryf, is gebruik.

#### 3.3.4.1 Foute in pH by buffer 3,28

Indien die posisie van aminosuurpieke op die verkrygte chromatogramme afwyk van die normale patroon, is die pH van die buffer verkeerd. In hierdie verband word veral op sistien en die bufferpiek gelet. Ondervinding het geleer dat  $0,2 \text{ cm}^3$  gekonsentreerde HCl per  $4 \text{ dm}^3$  buffer die sistienpiek met 4 min vertraag indien die pH te hoog was. Die sistienpiek moet normaalweg by 106 tot 108 min verskyn en hierdie faktor, die tyd waarby sistien verskyn, word gebruik om die pH van die buffer reg te stel.

#### 3.3.4.2 Foute in pH by buffer 5,28

Indien skeiding tussen lisien en histidien swak is, verskyn histidien te gou en is die pH van die buffer te hoog. Die histidienpiek moet



by 35 tot 38 min verskyn. Deur die byvoeging van  $0,4 \text{ cm}^3$  gekonsentreerde HCl per  $4 \text{ dm}^3$  buffer kan die histidienpiek met 1 min vertraag word. Hierdie faktor word dan gebruik om foute met die pH van die buffer uit te skakel.

#### 3.3.4.3 Korreksies vir die verlies van aminosure tydens suurhidrolise

'n Mengsel van Thr, Ser, Cys en Tyr is opgemaak en die konsentrasies van die aminosure is akkuraat met die aminosuurontleder bepaal. Vir kalibrasiedoeleindes is 'n kalibrasiemengsel soos verskaf deur Beckman, gebruik.

Om verliese tydens hidrolise te bepaal, is eersgenoemde mengsel vir 22 en 46 uur volgens die normale suurhidrolise prosedure gehidroliseer. Vanuit hierdie resultate is 'n korreksiefaktor verkry wat met die waargenome konsentrasie vermenigvuldig word om te korrigeer vir verliese. Deurgaans is van hierdie tegniek gebruik gemaak om te korrigeer vir vernietiging van hierdie aminosure.

#### 3.3.4.4 Berekening van verdunning na vriesdroging van gehidroliseerde monsters

Om te sorg dat die  $200 \mu\text{l}$  monsters\* wat per analise gebruik word binne 'n beperkte konsentrasiegebied val, is bereken hoeveel verdunningsbuffer bygevoeg moet word. Hiervoor is die volgende formule gebruik:

---

\* Sien aminosuurontledings

$$\text{volume verdunningsbuffer (pH 2,2*)} = \frac{A \times B \times 0,2}{0,025} \times 0,5 \text{ cm}^3$$

waar A = massa monster (g)

B = hoeveelheid totale N (mg N/g monster)

Hierdie berekende volume is tot die volgende heelgetal benader en akkuraat by die droë monsters gepipetteer. Voorbereide monsters kan in die vrieskas bewaar word totdat die aminosuurbepaling daarop uitgevoer word. Die verdunningsberekening is verder vergemaklik nadat proefondervindelik vasgestel is dat verskillende konstantes vir die verskillende monsters gebruik kan word. Die produk van die massa monster afgemeet (g) en die konstante is numeries gelyk aan die volume verdunningsbuffer wat gebruik moet word. Die konstantes so vasgestel was vir RM 80; PK 48; P 264 en B 200.

### 3.4 STUDIES OP HIDROLITIESE ENSIEME IN RUMENPROTOSOE

#### 3.4.1 Aktiwiteitsbepaling

Ensieme wat met polisakkariëde reageer stel reduserende groepe tydens hidrolise vry. Reduserende groepe so vrygestel kan met 3,5-dinitrosalisiëlsuur soos deur Rick & Stegbauer (1974) beskryf, bepaal word.

##### 3.4.1.1 Reagense

Stysel, hemisellulose, sellulose en karboksimeïel sellulose, 0,5% (m/v), is as substrate in 0,05 M Na-sitraatbuffer, pH 5,2 gebruik. Dinitrosalisiëlsuurreagens is 1% (m/v) 3,5-dinitrosalisiëlsuur in 30% (m/v) kaliumnatriumtartraat. In 300 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O en 400 cm<sup>3</sup> 1 N NaOH is 10 g

---

\* Sien aminosuurentledings

3,5-dinitrosalisielsuur deur verhitting opgelos. Na die byvoeging van 300 g kaliumnatriumtartraat is die oplossing tot  $1 \text{ dm}^3$  met dubbelgedistilleerde water opgemaak. Maltose, 0,2 tot 1,4 mg per bepaling, is as standaard gebruik.

#### 3.4.1.2 Inkubasieprosedure

'n Tipiese aktiwiteitsbepaling sien soos volg daar uit:

1,0  $\text{cm}^3$  buffer

0,5  $\text{cm}^3$  ensiemoplossing

1,0  $\text{cm}^3$  substraatoplossing

Na menging en inkubasie by  $35^\circ \text{C}$  vir presies 30 min word  $2,0 \text{ cm}^3$  3,5-dinitrosalisielsuurreagens bygevoeg. Die mengsel word deeglik geskud en die buise vir 5 min by  $100^\circ \text{C}$  geplaas. Afkoeling is met koue water gedoen en na 20 tot 60 min is absorbansie by 546 nm gelees.

Daar is gekorrigeer vir agtergrondreaksie deur in 'n soortgelyk-voorbereide oplossing die ensiem na die dinitrosalisielsuurreagens by te voeg. Verkrygte absorbansiewaardes is vergelyk met 'n standaardkromme wat onder dieselfde kleurontwikkelingstoestande met maltose (0,2 tot 1,4 mg per bepaling) opgestel is.

#### 3.4.2 Proteïenbepalings

Proteïenbepalings is deur middel van die biuretmetode soos beskryf deur Plummer (1971) uitgevoer. Vir elke bepaling is  $4,00 \text{ cm}^3$  biuret-oplossing by  $1,00 \text{ cm}^3$  proteïenoplossing gevoeg. Vir standaardisering

is beesserumalbumien gebruik.

### 3.4.3 Analitiese jeelektroforese

Poliakrielamiedjeelektroforese is 'n baie goeie metode om die suiwerheid van proteïenpreparate vas te stel (Gabriel, 1971). Die metode is dan ook op 'n roetinebasis gebruik tydens die suiweringsprosedures om die mate van suiwerheid van die ensieme vas te stel.

Elektroforese is in 'n Pleuger apparaat (Departement Entomologie) wat 8 buise met binnedeursnit 6 mm en 65 mm lank kan akkommodeer, uitgevoer. 'n Apparaat wat presies dieselfde buise geneem het, vervaardig deur dr. P.J. du Toit, is ook gebruik. Hierdie apparaat kan 16 buise neem en 'n Buchler kragbron is tydens die studies gebruik. Glasbuise is voor gebruik met chroomsuur skoongemaak en goed met gedistilleerde water gespoel voor dit in 'n oond by 110<sup>o</sup> C gedroog is. Elektroforese is by kamertemperatuur uitgevoer en die teenwoordigheid van proteïene in die jels is deur kleuring met amidoswart vasgestel.

Met hierdie ondersoek is 7,5% poliakrielamiedjels gebruik. Die verhouding van akrielamied tot bisakrielamied was 37,5 tot 1. Jels is volgens 'n standaardprosedure (Brewer, Pesce & Ashworth, 1974) voorberei. Al die bekende voorsorgmaatreëls, byvoorbeeld ter verkryging van jelkolommetjies sonder lugblasies is gevolg. Daar is ook sorg gedra dat die boonste oppervlakte van die jelkolommetjies absoluut horisontaal was.

Proteïenmonsters wat ondersoek is, is in die elektrolietbuffer opgelos en hierby is sukrose (10% m/v) gevoeg. 'n Mikrosput is gebruik om die proteïenoplossing onder die buffer, bo-op die jelkolommetjies te plaas. Gewoonlik is van 25 tot 100  $\mu\text{g}$  proteïen in 'n volume van 25 tot 100  $\mu\text{l}$  op die jelkolommetjies geplaas. Elektroforese is by kamertemperatuur teen 'n spanning van 80 V vir 1 uur uitgevoer.

Stroomvloei was ongeveer 5 mA per buis. Hierna is die jels versigtig met behulp van 'n spuit met 'n lang dun naald uit die glasbuisies gehaal en in 1% amidoswart in 5% asynsuur (v/v) laat kleur vir 1 uur. Nadat oormaat kleurstof met 5% asynsuur afgewas is, is die jels in ontkeuringsbuisies geplaas en in die elektroforese-apparaat met 5% asynsuur as elektroliet, ontkeur. Die ontkeurde jels waarin die proteïene as duidelike blou-pers sones sigbaar was, is in proefbuisie in 5% asynsuur vir verdere karakterisering gehou.

#### 3.4.4 Suiweringsprosedure

##### 3.4.4.1 Homogenisering (Stap 1)

Protoönselle is gehomogeniseer met ultrasoniese behandeling (MSE apparaat, Departement Mikrobiologie). Ongeveer 3,0 g gevriesdroogde protosoönmonster is in 100  $\text{cm}^3$  0,1 M fosfaatbuffer (pH 6,8) wat 0,054 M NaCl bevat, gesuspendeer. Tydens homogenisering is die suspensie in 'n ysbad afgekoel. Behandeling is 5 keer vir 1 min met 1 min afkoelingsstussenposes herhaal. Die behandelde protoönsuspensie is by 28 000 x g vir 20 min by 5<sup>o</sup> C gesentrifugeer. Die volume bovloei is akkuraat bepaal en die sediment weggegooi. Aktiwiteits- en

proteïenbepalings is op die ensiemoplossing uitgevoer. Hierdie bepaling is deurgaans na elke stap uitgevoer. Alle hieropvolgende stappe is tensy anders vermeld by 0 tot 5° C uitgevoer.

#### 3.4.4.2 Etanolfraksionering (Stap 2)

Die proteïenoplossing vanaf stap 1 is in 'n alkoholbad by -55° C gefraksioneer. Etanol wat vir hierdie fraksionering gebruik is, is eers in die alkoholbad afgekoel voor byvoeging by die afgekoelde (0° C) proteïenoplossing. Die proteïenoplossing is in 'n beker afgekoel en tydens etanolbyvoeging met 'n glasstaaf goed gemeng. By 86,0 cm<sup>3</sup> proteïenoplossing is 34,4 cm<sup>3</sup> (0,4 volumes) van die koue etanol gevoeg. Hierdie mengsel is teen 7 500 x g vir 15 min by -10° C gesentrifugeer. Beide die sentrifuge en rotor is vooraf tot die verlangde temperatuur afgekoel. Na sentrifugering is die bovloeistof gekombineer en die presipitate weggegooi. Die gekombineerde bovloeistof is weer direk in die koue alkoholbad geplaas en onder dieselfde toestande soos reeds genoem, is 180,6 cm<sup>3</sup> etanol (2,1 volumes) bygevoeg. Na sentrifugering soos voorheen is die proteïenpresipitate gekombineer en dadelik in 0,02 M fosfaatbuffer pH 6,8 opgelos. Dialise is vir 12 tot 16 uur teen 5 dm<sup>3</sup> 0,05 M fosfaatbuffer pH 6,0 by 5° C met een verandering na 5 uur uitgevoer. Voor die volgende stap is die proteïenoplossing teen 7 500 x g by 0° C gesentrifugeer.

#### 3.4.4.3 Chromatografie op DEAE-sellulose (Stap 3)

DEAE-sellulose (Whatman) is in 0,5 N HCl gesuspendeer en vir 30 min laat staan. Die hars is op 'n sinterglastregter tydens ligte suiging

met gedistilleerde water tot 'n neutrale pH gewas en in 0,5 N NaOH gesuspendeer. Na 30 min is dieselfde wasprosedure gevolg om dit tot neutrale pH te kry. Die DEAE-sellulose is daarna 'n paar keer met 0,02 M Na-fosfaatbuffer pH 6,8 gewas en ontgas by 16,4 kPa met voortdurende roering. Hierna is die kolom (1,5 cm x 33 cm) gepak en oornag is dieselfde buffer (18,0 cm<sup>3</sup>/uur) deurgepomp om ewewig te bewerkstellig.

Die gedialiseerde ensiempreparaat van stap 2 is net so sonder enige konsentrering op die kolom gepomp. Die kolom is met 'n lineêre konsentrasiegradiënt wat vanaf 0,2 M tot 0,5 M oor 400 cm<sup>3</sup> gestrek het, ontwikkel. Beginbuffer was 0,02 M fosfaatbuffer pH 6,8 en die gradiëntbuffer het addisioneel nog 0,18 en 0,48 M NaCl bevat. Posisie van geëlueerde proteïene is deur middel van absorbansiemetings by 280 nm en die posisie van die ensiem deur aktiwiteitsbepalings vasgestel. Fraksies van 20 min elk is opgevang en die fraksies wat die ensiem bevat is gekombineer. Na konsentrering deur vriesdroging is die droë materiaal in gedistilleerde water opgelos en vir 16 uur by 5° C teen 2 dm<sup>3</sup> 0,1 M Tris-HCl (pH 6,8) wat 0,05 M KCl bevat gedialiseer. Die oplossing waarteen gedialiseer is, is twee keer, 5 uurliks, vervang.

#### 3.4.4.4 Jelfiltrasie deur Biogel-P60 (Stap 4)

Omdat die ensiem met dekstrane reageer kan geen Sephadex kolom gebruik word nie. Biogel-P60 is vir 5 uur by 100° C geswel in 0,1 M Tris-HCl (pH 6,8) met 0,05 M KCl. Na afkoeling is 'n kolom (2,5 cm x 86 cm)

gepak en oornag is buffer deurgepomp teen  $18,0 \text{ cm}^3$  per uur. Hierdie kolom is by  $5^\circ \text{ C}$  gebruik.

Die ensiempreparaat wat 'n volume, van nie meer as  $8 \text{ cm}^3$  moet wees nie, is na dialise op die kolom gepomp. Die kolom is teen 'n vloei-snelheid van  $18 \text{ cm}^3/\text{uur}$  ontwikkel, terwyl 20 min fraksies opgevang is. Die uitvloei van die kolom is net soos die vorige stap ondersoek. Die ensiem, wat na ongeveer 8 uur verskyn, is vir 12 tot 16 uur teen  $5 \text{ dm}^3$  gedistilleerde water gedialiseer met 3 veranderings. Hierna is die ensiem deur vriesdroging gekonsentreer.

#### 3.4.4.5 Chromatografie op DEAE-sellulose (Stap 5)

'n DEAE-sellulose kolom is voorberei soos reeds bespreek. Dit is egter in ewewig gebring met  $0,05 \text{ M}$  fosfaatbuffer pH 6,8. Die ensiem soos verkry uit stap 4 is in dieselfde buffer, opgelos gedialiseer en op die kolom gepomp. Die kolom is deur middel van 'n lineêre konsentrasiegradiënt oor  $400 \text{ cm}^3$  wat vanaf  $0,1 \text{ M}$  tot  $0,3 \text{ M}$  gestek het, ontwikkel. Beginbuffer was  $0,05 \text{ M}$  fosfaat pH 6,8 terwyl die gradiëntbuffer addisioneel  $0,25 \text{ M}$  NaCl bevat het. Die ensiembvattende fraksies is gekombineer en gekonsentreer deur vriesdroging. Karakteriseringsstudies is op hierdie fraksies uitgevoer.

#### 3.4.5 Karakterisering

Die invloed van pH op aktiwiteit is deur middel van die gewone inku-basieprosedure met stysel as substraat vasgestel. Fosfaatbuffer



0,05 M en sitraatbuffer (0,05 M) is opgemaak om die pH-gebied van af pH 3 tot 9 te dek. Na inkubering vir 30 min by 35° C is die monsters behandel soos voorheen bespreek. Dieselfde aktiwiteitsbepaling is gebruik om die invloed van temperatuur op die katalitiese aktiwiteit van die ensiem vas te stel. Studies is oor die temperatuurgebied vanaf 15° tot 60° C uitgevoer.

Variasie van die inkubasietydperk vanaf 5 tot 50 minute by 'n temperatuur van 35° C is onder presies dieselfde kondisies ten opsigte van substraat en pH ondersoek.

Deur van dieselfde algemene kondisies gebruik te maak is die spesifisiteit van die ensiem ondersoek deur van verskillende substrate gebruik te maak. Die substrate gebruik was 0,5% (m/v) oplossings van stysel (Protea), xilaan (Merck), dekstrien (B.D.H.), CM-sellulose (Whatman), sellulosepoer (Whatman), amilopektien (Pearce), glikoogen (Sigma) salisien (B.D.H.), 4-nitrofeniel- $\alpha$ -D-glukopiranosied (Merck), 4-nitrofeniel- $\beta$ -D-glukopiranosied (Merck) asook 'n hemicellulose B fraksie verkry van mnr. P.L. van Biljon.

## HOOFSTUK 4

RESULTATE EN BESPREKING4.1 MONSTERNEMING EN PROEFTOESTANDE

Proefondervindelik is vasgestel dat die verkryging van 'n monster baie vergemaklik word as die skape reeds om 17h00 die vorige dag in 'n stal ingebring en die nag sonder voer en water is. Gevolglik bevat die rumenmonster die volgende oggend om 08h15 geen groot stukke gras nie. Die redelike digte dog fyn rumenmonster het die maagbuis dan nie so maklik verstop nie. Indien monsters getrek word by skape wat direk van die veld af kom word aansienlike verstoppingsprobleme ondervind.

Dwarsdeur die proeftydperk is daar geen probleme met monstertrekking ondervind nie. Die voorkoms van die monsters, veral ten opsigte van kleur het egter met seisoene gewissel. In die somer het die monsters 'n groen kleur vertoon terwyl dit in die winter bruin was. Die skape het aan die prosedure gewoon geraak en ook hier is nie probleme ondervind nie.

Gewoonlik is ongeveer 250 cm<sup>3</sup> rumenmonster van elke skaap getrek en die gekombineerde monster is so gou moontlik verder verwerk. Oor die proeftydperk het die toestand van die veld gevarieer soos verwag kan word. Reënvalsifers is vir die volle tydperk verkry en word in die byvoegsels, tabel 7.1 aangetoon. Daar was deurgaans genoeg weiding en drinkwater vir al die diere beskikbaar. Die verandering in amino-

suursamestelling van rooigras oor 'n soortgelyke tydperk is al voorheen ondersoek (ongepubliseerde resultate, Departement Biochemie, U.O.V.S.). 'n Eenmalige grasmonster is egter ook ondersoek en word later in tabel 4.18 aangedui.

## 4.2 FRAKSIONERING EN ISOLERING VAN RUMENPROTOSOË

### 4.2.1 Analitiese bepalings

Ondersoeke is uitgevoer om die optimale verteringsperiode vir die bepaling van stikstof vas te stel. Vir hierdie doel is heelmonster en perskoek\* in duplikaatbepalings gebruik. In beide gevalle is maksimum stikstofwaardes na 30 tot 60 min vertering verkry. Langer verterings= tydperke het slegs tot 'n afname in stikstofwaardes gelei. Korreksies is aangebring deur middel van 'n reagensblankobepaling. Volgens hierdie resultate is vasgestel dat 1 uur vertering voldoende is. Hierdie prosedure is deurgaans gebruik.

Daar is deurgaans van mikro-Kjeldahlbepalings gebruik gemaak om die stikstofinhoud van monsters vas te stel. Geen kolorimetriese bepaling van proteïene was op hierdie verkrygte rumenfraksies moontlik nie. Soos ook tydens kolorimetriese koolhidraatbepalings veroorsaak agtergrondkleur probleme tydens dié bepalings. Slegs in enkele gevalle is van die baie omslagtige prosedure om vir agtergrondkleur te korrigeer gebruik gemaak, waar spesifiek die hoeveelheid totale koolhidrate bepaal is. Herhaalbaarheid en akkuraatheid van die stikstofbepalings word weerspieël deur die hoë persentasie herwinste wat in die fraksio=

---

\* Sien fraksioneringsprosedure

neringsprosedure verkry is. Slegs bepaling van ammoniakstikstof het soms probleme, veral ten opsigte van herwinste gelewer.

#### 4.2.2 Voorlopige ondersoek ten opsigte van fraksioneringsprosedure

Een van die probleme in hierdie werk was die fraksionering van 'n heterogene rumenmonster in suiwer of redelik suiwer fraksies waarop nie net herhaalbare, maar ook vergelykende studies uitgevoer kon word. Uit die literatuur het dit geblyk dat 'n kombinasie van 'n paar metodes gebruik sou moes word om so 'n suiwing teweeg te bring. Voorheen is gepoog om met behulp van sentrifugering 'n suiwer bakteriese fraksie te verkry (Ulyatt, Macrae, Clarke & Pearce, 1975). Met sentrifugering teen 200 x g vir 5 min is protosoë, gisselle en voedseldeeltjies gesedimenteer om 'n bovloeistof wat slegs uit bakterieë bestaan, te verkry. Daar is ook ander metodes om protosoënsuspensies te kry, byvoorbeeld deur middel van inkubasies. Op hierdie manier word verrykte kulture verkry waarop meer spesifieke metaboliese studies uitgevoer kan word. Volgens Coleman et al. (1974a) sal uit 'n onsuiver suspensie slegs dié protosoë wat die voedingstowwe in die medium kan benut, oorleef.

'n Selvrye ekstrak van rumenprotosoë kan volgens Coleman (1969) berei word deur die sediment, verkry na sentrifugering van rumenvloeistof by 200 x g, in 'n minerale soutoplossing te suspendeer. Hierna word die suspensie drie keer gevries deur die buis in 'n vriesmengsel te plaas en dan vinnig te ontdooi. Na homogenisering word teen 20 000 x g gesentrifugeer. Die viskose oordekkende vloeistof dien as protosoënsuspensie.

ekstrak wat as voedingsmedium by die kweek van protosoë gebruik is.

Tydens genoemde fraksionerings is slegs van sentrifugering gebruik gemaak hoofsaaklik vir die verkryging van bakteriese fraksies. In hierdie werk is die suiwing van protosoë egter noodsaaklik. Ten einde relatief suiwer protosoönfraksies te verkry is 'n verskeidenheid tegnieke en variasies van bestaande tegnieke ondersoek. In die verband word die resultate van voorlopige studies dus hier bespreek. Hoewel sekere tegnieke nie suksesvol was ter verkryging van suiwer protosoönfraksies uit rumeninhoud nie, kan hierdie tegnieke heelwaarskynlik goeie resultate lewer met 'n suiwerder uitgangstof.

Een van laasgenoemde tegnieke is die gebruik van digtheidsgradiënte tydens sentrifugering (Martin et al. 1961; Trautman, 1964). Tydens sentrifugering teen 1 000 x g op sukrosegradiënte vanaf 5 - 20% (m/v) en 20 - 40% (m/v) is slegs skeiding tussen klein styselkorrels en die heel klein voedselstukkies verkry. Onder hierdie toestande het alle graspartikels en protosoë gesedimenteer. Sentrifugering teen 100 x g op sukrosegradiënte vanaf 40 - 60% (m/v) en 40 - 65% (m/m) het duidelik waarneembare skeiding in verskillende sones gelewer. Mikroskopiese ondersoek het egter aangetoon dat hoewel protosoë van 'n spesifieke grootte oorwegend in sekere sones geleë was, daar wel nog vesel en graspartikels teenwoordig was. Van die kleiner protosoë word reeds in die boonste paar lae waargeneem, terwyl medium en groter protosoë verder gesedimenteer het. Skynbaar vind vernietiging van die protosoë plaas as gevolg van die hoë sukrosekonsentrasie waarby gewerk is. Onder hierdie toestande het die protosoë baie donkerder vertoon, terwyl sulke protosoë nie

onder normale omstandighede waargeneem is nie.

Tydens studies met mikrosiwwe van verskillende groottes is soortgelyke resultate verkry. Mikroskopiese ondersoek toon aan dat die 211  $\mu\text{m}$  sif niks teruggehou het nie, terwyl van die groter protosoë en grasdeeltjies op die 152  $\mu\text{m}$  sif teruggehou is. Op die 38  $\mu\text{m}$  sif het baie van die kleiner protosoë saam met bakterieë agtergebly. In die vloeistoffraksie wat hier deurgeloopt, het is hoofsaaklik bakterieë gevind.

Singh, Varma, Verma & Ranjan (1974) het protosoönfraksies vir metaboliese studies voorberei. Rumenvloeistof is teen 100 x g vir 2 min gesentrifugeer. Die sediment is in 0,9% NaCl wat 'n detergent, naamlik poli-oksi-etileen-23-laurieeter (Brij-35) bevat het, gesuspendeer. Deur daarna drie keer teen 100 x g vir 2 min te sentrifugeer en die bovloeistof weg te gooi, is 'n protosoönsediment verkry. Hierdie gewaste protosoönsediment is gebruik vir metaboliese studies.

Aangesien 'n protosoönfraksie op dié wyse voorberei nog heelwat kontaminante bevat, is hierdie prosedure deeglik ondersoek. Singh et al. (1974) het geen melding gemaak of ander detergentkonsentrasies en fraksioneringskondisies wel ondersoek is nie.

Vir die vasstelling van die optimale detergentkonsentrasie en sentrifugale snelheid vir die verkryging van die suiwerste protosoönfraksie, is Brij-35 teen konsentrasies van 0,25; 0,5; 1,0 en 1,5 g/dm<sup>3</sup> in 0,9% NaCl gebruik. Sentrifugering is by 100 x g en 200 x g vir 1 min by 5° C uitgevoer. Massa (g) is na vriesdroging bepaal asook mg N en

mg koolhidrate as glukose. Hieruit is 'n verhouding van  $\frac{\text{mgN}}{\text{mg glukose}}$  verkry wat gebruik is as 'n aanduiding van suiwerheid. Resultate word in tabel 4.1 aangedui. Mikroskopiese ondersoek het getoon dat 0,50 g Brij-35/dm<sup>3</sup> en sentrifugering teen 100 x g die suiwerste protosoönfraksies lewer. Volgens die resultate in tabel 4.1 lewer hierdie kondisies ook die grootste verhouding van mg N tot mg glukose.

As 'n finale stap is verskillende suspenderingsoplossings gebruik. Soos in die vorige geval is stikstof met behulp van mikro-Kjeldahl en koolhidrate as glukose met die Antroonmetode bepaal. In hierdie proef was die mikroskopiese ondersoek egter deurslaggewend in teenstelling met die chemiese analise. Hiervolgens het 0,9% NaCl met 0,05% Brij-35 'n baie suiwerder protosoönfraksie gegee as in die gevalle waar 0,1 M boraat pH 7,5 met of sonder Brij-35 of net 0,9% NaCl as suspenderingsoplossings gebruik is. As 'n tipiese voorbeeld van die voorkoms van preparate verkry met 0,9% NaCl en 0,05% Brij-35 word die foto in figuur 4.1 getoon. 'n Detergent soos Brij-35 help om soveel moontlik bakterieë tydens wasprosesse te verwyder en om protosoë maklik te laat sedimenteer.

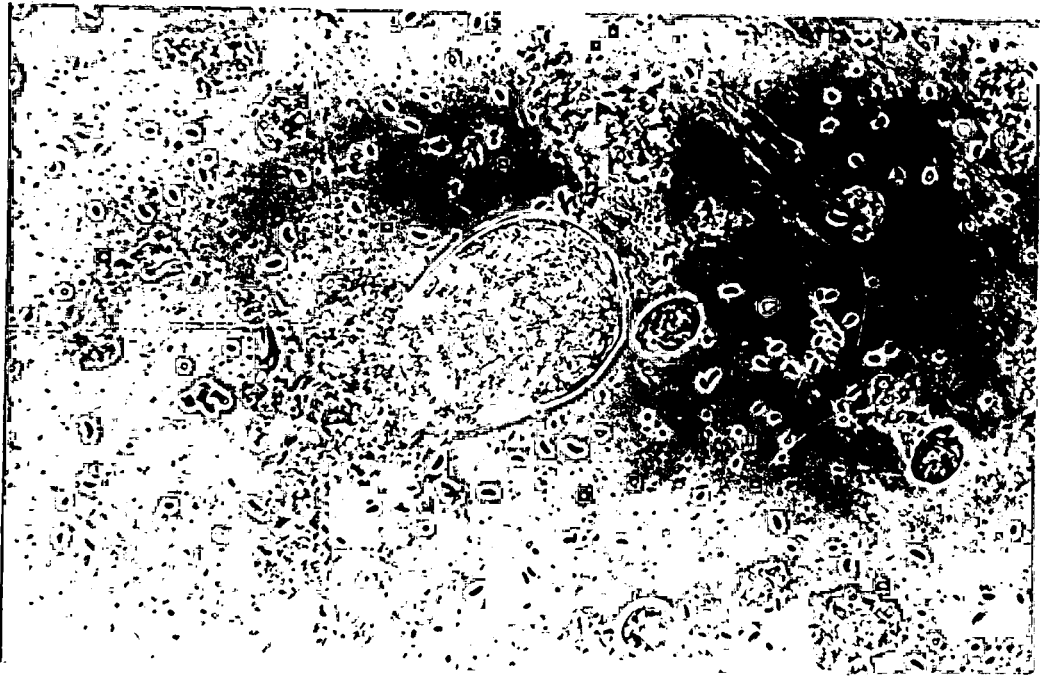
Ondersoeke ten opsigte van sentrifugeringstoestande is op 'n gekombineerde rumenvloeistoffraksie, naamlik bovloeistof 1 en perskoekvloei-stowwe (Figuur 3.1) uitgevoer. Helfte van die fraksie is behandel soos in die eksperimentele prosedure beskryf is. Die ander gedeelte is eers teen 28 000 x g gesentrifugeer waarna die gewone wasprosedure toegepas is. 'n Bakteriese fraksie is uit die gekombineerde bovloei-stoffraksies verkry deur 'n finale sentrifugering by 28 000

Tabel 4.1

Resultate van ondersoek waar wasoplossings met verskillende Brij-35 konsentrasies gebruik is. Daar is teen 100 x g en 200 x g gesentri- fugeer.

Detergent= konsentrasie (g/dm <sup>3</sup> )	Massa na sentrifugering (g)	mg N	mg KH as glukose	Verhouding <u>mg N</u> mg glukose
<u>100 x g</u>				
0,25	0,0831	0,583	2,85	0,205
0,50	0,0859	0,510	2,20	0,232
1,00	0,0837	0,403	2,20	0,183
1,50	0,0847	0,390	2,25	0,173
<u>200 x g</u>				
0,25	0,0903	0,614	3,25	0,189
0,50	0,0913	0,554	3,90	0,142
1,00	0,0889	0,543	3,45	0,157
1,50	0,0883	0,514	2,85	0,180





Figuur 4.1

Mikroskopiese voorkoms van 'n tipiese protosoönfraksie gedurende Junie 1977. Die variasie in grootte van die verskillende protosoë kan duidelik waargeneem word.

x g. Opbrengste en persentasie aminosuursamestelling van bakterieë en protosoë op hierdie twee verskillende wyses voorberei, het nie verskil nie. As gevolg hiervan is die eenvoudiger prosedure deurgaans gebruik.

Aangesien ander navorsers nie sulke suiwer protosoönfraksies wou verkry vir analitiese doeleindes, soos hier die geval is nie, is die fraksioneringsprosedures deeglik ondersoek sodat vergelykende studies gedoen kon word.

#### 4.2.3 Finale fraksioneringsprosedure

Resultate van monster 1 volgens die fraksioneringsprosedure soos voorheen beskryf, word in tabel 4.2 opgesom. Stikstof en totale koolhidrate is bepaal soos reeds beskryf. Hierdie bepalinge tesame met mikroskopiese ondersoeke op K1, K2, K3, PS1 en PS2 (tabel 4.2) toon dat hersuspendering van die perskoek noodsaaklik is om die maksimum hoeveelheid protosoë te verkry. Hierdie fraksies bevat uiteindelik meer protosoë as RV1 en PS1 tesame. Volgens stikstofbepalinge op W1, W2, W3 en W4 word meeste bakterieë met die eerste en tweede was verwyder. Na hierdie ondersoeke is RV1, K1, K2 en K3 nie meer afsonderlik behandel nie, maar gekombineer en gesentrifugeer om PS3 te verkry. Om die fraksioneringsprosedure nog verder te vereenvoudig is die bovloei-stof na die eerste sentrifugeringstap met die wasoplossing gekombineer. Hieruit word 'n bakteriese fraksie na sentrifugering by 28 000 x g vir 30 min by 5° C verkry. In tabel 4.3 word herwinste van die fraksioneringsprosedure in terme van totale stikstof en organiese stikstof aangedui. 'n Totale herwinst van 98,4% gebaseer op

Tabel 4.2

Resultate van monster 1 soos gefraksioneer volgens die finale suiweringsprosedure. 0,9% NaCl met 0,05% Brij-35 is gebruik en daar is teen 100 x g vir 1 min by 5° C gesentrifugeer.

Monster	Volume (cm <sup>3</sup> )	Totale N (mg)	Totale KH (as mg glukose)
Rumenvloeistof 1	770	461,2	651,4
Perskoekvloeistof 1 (K1)	520	286,5	448,2
Perskoekvloeistof 2 (K2)	500	236,0	470,0
Oplosbare fraksie 1 (PS1)	690	282,2	1559,4
Oplosbare fraksie 2 (PS2)	959	302,1	776,8
Wasoplossing 1 (W1)	300	149,1	204,6
Wasoplossing 2 (W2)	328	39,7	117,1
Wasoplossing 3 (W3)	340	13,6	32,0
Wasoplossing 4 (W4)	335	11,7	24,8
Protosoönfraksie (P)	100	139,0	526,0

Tabel 4.3

Evaluering van suiweringsprosedure (monster 1) soos gebaseer op die herwins van totale- en organiese stikstof in die verskillende fraksies.

Monster	Totale N (mg)	NH <sub>3</sub> -H (mg)	Org-N (mg)	Totale N herwins (%)	Org-N herwins (%)
Heelmonster	2424	208	2216	100	100
Perskoek	1451	126	1325	59,8	59,9
Oplosbare fraksie	584	50	530	24,1	23,9
Wasoplossing	214	24	190	8,8	8,6
Protosoë	139	10	129	5,7	5,8
			Totaal	98,4	98,2

totale stikstof is verkry. Hierdie resultate het baie min tussen die verskillende monsters, no 1 tot 18, verskil. As 'n voorbeeld van die normale suiweringsprosedure word die resultate van monster 17 ook kortliks in tabel 4.4 opgesom.

In tabel 4.5 word die resultate van al die verskillende monsters se fraksionering aangedui. Monsterdatums, monstervolumes en gevries=droogde massas van die verskillende fraksies word hier getoon. Ten einde verskillende monsters met mekaar te kan vergelyk is die waardes omgerek asof in alle gevalle met presies een  $\text{dm}^3$  heelmonster begin is. Deurgaans sal van hierdie prosedure vir vergelykende doeleindes gebruik gemaak word.

Stikstofbepalings is op alle fraksies uitgevoer. Hierdie waardes van heelmonster, perskoek, protosoë en bakterieë word in tabel 4.6 aangegee. Op dieselfde wyse word organiese- en ammoniak-N in tabel 4.7 gegee. Grafiese voorstellings van 'n gedeelte van die resultate word in figuur 4.2 gegee. Die resultate van totale mg aminosuurstikstof (tabelle 4.8; 4.9; 4.10 en 4.11) word tesame met hierdie waardes aangedui.

Daar moet spesifiek op gelet word dat alle fraksies beskou is asof met presies een  $\text{dm}^3$  heelmonster begin is. By monster 9 is die fraksioneringsprosedure verander soos aangedui in figuur 3.1 om ook 'n bakteriese fraksie vir verdere analise te verkry.

Tabel 4.4

Resultate van fraksioneringsprosedure (monster 17). Herwinste van totale- en aminosuurstikstof in die verskillende fraksies word ook aangedui.

Monster	Totale N (mg)	NH <sub>3</sub> -N (mg)	Org-N (mg)	Totale N herwins (%)	Org-N herwins (%)	
RM	2066,3	157,5	1908,8	100	100	
PK	1237,1	140,4	1096,7	59,9	57,5	
W1 - 3	382,0	183,0	199,0	18,5	10,4	
B	502,0	77,0	425,0	24,3	22,3	
P	87,0	14,0	73,0	4,2	3,8	
				Totaal	106,9	94,0

Tabel 4.5

Resultate van fraksionering van alle monsters. Werklike massa (gevries=droog) asook omgerekende massas asof met  $1 \text{ dm}^3$  heelmonster (RM) begin is, word getoon.

Monster	Datum	Volume ( $\text{dm}^3$ )	Heelmonster		Perskoek		Protosoë		Bakterieë	
			(g)	( $\text{g}/\text{dm}^3$ )	(g)	( $\text{g}/\text{dm}^3$ )	(g)	( $\text{g}/\text{dm}^3$ )	(g)	( $\text{g}/\text{dm}^3$ )
1	13/11/76	1,400	100,4	71,7	67,0	47,9	1,918	1,370		
2	14/12/76	1,525	108,3	71,0	103,6	67,9	2,389	1,567		
3	4/ 1/77	1,820	130,5	71,7	92,9	51,0	3,166	1,740		
4	25/ 1/77	1,470	148,5	101,0	103,9	70,7	2,187	1,488		
5	15/ 2/77	1,320	122,8	93,0	72,0	54,6	2,651	2,009		
6	8/ 3/77	1,180	105,0	89,0	67,1	56,9	2,389	2,025		
7	29/ 3/77	1,280	113,9	89,0	75,0	58,6	4,480	3,500		
8	19/ 4/77	1,660	124,5	75,0	106,6	64,2	2,921	1,760		
9*	10/ 5/77	1,420	98,0	69,0	90,7	63,9	2,874	2,024	5,502	3,875
10	31/ 5/77	1,505	117,4	78,0	105,4	70,0	3,487	2,317	5,489	3,647
11	21/ 6/77	1,470	114,7	78,0	80,1	54,5	2,242	1,525	4,992	3,396
12	12/ 7/77	1,510	120,8	80,0	87,0	57,6	2,868	1,899	6,393	4,234
13	2/ 8/77	1,660	131,1	79,0	106,0	63,9	2,917	1,757	9,875	5,949
14	23/ 8/77	1,520	88,2	58,0	85,0	55,9	2,204	1,450	7,159	4,710
15	13/ 9/77	1,440	99,4	69,0	74,2	51,5	1,419	0,986	5,994	4,163
16	4/10/77	1,500	75,0	50,0	54,0	36,0	1,288	0,859	7,155	4,770
17	25/10/77	1,510	135,9	90,0	96,4	63,8	2,261	1,497	10,973	7,267
18	15/11/77	1,675	117,3	70,0	91,5	54,6	2,951	1,762	10,642	6,353

\* Vanaf monster 9 is van die vereenvoudigde fraksioneringsprosedure (Figuur 3.1) gebruik gemaak.

Tabel 4.6

Totale stikstofinhoud van die verskillende fraksies in die onderskeie monsters uitgedruk as mg N van elke rumenfraksie. Waardes word aangegee asof in alle gevalle met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is.

Monster	Heelmonster	Perskoek	Protosoë	Bakterieë
1	1731,5	1036,1	99,3	
2	1713,9	1235,7	118,7	
3	1971,7	1011,2	113,7	
4	2444,2	1362,0	94,4	
5	2902,3	1645,2	144,3	
6	2510,3	1271,5	147,1	
7	2563,8	1336,0	208,1	
8	2109,0	1096,8	99,7	
9*	1840,3	922,3	107,8	312,4
10	1735,2	816,5	122,9	209,2
11	1636,0	775,5	71,4	172,4
12	1688,9	816,4	173,8	261,3
13	1695,0	874,2	82,8	402,1
14	889,2	532,4	54,3	281,1
15	1061,0	634,8	43,2	252,7
16	1377,5	824,7	58,0	334,7
17	2394,0	1400,7	96,0	610,1
18	1546,3	865,9	96,7	487,2

\* Sien tabel 4.5



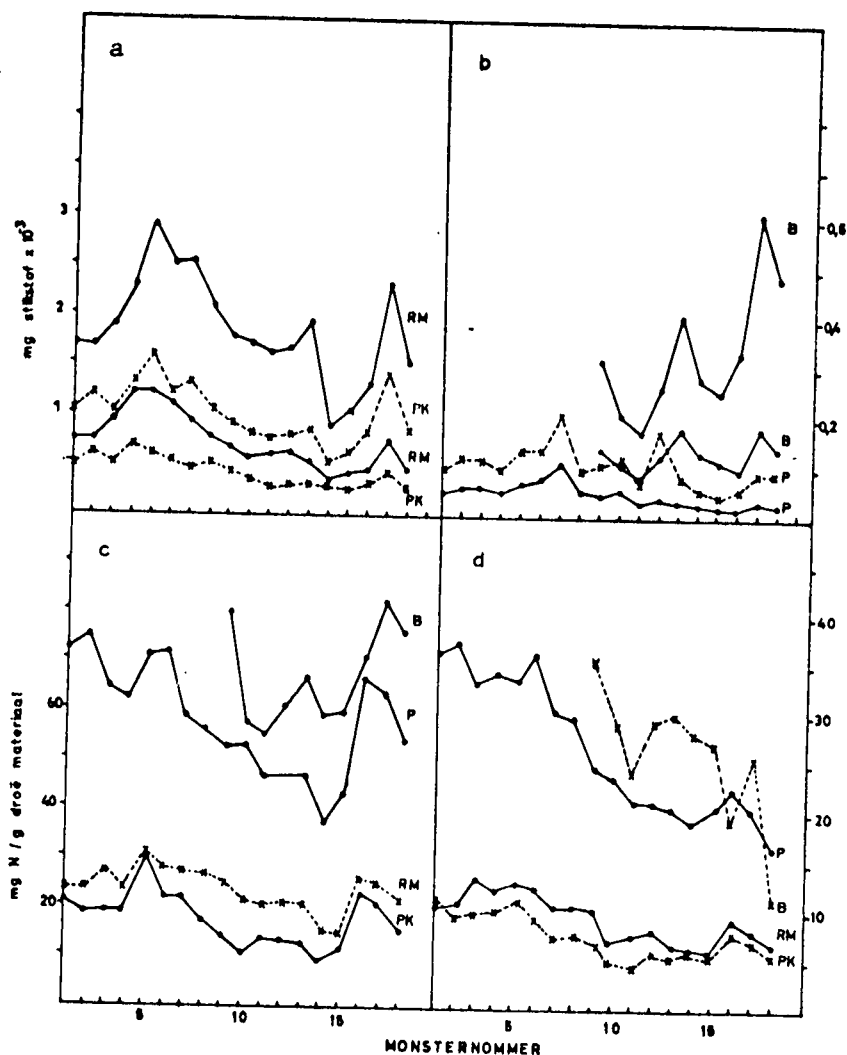
Tabel 4.7

Organiese- en ammoniak stikstofinhoud van die verskillende fraksies in die onderskeie monsters uitgedruk as mg N van elke rumenfraksie.

Waardes word aangegee asof in alle gevalle met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is.

Monster	ORGANIESE STIKSTOF (mg)				AMMONIAK STIKSTOF (mg)			
	Heelmonster	Perskoek	Protosoë	Bakterië	Heelmonster	Perskoek	Protosoë	Bakterië
1	1583,1	946,1	91,2		148,4	90,0	8,1	
2	1573,3	1114,1	110,4		140,6	121,6	8,3	
3	1820,4	735,5	102,2		187,3	341,3	14,3	
4	2205,8	1176,8	63,5		265,5	206,2	11,7	
5	2551,1	1472,2	144,3		351,2	173,0	19,6	
6	2120,4	1169,8	147,1		389,8	93,7	13,2	
7	2103,4	1145,2	190,5		460,4	190,9	17,6	
8	1720,0	995,5	85,8		289,5	101,2	13,9	
9*	1586,8	776,1	98,4	271,3	253,5	146,3	9,4	41,1
10	1464,4	714,4	108,0	184,5	270,8	102,1	15,0	24,8
11	1429,0	705,0	54,4	131,9	207,0	70,5	17,0	40,5
12	1306,9	730,0	136,8	223,9	382,0	86,4	37,1	37,4
13	1397,6	788,6	73,8	296,5	297,4	85,5	9,0	105,6
14	813,2	453,5	46,1	237,9	76,0	78,9	8,2	43,2
15	940,0	572,4	37,0	215,9	121,0	62,4	6,2	36,9
16	1272,5	731,1	48,7	283,3	105,0	93,6	9,3	51,3
17	2133,0	1282,6	84,8	527,4	261,0	118,1	11,3	82,8
18	1378,3	774,6	77,6	300,4	168,0	91,2	19,1	186,8

\* Sien tabel 4.5



Figuur 4.2

Grafiese voorstellings van totale en aminosuurstikstof van RM (heelmonster) en PK (perskoek) (a), P (protosoë) en B (bakterieë) (b) oor die volle proeftydperk. Die laer konsentrasie verteenwoordig elke keer die aminosuurstikstof. Voorstelling van mg N/g droë materiaal vir totale stikstof (c) en aminosuurstikstof (d) vir die verskillende rumenfraksies oor die volle proeftydperk word ook getoon.

Variasie in stikstofkonsentrasies toon duidelike tendense wat ooreenstem met die resultate van variasie in aminosuurinhoud oor dieselfde tydperk. 'n Toename in die konsentrasie van totale stikstof en organiese stikstof word tot monster 5 (15/2/1977) waargeneem. Die N-konsentrasies neem dan skerp af tot by monster 10 (31/5/1977), met 'n effense toename tot monster 12 (12/7/1977), gevolg deur 'n verdere afname tot monster 14 (23/8/1977). Die minimumwaarde (monster 14) val saam met die tydperk toe die gras in die veld geheel en al droog was. Voor monster 15 (13/9/1977) het die eerste reëns geval sodat die veld begin verander het. Waar die vorige monsters bruin van kleur was (in die winter), het monster 15 reeds 'n groen kleur vertoon soortgelyk aan dié monsters wat in die somer getrek is. Vanaf monster 15 word 'n vinnige toename in individuele N-konsentrasies waargeneem, terwyl monster 18 (15/11/1977) neig na 'n vlak wat tydens die aanvang van die studies waargeneem is. Hierdie afname is moontlik as gevolg van stabilisering van kondisies in die rumen, of dit kan wees dat die effens droër toestande wat na die reëns gevolg het, die veld minder aantreklik vir die dier gemaak het.

Die laer en hoër stikstofwaardes wat waargeneem word, gaan gepaard met 'n afname of toename van droë materiaal in die rumen. Dieselfde waarneming is ten opsigte van protosoë en bakterieë gemaak, sodat dit lyk asof rantsoen die relatiewe hoeveelhede van die mikroörganismes beïnvloed. Hieruit volg dat daar dus minder aminosure aan die dier beskikbaar sal wees. Hierdie waarneming word gestaaf deur waardes verkry wanneer die hoeveelheid stikstof per gram droë materiaal bereken word. 'n Voorstelling word in figuur 4.2 aangetoon. By die

bespreking van aminosuurkonsentrasies word weer hierna verwys. Mikro=skopiese voorkoms van die protosoönfraksies is ook oor die volle proef=tydperk ondersoek. Hierdie resultate word egter slegs bespreek. Die relatiewe hoeveelheid van die kleiner en groter protosoë het oor die proeftydperk volgens dié waarnemings ietwat gewissel. Dit lyk asof minder van die groter protosoë in die winter voorkom. Volgens Coleman et al. (1974a) neem Epidinium baie minder bakterieë op as ander (Entodinium) en metaboliseer eerder stysel na onder andere aminosure. Omdat daar in die winter egter baie minder koolhidrate in die beskik=bare rantsoen is, sal hierdie protosoë verminder. Dit kan die waar=genome verandering in die voorkoms van die protosoönfraksie verklaar. Hierdie verandering kan egter met geen van die analitiese tegnieke waargeneem word nie, Die protosoönfraksie word dus deurgaans as 'n enkele "homogene" fraksie beskou.

#### 4.3 AMINOSUURSAMESTELLING

##### 4.3.1 Opbrengs, herhaalbaarheid en standaardisering

Die aminosure treonien, serien sistien en tirosien word tydens suur=hidrolise gedeeltelik vernietig. Om vir hierdie verliese te kompen=seer is monsters wat vaste hoeveelhede van hierdie aminosure bevat het, vir verskillende tye gehidroliseer (Eveleigh & Winter, 1970). 'n Faktor is bereken waarmee die betrokke verkrygte aminosuurkonsen=trasie vermenigvuldig moes word. Die mate van vernietiging na 22 uur hidrolise is vir elke aminosuur bereken. Die korreksiefaktore hieruit verkry was vir Thr 1,072; Ser 1,172; Cys 1,558 en Tyr 1,160.

Herhaalbaarheid van die hidroliseprosedure is bepaal deur tien monsters van bakterieë (monster no. 12) onafhanklik van mekaar te behandel soos in eksperimentele prosedure beskryf. Hierdie monsters is toe ontleed vir aminosuursamestelling. Die verkrygte waardes in mmol, gemiddeldes, koëffisiënte van variasie en betroubaarheidsintervalle word in tabel 7.2 weergegee. Die rekenaarprogram hiervoor gebruik word in byvoegsel IV gegee.

Volgens hierdie resultate is die bepaling van aminosuurkonsentrasies in die onderskeie monsters dus uiters akkuraat. Met enkele uitsonderings, waar moontlik ander foute kon insluip, kan die waardes soos later gerapporteer dus as akkurate waardes aanvaar word. Alle aminosuurkonsentrasies is waar nodig, gekorrigeer vir verliese. Waar daar dus groot verskille of ooreenkomste tussen verskillende aminosuurvlakke waargeneem is, moet hierdie verskynsels as beduidend aanvaar word. Aangesien soortgelyke waarnemings nog nie voorheen oor so 'n lang tydperk uitgevoer is nie, kon hierdie verkrygte waardes en tendense nie met die literatuur vergelyk word nie.

'n Soortgelyke toets vir herhaalbaarheid en akkuraatheid is met die standaardkalibreringsmengsel van aminosure (Beckman Instruments) uitgevoer. Hierdie 19 kalibrerings is oor 'n tydperk van 'n jaar met onderlinge veranderings van buffers, reagense asook die herpak van kolomme uitgevoer. Die herpak van kolomme was nodig as gevolg van drukprobleme wat na lang gebruikperiodes ondervind is. Vervanging van die teflonskyfie bo-op die kolom was ook van tyd tot tyd nodig wanneer die druk begin styg het. Die opvallende akkuraatheid en herhaalbaarheid van hierdie kalibrerings word kortliks in tabel 7.3

(byvoegsels) aangedui. Ook hierdie resultate onderskryf die akkuraatheid en herhaalbaarheid van die aminosuurentledingsprosedure.

#### 4.3.2 Aminosuursamestelling van verskillende fraksies

Alle waardes word uitgedruk asof met presies 1 dm<sup>3</sup> rumenmonster begin is. Die aminosuursamestelling van heelmonster, perskoek en protosoë van verskillende monsters word in tabelle 4.8, 4.9 en 4.10 onderskeidelik aangetoon. In tabel 4.11 word dié waardes vir bakterieë vanaf monster 9 aangegee.

Die variasie in aminosuorkonsentrasie van heelmonster en protosoë oor die volle proeftydperk word in figure 4.3 en 4.4 onderskeidelik aangebied. 'n Rekenaarprogram wat by die trek van grafieke gebruik is, word in byvoegsel IV aangedui. Triptofaanbepalings is wel met behulp van ensimatiese en alkaliese hidrolise prosedures op sekere monsters uitgevoer. Hierdie resultate word in tabel 4.12 aangetoon. Aangesien die triptofaaninhoud van die monsters so laag is en die bepaling afsonderlik gedoen moet word, is slegs enkele monsters ondersoek. Die triptofaaninhoud in geeneen van die monsters is in aanmerking geneem by verdere bespreking van die aminosure nie.

Die variasie in aminosuorkonsentrasies toon duidelike tendense wat ooreenstem met die resultate van variasie in stikstofinhoud oor dieselfde tydperk. Oor die somermaande het die waardes na hoër vlakke geneig, terwyl die waardes in die winter (droë tydperk) 'n minimum bereik het. In die verband kan ook na Figuur 4.2 verwys word waar aminosuurstikstof per gram droë materiaal in elke monster aangedui

Tabel 4.8

Resultate van individuele aminosuurwaardes (mmol) van alle monsters van die heelmonster wat ontleed is. Waardes is uitgedruk asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is en is die gemiddeld van duplikaatbepalings.

Aminosuur	Aminosuurkonsentrasie as mmol in die monsters soos aangedui no 1 tot 18																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Lys	2,037	2,306	2,862	4,445	4,214	4,018	3,377	2,787	2,385	2,217	2,331	2,367	2,024	1,265	1,436	2,164	3,842	2,494
His	0,541	0,567	0,704	1,029	0,919	0,920	0,763	0,653	0,579	0,493	0,525	0,527	0,452	0,314	0,341	0,546	1,018	0,656
Arg	1,189	1,246	1,630	2,275	2,115	1,901	1,486	1,282	1,197	0,915	0,905	0,963	0,803	0,568	0,654	1,090	1,722	1,110
Asp	4,755	4,653	5,741	6,915	7,746	6,676	5,973	4,917	4,340	3,896	4,196	4,198	3,502	2,273	2,578	3,896	6,587	4,366
Thr	2,685	2,505	3,149	3,896	4,206	3,551	3,267	2,685	2,428	2,108	2,128	2,264	1,930	1,235	1,413	2,230	3,525	2,430
Ser	2,797	2,612	3,231	4,077	4,153	3,632	3,492	2,787	2,688	2,203	2,194	2,382	1,896	1,161	1,417	2,302	3,527	2,542
Glu	4,597	4,290	5,641	6,712	7,439	6,582	5,938	4,936	4,413	3,667	3,760	4,043	3,377	2,113	2,319	3,909	6,193	4,361
Pro	1,711	1,799	2,826	2,763	2,950	2,638	2,082	1,866	1,661	1,503	1,559	1,657	1,424	0,893	1,037	1,551	2,571	1,751
Gly	3,944	3,830	4,615	5,721	6,152	5,323	4,666	3,942	3,591	3,020	3,059	3,473	2,885	1,777	2,102	3,223	5,156	3,573
Ala	4,107	3,993	4,820	5,961	6,604	5,594	5,106	4,157	3,718	3,076	3,147	3,346	2,969	1,790	2,173	3,374	5,510	3,805
Val	2,601	2,794	3,360	3,949	4,421	3,754	3,088	2,656	2,343	1,922	2,094	2,129	1,751	1,209	1,441	2,242	3,387	2,300
Met	0,396	0,195	0,416	0,330	0,690	0,541	0,769	0,565	0,469	0,317	0,484	0,274	0,435	0,165	0,321	0,505	0,365	0,437
Ile	2,056	2,157	2,750	3,318	3,624	3,233	2,556	2,281	1,810	1,640	1,718	1,760	1,215	0,986	1,173	1,893	2,801	1,825
Leu	3,319	3,254	4,029	4,737	5,486	4,931	4,105	3,489	3,016	2,495	2,619	2,660	2,200	1,463	1,744	2,876	4,541	3,090
Tyr	0,914	1,013	1,407	1,712	1,532	1,360	1,070	1,018	0,831	0,482	0,488	0,587	0,547	0,342	0,475	0,767	1,214	0,697
Phe	1,716	1,748	2,082	2,568	2,812	2,408	2,070	1,745	1,410	1,235	1,396	1,296	1,097	0,724	0,817	1,403	2,292	1,517
Totaal	39,3	39,1	49,2	60,4	65,0	57,0	49,8	41,8	36,9	31,2	32,4	33,9	28,5	18,3	21,4	22,6	35,4	22,1
mg N	745,3	751,3	949,2	1237,8	1246,0	1121,3	940,6	791,9	696,0	575,9	602,5	643,3	546,8	353,7	405,9	474,5	754,4	478,8

Tabel 4.9

Resultate van individuele aminosuurwaardes (mmol) van alle perskoekmonsters wat ontleed is. Waardes is uitgedruk asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is.

Aminosuur	Aminosuurkonsentrasie as mmol in die monsters soos aangedui no 1 tot 18																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Lys	1,539	2,120	1,656	2,731	2,111	2,017	1,977	1,820	1,458	1,363	0,941	1,258	1,372	1,230	0,956	1,347	2,191	1,400
His	0,384	0,504	0,377	0,593	0,532	0,549	0,516	0,415	0,361	0,292	0,198	0,268	0,296	0,286	0,224	0,430	0,568	0,344
Arg	0,826	1,101	0,850	1,237	0,972	0,963	0,856	0,802	0,747	0,489	0,352	0,423	0,460	0,522	0,481	0,636	0,972	0,557
Asp	2,889	3,643	2,734	3,860	3,455	3,541	3,252	2,975	2,544	1,969	1,674	2,566	2,161	2,188	1,688	2,477	4,128	2,461
Thr	1,575	1,906	1,541	2,020	1,957	1,928	1,777	1,623	1,413	1,167	0,904	1,114	1,162	1,222	0,954	1,396	2,160	1,350
Ser	0,609	2,026	1,718	2,025	2,017	2,091	1,832	1,789	1,565	1,329	1,016	1,199	1,151	1,340	1,118	1,523	2,180	1,365
Glu	2,926	3,580	2,832	3,661	3,635	3,634	3,234	3,034	2,534	2,045	1,546	1,948	2,040	2,113	1,542	2,532	3,861	2,445
Pro	1,281	1,550	1,236	1,549	1,572	1,610	1,380	1,124	0,940	1,270	0,753	0,887	0,869	0,936	0,716	1,031	1,630	1,034
Gly	2,603	3,221	2,379	3,267	3,049	2,894	2,678	2,469	2,220	1,669	1,597	1,628	1,731	1,757	1,440	2,166	3,343	2,092
Ala	2,745	3,167	2,434	3,397	3,155	2,979	2,672	2,569	2,132	1,644	1,337	1,597	1,690	1,704	1,401	2,218	3,477	2,136
Val	1,826	2,257	1,643	2,224	1,994	1,893	1,805	1,701	1,513	1,039	0,891	1,029	1,087	1,164	0,954	1,445	2,121	1,302
Met	0,211	0,246	0,099	0,199	0,287	0,243	0,056	0,200	0,201	0,088	0,000	0,111	0,174	0,112	0,932	0,224	0,102	0,206
Ile	1,476	1,910	1,381	1,800	1,662	1,632	1,480	1,470	1,199	0,890	0,733	0,858	0,941	0,947	0,756	1,182	1,677	1,025
Leu	2,287	2,850	2,113	2,718	2,682	2,737	2,393	2,235	1,962	1,457	1,173	1,378	1,483	1,478	1,170	1,941	2,880	1,821
Tyr	0,716	0,867	0,646	0,883	0,592	0,598	0,586	0,584	0,434	0,237	0,179	0,226	0,228	0,301	0,270	0,400	0,662	0,272
Phe	1,209	1,449	1,078	1,376	1,358	1,331	1,236	1,118	0,851	0,728	0,563	0,690	0,733	0,762	0,576	0,926	1,491	0,871
Totaal	26,1	32,4	24,7	33,5	23,5	26,0	21,6	25,9	22,6	17,1	13,8	17,2	17,6	18,1	14,3	14,6	22,2	12,4
mg N	499,8	636,7	501,7	712,6	620,0	514,3	443,2	507,7	434,4	341,8	258,7	340,6	346,2	346,7	280,3	302,2	466,1	272,2



Tabel 4.10

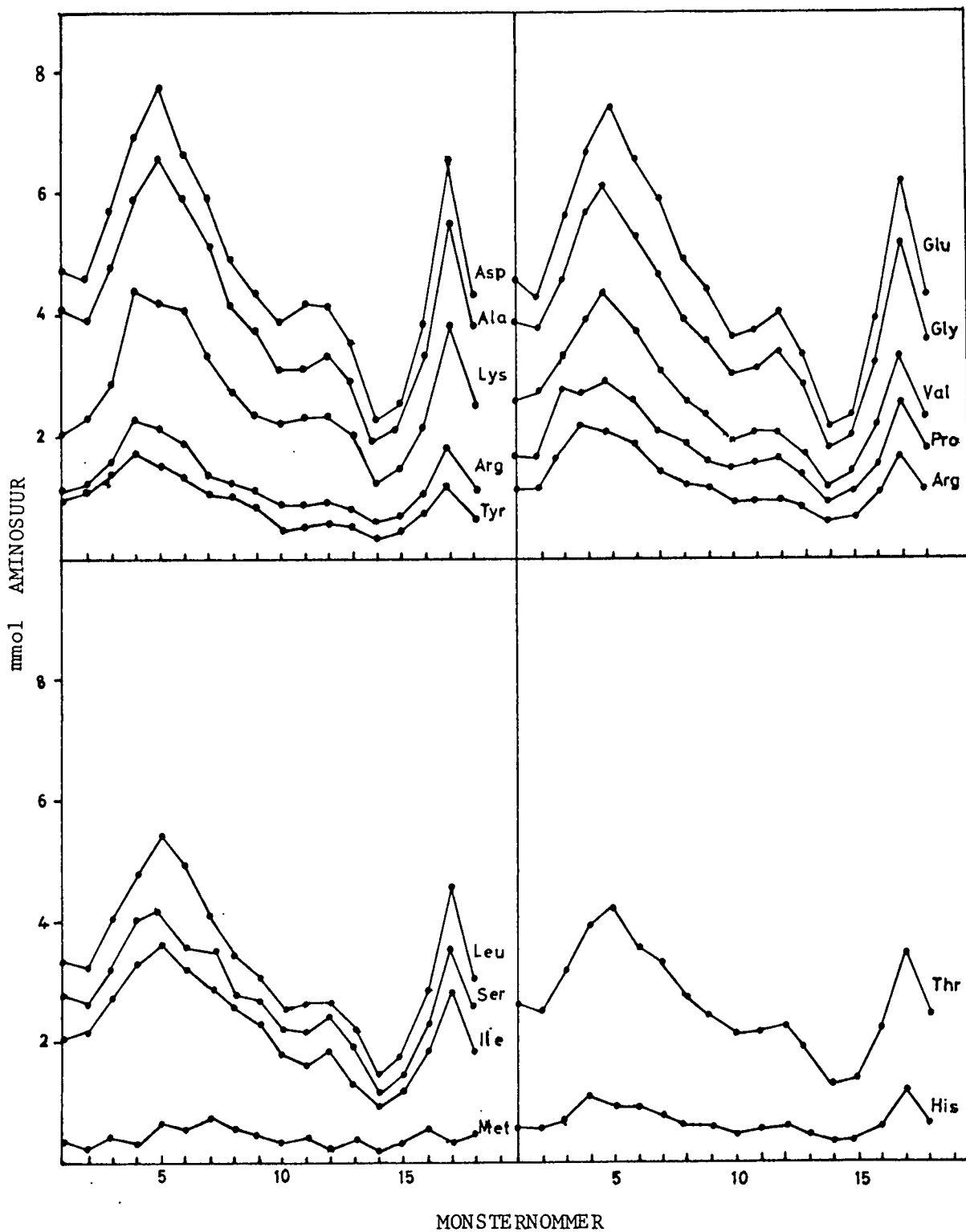
Resultate van individuele aminosuurwaardes (mmol) van alle protosoönmonsters wat ontleed is. Waardes uitgedruk asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is en is die gemiddeld van duplikaatbepalings.

Aminosuur	Aminosuurskonsentrasie as mmol in die monsters soos aangedui no 1 tot 18																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Lys	0,185	0,266	0,231	0,232	0,320	0,299	0,375	0,201	0,191	0,222	0,125	0,168	0,142	0,108	0,080	0,105	0,158	0,119
His	0,042	0,054	0,044	0,046	0,062	0,060	0,085	0,042	0,040	0,047	0,027	0,034	0,030	0,026	0,017	0,025	0,045	0,029
Arg	0,091	0,113	0,102	0,100	0,143	0,137	0,187	0,107	0,098	0,101	0,061	0,071	0,066	0,051	0,038	0,051	0,079	0,060
Asp	0,287	0,334	0,363	0,294	0,465	0,442	0,637	0,309	0,309	0,348	0,207	0,257	0,223	0,176	0,128	0,164	0,263	0,196
Thr	0,147	0,170	0,177	0,146	0,239	0,230	0,351	0,170	0,173	0,189	0,114	0,139	0,128	0,097	0,068	0,089	0,145	0,105
Ser	0,156	0,174	0,171	0,148	0,247	0,226	0,359	0,183	0,183	0,195	0,117	0,140	0,127	0,096	0,072	0,095	0,148	0,112
Glu	0,283	0,325	0,344	0,238	0,458	0,427	0,622	0,324	0,320	0,341	0,194	0,247	0,222	0,167	0,119	0,165	0,257	0,195
Pro	0,113	0,127	0,126	0,101	0,171	0,188	0,230	0,099	0,108	0,151	0,081	0,085	0,074	0,063	0,047	0,065	0,107	0,076
Gly	0,226	0,243	0,264	0,218	0,340	0,328	0,495	0,246	0,248	0,254	0,159	0,184	0,171	0,130	0,097	0,125	0,208	0,150
Ala	0,219	0,234	0,250	0,212	0,333	0,324	0,527	0,253	0,262	0,254	0,171	0,192	0,168	0,134	0,097	0,128	0,211	0,160
Val	0,154	0,174	0,190	0,155	0,243	0,245	0,351	0,156	0,171	0,174	0,111	0,128	0,119	0,092	0,069	0,082	0,140	0,096
Met	0,020	0,026	0,051	0,033	0,027	0,049	0,162	0,053	0,050	0,049	0,035	0,042	0,036	0,025	0,019	0,033	0,039	0,031
Ile	0,144	0,165	0,185	0,148	0,236	0,234	0,319	0,145	0,152	0,163	0,095	0,126	0,109	0,082	0,062	0,080	0,125	0,083
Leu	0,205	0,226	0,251	0,195	0,328	0,326	0,461	0,220	0,218	0,232	0,139	0,169	0,152	0,120	0,086	0,120	0,200	0,134
Tyr	0,094	0,100	0,107	0,084	0,137	0,129	0,190	0,095	0,093	0,090	0,054	0,066	0,060	0,048	0,038	0,047	0,071	0,054
Phe	0,111	0,124	0,134	0,104	0,174	0,176	0,240	0,114	0,115	0,122	0,074	0,087	0,078	0,061	0,045	0,056	0,103	0,060
Totaal	2,48	2,85	2,99	2,45	3,92	3,82	5,59	2,72	2,73	2,93	1,76	2,14	1,91	1,47	1,08	0,95	1,52	1,66
mg N	49,4	58,6	57,8	51,0	67,1	74,2	105,1	52,2	49,0	55,3	32,5	41,0	36,6	28,0	20,6	19,3	31,3	29,9

Tabel 4.11

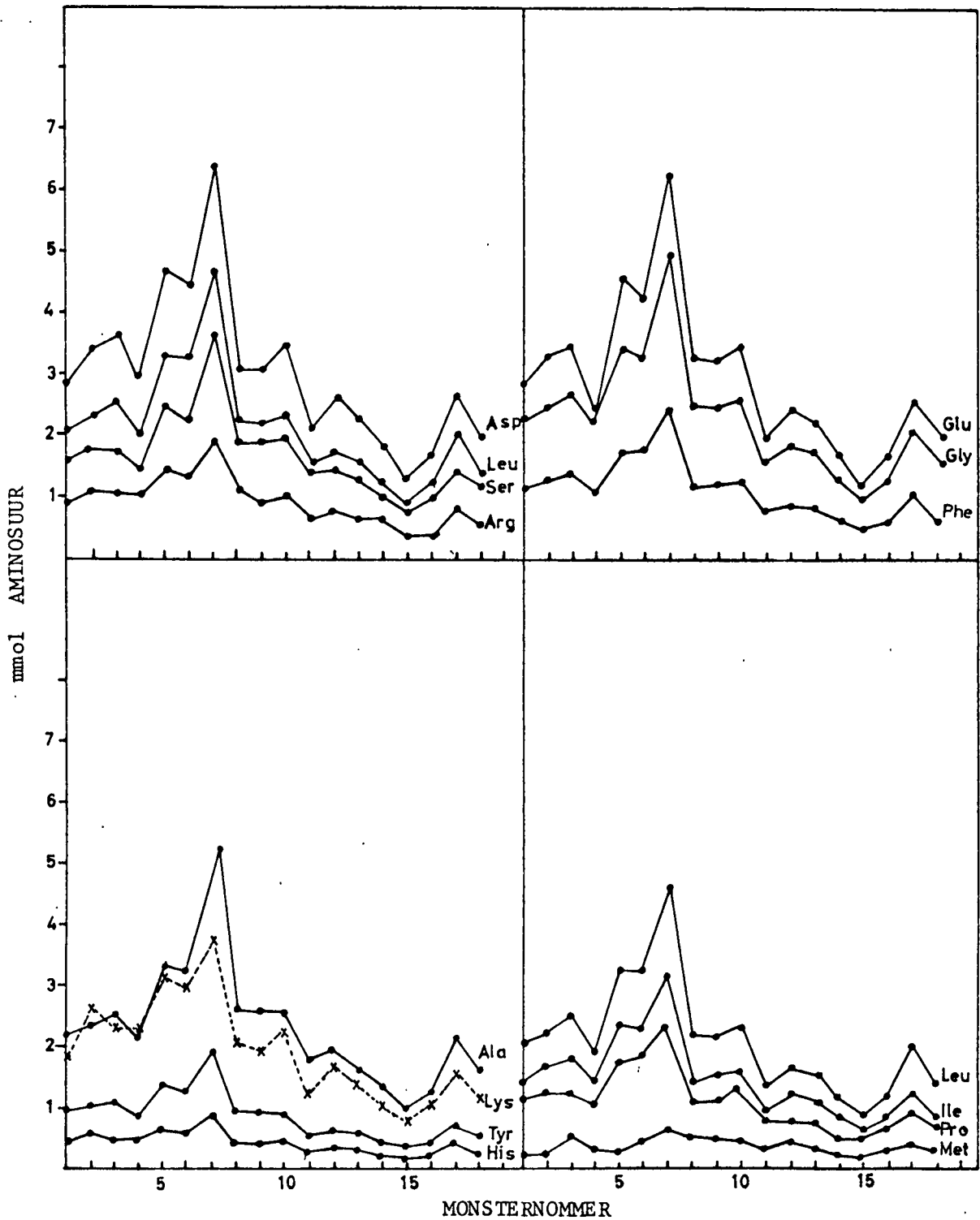
Resultate van individuele aminosuurwaardes (mmol) van alle bakteriese monsters (vanaf monster 9) wat ontleed is. Waardes is uitgedruk asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is.

Aminosuur	Aminosuurkonsentrasie as mmol in die monsters soos aangedui no 9 tot 18									
	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Lys	0,282	0,359	0,288	0,424	0,637	0,455	0,408	0,508	0,885	0,775
His	0,066	0,084	0,067	0,101	0,158	0,114	0,095	0,127	0,238	0,178
Arg	0,144	0,179	0,145	0,207	0,308	0,230	0,186	0,261	0,420	0,396
Asp	0,492	0,668	0,546	0,748	1,093	0,824	0,733	0,929	1,480	1,448
Thr	0,278	0,387	0,308	0,426	0,632	0,495	0,412	0,537	0,833	0,821
Ser	0,259	0,375	0,274	0,396	0,569	0,430	0,390	0,497	0,787	0,807
Glu	0,459	0,631	0,483	0,694	1,016	0,776	0,645	0,838	1,413	1,395
Pro	0,111	0,281	0,163	0,244	0,346	0,267	0,236	0,290	0,474	0,435
Gly	0,397	0,507	0,419	0,579	0,874	0,661	0,600	0,745	1,186	1,124
Ala	0,466	0,577	0,480	0,659	0,999	0,776	0,689	0,856	1,356	1,318
Val	0,282	0,341	0,294	0,409	0,635	0,480	0,417	0,531	0,829	0,703
Het	0,099	0,132	0,086	0,146	0,172	0,145	0,126	0,186	0,245	0,260
Ile	0,229	0,286	0,234	0,340	0,525	0,394	0,351	0,438	0,675	0,553
Leu	0,311	0,407	0,344	0,465	0,704	0,543	0,475	0,434	0,986	0,913
Tyr	0,141	0,195	0,157	0,218	0,304	0,251	0,221	0,272	0,462	0,436
Phe	0,159	0,213	0,195	0,234	0,359	0,263	0,239	0,315	0,500	0,469
Totaal	8,34	5,62	4,48	6,42	9,33	7,10	6,22	4,15	8,46	7,25
mg N	139,1	105,8	81,9	122,1	178,9	132,0	115,3	94,5	183,0	75,3



Figuur 4.3

Grafiese voorstelling van individuele aminosuorkonsentrasies van heelmonster oor die volle proeftydperk.



Figuur 4.4

Grafiese voorstelling van individuele aminosuurkonsentrasies van protosoë oor die volle proeftydperk.

Tabel 4.12

Resultate van triptofaanbepalings uitgevoer op sekere rumenfraksies. Waardes word in mmol uitgedruk asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is.

Monster	Triptofaan (% van totale aminosure)	Triptofaan (mmol)
<u>Heelmonster</u>		
3	0,046	0,160
7	0,089	0,388
11	0,057	0,218
15	0,112	0,318
17	0,000	0,000
<u>Protosoë</u>		
3	0,117	0,009
5	0,682	0,050
7	0,125	0,012
9	0,163	0,014
11	0,137	0,016
13	0,134	0,013
15	0,131	0,009
17	0,175	0,007
<u>Bakterieë</u>		
11	0,245	0,044
15	0,186	0,043
17	0,224	0,052
<u>Perskoek</u>		
3	0,031	0,103
7	0,075	0,209
11	0,025	0,086
15	0,064	0,175
17	0,000	0,000

word. Hierdie resultate word ook in tabel 7.4 (byvoegsels) getoon. Hierdeur word voorsiening gemaak vir hoeveelheidsverskille van die onderskeie fraksies oor die seisoen. Hierdie waardes varieer minder as die totale waardes in elke monster en toon duideliker neigings. Dit toon byvoorbeeld dat rantsoenkwaliteit 'n duidelike effek op die verskillende fraksies het. Protosoë en bakterieë bevat, soos in figuur 4.2 gesien kan word, aansienlik meer stikstof per gram droë materiaal as die heelmonster en perskoekfraksies.

Vanuit die totale mmol aminosure in die verskillende fraksies is die totale mg aminosuurstikstof bereken. Die aantal stikstofatome in elke aminosuur is in aanmerking geneem tydens hierdie omrekening. Hierdie berekening is gedoen ten einde aminosuur-N met die ander stikstofwaardes te kan vergelyk. Dié resultate is reeds onder die hoof waar die ander stikstofwaardes bespreek is in aanmerking geneem. 'n Grafiese voorstelling word in figuur 4.2 aangetoon. Hieruit kan gesien word dat soortgelyke waarnemings ten opsigte van afnames en toenames oor die seisoene gemaak kan word. Die waardes van aminosuurstikstof lê ook op 'n laer vlak as die organiese-N-waardes. Aansienlike nie-proteïenstikstof soos  $\text{NH}_3$ , heterosikliese verbindings (soos by nukleïensure), kofaktore, vitamïnes, ensomeer word in die rumen aangetref.

Ten einde variasie van individuele aminosure binne fraksies vas te stel is die persentasiesamestelling van alle fraksies bereken. Resultate vir heelmonster, perskoek, protosoë en bakterieë word in tabelle 4.13; 4.14; 4.15 en 4.16 aangedui. In figuur 4.5 word van die resultate vir heelmonster en protosoë ook getoon. In die figure kan gesien word hoe konstant die persentasiesamestelling van hierdie fraksies

Tabel 4.13

Persentasiesamestelling van die individuele aminosure in heelmonster oor die volle proeftydperk. Waardes is die gemiddeld van duplikaatbepalings.

Aminosuur	Persentasiesamestelling van individuele aminosure in heelmonster met die nommers soos aangedui																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Lys	5,18	6,28	5,81	7,36	6,78	7,05	6,79	6,68	6,47	7,11	7,20	6,98	7,11	6,92	6,70	6,38	7,14	6,75
His	1,38	1,45	1,42	1,70	1,41	1,61	1,53	1,56	1,57	1,59	1,63	1,55	1,58	1,71	1,59	1,61	1,90	1,77
Arg	3,02	3,19	3,31	3,77	3,25	3,33	2,98	3,07	3,25	2,93	2,79	2,84	2,81	3,10	3,05	3,21	3,03	3,00
Asp	12,08	11,90	11,66	11,45	11,91	11,70	11,99	11,77	11,78	12,50	12,97	12,38	12,28	12,44	12,02	11,49	12,18	11,82
Thr	6,82	6,40	6,39	6,45	6,46	6,23	6,56	6,43	6,58	6,76	6,58	6,67	6,77	6,76	6,59	6,58	6,25	6,58
Ser	7,10	6,67	6,56	6,75	6,39	6,36	7,01	6,67	7,29	7,07	6,78	7,03	6,65	6,35	6,61	6,79	5,42	6,88
Glu	11,68	10,96	11,45	11,11	11,43	11,54	11,92	11,82	11,96	11,76	11,62	11,92	11,85	11,56	10,82	11,53	11,26	11,80
Pro	4,33	4,60	5,74	4,57	4,54	4,62	4,18	4,47	4,50	4,82	4,81	4,89	5,00	4,89	4,84	4,57	4,57	4,74
Gly	10,04	9,79	9,37	9,47	9,46	9,33	9,37	9,44	9,73	9,68	9,49	10,24	10,13	9,72	9,81	9,50	9,70	9,67
Ala	10,43	10,22	9,79	9,87	10,15	9,81	10,26	9,95	10,08	9,86	9,72	9,86	10,42	9,80	10,14	9,95	10,49	10,30
Val	6,62	7,14	6,82	6,54	6,79	6,58	6,20	6,36	6,36	6,16	6,48	6,28	6,16	6,62	6,72	6,61	6,59	6,23
Met	,99	,50	,84	,55	1,06	,95	1,54	1,36	1,27	1,01	1,49	,81	1,52	,91	1,50	1,49	1,05	1,18
Ile	5,23	5,52	5,59	5,49	5,57	5,66	5,13	5,47	4,92	5,26	5,31	5,19	4,26	5,40	5,47	5,42	5,37	4,94
Leu	8,43	8,32	8,18	7,85	8,43	8,64	8,25	8,35	8,18	8,00	8,10	7,85	7,71	8,01	8,14	8,48	8,58	8,36
Tyr	2,33	2,59	2,86	2,84	2,36	2,38	2,15	2,43	2,25	1,55	1,51	1,69	1,91	1,87	2,21	2,26	2,18	1,89
Phe	4,36	4,47	4,22	4,25	4,32	4,22	4,16	4,18	3,82	3,96	4,32	3,82	3,85	3,96	3,81	4,14	4,31	4,10

Tabel 4.14

Persentasiesamestelling van die individuele aminosure in perskoek  
oor die volle proef tydperk.

Aminosuur	Persentasiesamestelling van individuele aminosure in perskoek met die nommers soos aangedui.																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Lys	5,90	6,55	6,71	8,14	6,80	6,58	7,14	7,02	6,60	7,71	6,81	7,32	7,81	6,81	6,67	6,16	6,55	6,80
His	1,47	1,55	1,53	1,77	1,72	1,79	1,86	1,60	1,63	1,65	1,44	1,56	1,69	1,59	1,56	1,97	1,70	1,66
Arg	3,16	3,39	3,43	3,69	3,13	3,14	3,09	3,10	3,38	2,77	2,55	2,47	2,62	2,89	3,35	2,91	2,91	2,69
Asp	11,06	11,25	11,06	11,51	11,13	11,56	11,74	11,47	11,53	11,14	12,12	14,94	12,29	12,11	11,77	11,33	12,34	11,90
Thr	6,03	5,88	6,24	6,03	6,31	6,29	6,42	6,26	6,40	6,61	6,54	6,48	6,61	6,77	6,65	6,38	6,46	6,53
Ser	6,16	6,25	6,95	6,04	6,50	6,83	6,61	6,89	7,09	7,52	7,36	6,97	6,55	7,42	7,80	6,96	6,52	6,60
Glu	11,21	11,05	11,46	10,91	11,72	11,86	11,68	11,70	11,48	11,57	11,18	11,34	11,61	11,70	10,76	11,58	11,54	11,82
Pro	4,91	4,79	5,00	4,61	5,07	5,26	4,98	4,33	4,27	7,18	5,44	5,17	4,94	5,18	4,99	4,71	4,87	5,00
Gly	9,97	9,95	9,63	9,74	9,83	9,45	9,67	9,52	10,06	9,44	11,56	9,48	9,85	9,72	10,94	9,90	10,00	10,11
Ala	10,52	9,77	9,85	10,13	10,17	9,72	9,70	9,91	9,66	9,30	9,67	9,30	9,61	9,44	9,77	10,14	10,40	10,33
Val	7,00	6,97	6,65	6,63	6,43	6,18	6,52	6,56	6,86	5,88	6,45	5,99	6,18	6,44	6,66	6,61	6,34	6,29
Met	,81	,76	,39	,59	,92	,79	,20	,77	,91	,50	,00	,65	,99	,62	,65	1,02	,31	,99
Ile	5,66	5,89	5,59	5,37	5,36	5,33	5,34	5,67	5,43	5,04	5,31	5,00	5,35	5,24	5,27	5,41	5,01	4,95
Leu	8,76	8,79	8,55	8,11	8,65	8,93	8,64	8,63	8,88	8,24	8,20	8,02	8,44	8,18	8,16	8,87	8,61	8,80
Tyr	2,75	2,68	2,61	2,63	1,91	1,95	2,12	2,25	1,96	1,34	1,30	1,32	1,30	1,67	1,89	1,83	1,98	1,32
Phe	4,64	4,48	4,36	4,10	4,38	4,34	4,35	4,31	3,86	4,12	4,07	4,02	4,17	4,22	4,02	4,23	4,46	4,21



Tabel 4.15

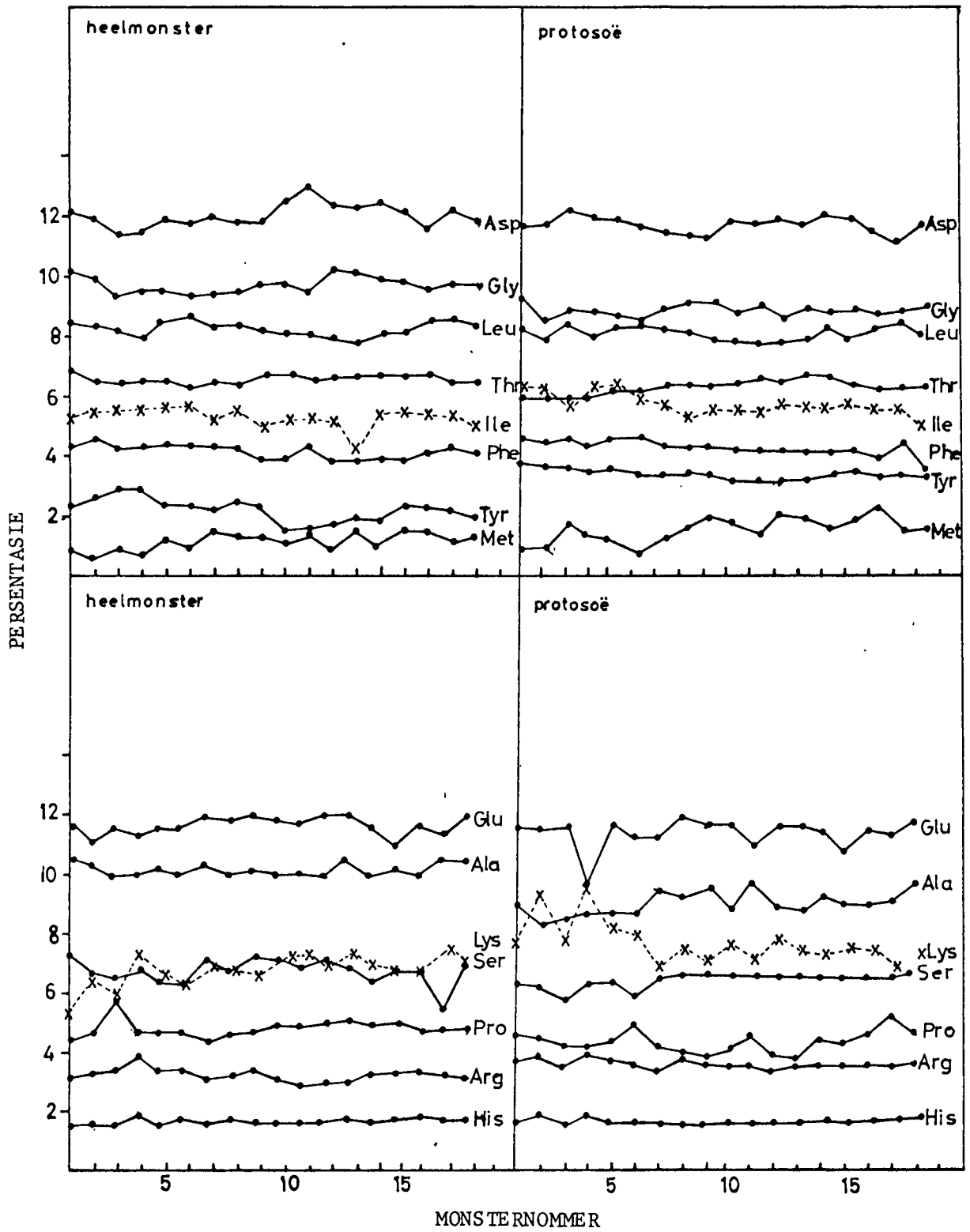
Persentasiesamestelling van die individuele aminosure in protosoë oor die volle proeftydperk. Waardes is die gemiddeld van duplikaatbepalings.

Aminosuur	Persentasiesamestelling van individuele aminosure in protosoë met die nommers soos aangedui																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Lys	7,48	9,31	7,74	9,47	8,15	7,84	6,71	7,40	7,00	7,59	7,07	7,83	7,41	7,39	7,35	7,35	6,84	7,16
His	1,68	1,89	1,47	1,88	1,57	1,58	1,52	1,54	1,47	1,59	1,55	1,60	1,59	1,76	1,58	1,72	1,74	1,78
Arg	3,68	3,96	3,42	4,07	3,64	3,58	3,34	3,95	3,60	3,46	3,45	3,33	3,45	3,49	3,47	3,55	3,48	3,59
Asp	11,61	11,69	12,15	11,98	11,85	11,58	11,40	11,38	11,33	11,86	11,73	11,98	11,66	12,01	11,84	11,45	11,11	11,82
Thr	5,95	5,95	5,91	5,95	6,09	6,01	6,27	6,26	6,53	6,45	6,49	6,46	6,72	6,58	6,28	6,19	6,31	6,31
Ser	6,30	6,09	5,73	6,02	6,31	5,91	6,42	6,74	6,70	6,67	6,65	6,54	6,64	6,52	6,69	6,63	6,54	6,73
Glu	11,43	11,40	11,50	9,69	11,67	11,18	11,12	11,93	11,73	11,63	10,99	11,51	11,61	11,41	10,97	11,57	11,35	11,77
Pro	4,55	4,45	4,20	4,10	4,36	4,93	4,12	3,65	3,94	5,14	4,60	3,98	3,89	4,30	4,38	4,57	5,16	4,57
Gly	9,13	8,52	8,83	8,90	8,66	8,58	8,85	9,05	9,08	8,67	9,01	8,59	8,94	8,86	8,95	8,72	8,90	9,05
Ala	8,85	8,21	8,37	8,65	8,50	8,47	9,43	9,30	9,58	8,68	9,69	8,94	8,79	9,16	8,98	8,96	9,14	9,65
Val	6,22	6,10	6,35	6,31	6,20	6,41	6,28	5,75	6,27	5,92	6,29	5,95	6,23	6,27	6,39	5,77	5,98	5,73
Met	,80	,91	1,69	1,34	,69	1,29	2,90	1,94	1,83	1,66	2,00	1,97	1,86	1,69	1,80	2,29	1,72	1,88
Ile	5,81	5,79	6,19	6,04	6,03	6,12	5,70	5,34	5,55	5,55	5,41	5,86	5,69	5,60	5,73	5,61	5,40	4,98
Leu	8,26	7,91	8,41	7,97	8,36	8,54	8,25	8,10	7,99	7,92	7,88	7,88	7,95	8,21	7,96	8,38	8,50	8,06
Tyr	3,78	3,49	3,57	3,42	3,49	3,38	3,39	3,49	3,39	3,06	3,06	3,08	3,13	3,29	3,50	3,32	3,43	3,28
Phe	4,50	4,35	4,48	4,23	4,45	4,61	4,31	4,20	4,22	4,17	4,18	4,04	4,06	4,17	4,14	3,94	4,41	3,64

Tabel 4.16

Persentasiesamestelling van die individuele aminosure in bakterieë vanaf monster 9.

Aminosuur	Persentasiesamestelling van individuele aminosure in bakterieë met die nommers soos aangedui.									
	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Lys	6,76	6,39	6,42	6,73	6,82	6,40	6,55	6,38	6,93	6,38
His	1,57	1,49	1,49	1,60	1,70	1,61	1,53	1,59	1,86	1,47
Arg	3,44	3,19	3,23	3,29	3,30	3,23	3,00	3,28	3,29	3,26
Asp	11,78	11,88	12,19	11,87	11,72	11,60	11,77	11,67	11,59	11,93
Thr	6,67	6,89	6,87	6,76	6,77	6,97	6,62	6,75	6,25	6,76
Ser	6,22	6,68	6,11	6,28	6,09	6,05	6,27	6,24	6,16	6,65
Glu	10,99	11,24	10,77	11,01	10,89	10,93	10,37	10,52	11,07	11,49
Pro	2,65	5,00	3,65	3,88	3,71	3,76	3,80	3,64	3,71	3,58
Gly	9,52	9,02	9,35	9,10	9,36	9,31	9,64	9,36	9,29	9,26
Ala	11,16	10,26	10,70	10,46	10,70	10,93	11,07	10,75	10,62	10,85
Val	6,77	6,07	6,56	6,49	6,81	6,75	6,71	6,67	6,49	5,78
Met	2,36	2,34	1,92	2,34	1,84	2,04	2,03	2,34	1,92	2,14
Ile	5,49	5,09	5,23	5,40	5,63	5,55	5,64	5,50	5,29	4,55
Leu	7,44	7,23	7,68	7,38	7,54	7,65	7,36	7,96	7,72	7,51
Tyr	3,38	3,46	3,50	3,46	3,25	3,53	3,55	3,41	3,62	3,59
Phe	3,82	3,78	4,34	3,72	3,85	3,71	3,84	3,95	3,91	3,86



Figuur 4.5

Grafiese voorstelling van persentasiesamestelling van heelmonster en protosoë oor die volle proeftydperk.

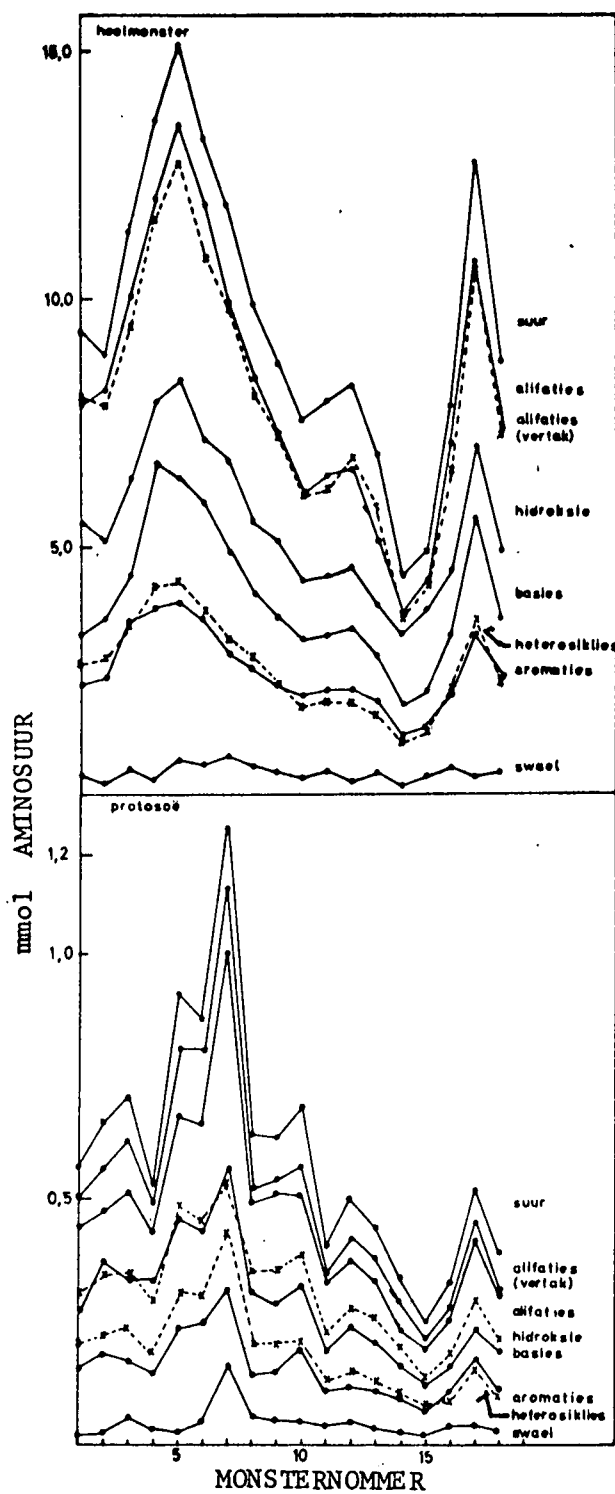
deur die jaar was. Resultate van die ander fraksies, nie grafies voorgestel nie, toon dieselfde neiging. 'n Verdere bewys van hierdie konstante waardes is die resultate in die byvoegsels, tabelle 7.5; 7.6; 7.7 en 7.8 waar gemiddeldes, standaardafwykings, koëffisiënte van variasie en betroubaarheidsintervalle van elke aminosuur in die verskillende rumenfraksies aangedui word. Hoë koëffisiënte van variasie word vir metionien verkry. Dit vergelyk met die waardes van Meyer et al. (1967) wat ontledings op bakterieë en protosoë van skape op verskillende rantsoene gehou, rapporteer. Meyer et al. (1967) het egter die protosoönmonster verkry deur inkubering in 'n skeitregter by 40° C vir 1 uur. Die groot variasie van metionien en sisteïen kan toegeskryf word aan die lae konsentrasie van die swaelbevattende aminosure in die rumen. Hierdie lae konsentrasies bemoeilik akkurate bepaling van hierdie aminosure. Die sisteïenkonsentrasies is byvoorbeeld so laag in die verskillende monsters, slegs spoorhoeveelhede word aangetref, dat dit nie akkuraat bepaal kan word nie.

Reeds in 1952 het Lofgreen et al. vasgestel dat swael geweldig vinnig uit die rumen opgeneem word. Soos later aangetoon is, het ander navorsers ook baie lae konsentrasies van die swaelbevattende aminosure aangetref. Dit is in ooreenstemming met hierdie werk. Aanvanklik is wel gepoog om totale swael in die fraksies turbidimetries te bepaal dog feitlik geen swael kon waargeneem word nie. Swaelbevattende aminosure is verder ook in baie lae konsentrasies in rantsoene teenwoordig. Beide protosoë en bakterieë vertoon wel effens hoër konsentrasies van die aminosure as die rantsoen, dog nog steeds baie lae waardes. Skynbaar vervul die swaelbevattende aminosure nie so 'n belangrike rol in die rumen nie, waarskynlik omdat die dier self hierdie aminosure sin-

tetiseer vir sy behoeftes. Om die rede word sisteën ook uit die bespreking weggelaat.

Aminosure in die verskillende fraksies is in 8 groepe ingedeel ten opsigte van sykettingeïenskappe, naamlik suur-, basiese-, alifatiese-, vertakte alifatiese-, aromatiese-, heterosikliese-, hidroksi-, en swaelbevattende aminosure. Die resultate word in die byvoegsels in tabelle 7.9; 7.10; 7.11 en 7.12 aangegee. Om die relatiewe konsentrasievlakke van die verskillende groepe aminosure te toon word die waardes vir heelmonster en protosoë in figuur 4.6 voorgestel. Die ander fraksies toon by enkele uitsonderings soortgelyke resultate.

'n Opvallende aspek van hierdie grafiese voorstelling is die hoë konsentrasie suur aminosure. Vertakte alifatiese aminosure kom in feitlik net so 'n hoë konsentrasie as die alifatiese aminosure voor. Die totaal van laasgenoemde twee groepe lewer 'n konsentrasie wat baie hoër is as die van die suur aminosure. 'n Moontlike rede vir die voorkoms van so baie alifatiese aminosure dui op die groot rol wat vertakte- en reguitkettingvetsure in die rumen het. Suur aminosure kom waarskynlik in so 'n hoë konsentrasie in die rumen voor as gevolg van die sentrale rol van Asp en Glu in die metabolisme. Hierdie aminosure kom verder ook in hoë konsentrasies in gras voor. Veral opvallend is die relatief lae konsentrasie van basiese aminosure. Dit is egter hoër as die konsentrasie wat ingeneem word, sodat dit lyk asof die mikroorganismes hierdie aminosure self sintetiseer. Hierdie groep aminosure word in laer konsentrasies as die hidroksi-aminosure Ser en Thr aangetref. Aromatiese- en heterosikliese aminosure kom teen ongeveer gelyke maar lae konsentrasievlakke voor terwyl baie min swaelbe-



Figuur 4.6

Grafiese voorstelling van groepe aminosure, volgens sykettingeienskappe, van heelmonster en protosoë oor die volle proeftydperk.

vattende aminosure aangetref word.

Hoë persentasies suur- en alifatiese aminosure kom in beide die rumen en die rantsoen voor. Basiese aminosure in die rantsoen is egter onvoldoende sodat meer deur mikroörganismes, veral die protosoë gesintetiseer word. Die baie lae vlakke, selfs laer as die vlakke wat in die rantsoen is, waarin die heterosikliese aminosure in die mikroörganismes voorkom, dui daarop dat hierdie aminosure blykbaar ook in genoegsame hoeveelhede voorsien word. Die relatief hoë konsentrasievlakke van die suur aminosure in die rumenfraksies kan heelwaarskynlik verklaar word aan die hand van die belangrike funksie wat die aminosure in die sentrale weë van metabolisme vervul. Hierdie aminosure, albei direk betrokke by onder andere die Krebs-siklus asook aminerings- en deamineringsreaksies, sal dus altyd teen relatief hoë konsentrasievlakke teenwoordig wees.

Ten einde vas te stel hoe suiwer die verkrygte protosoön- en bakteriese preparate is, word vergelykings getref met waardes uit die literatuur soos deur verskillende navorsers verkry. Meyer et al. (1967) het diere op verskillende rantsoene se rumenprotosoë en bakterieë ontleed ten opsigte van persentasie van die onderskeie aminosure teenwoordig. Hiervolgens verskil die persentasiesamestelling tussen protosoë en bakterieë aansienlik. By diere op verskillende rantsoene verskil die protosoë en bakterieë onderling egter baie min. Purser & Buechler (1966) het verskillende bakterieë en ook protosoë vanuit die rumen geïsoleer deur kweking. Hulle vergelyk ook die aminosuursamestelling van protosoë met dié van Hoeller & Harmeyer wat op suiwer kulture van Isotricha en Entodinia gewerk het. Behalwe vir laer waardes ten opsigte van Val, Ile en Leu en 'n baie hoër waarde vir His is die waardes baie

soortgelyk. Die resultate, omgerekend om dit op vergelykende basis met die werk hier gerapporteer te bring, word vir verwysingsdoeleindes in tabel 4.17 aangegee.

Die persentasie lisien soos in hierdie werk verkry is oor die algemeen laer as die waardes gerapporteer maar tog wel vergelykbaar met dié van Isotricha soos deur Hoeller & Harmeyer verkry. Behalwe vir hoër waardes vir Thr, Ser, Ala en Leu soos deur ons verkry, vergelyk hierdie aminosuuranalises goed met dié van Meyer et al. (1967). Oor die algemeen lê die waardes van Purser & Buechler, en wel die vir Lys, His, Arg, Asp, Met, Ile, Tyr en Phe op 'n hoër vlak as die waardes hier verkry. Hoewel die waardes nie identies is nie, is daar tog definitiewe ooreenkomste. Daar moet egter in gedagte gehou word dat rantsoensamestelling ook 'n invloed op die waardes sal hê. Al die protosoönpreparate, behalwe die suiwer kulture, is egter nie noodwendig homogeen nie en afleidings omtrent suiwerheid sal dus moeilik gemaak kan word. Aangesien die waardes egter onderling van dieselfde orde-grootte is kan dit tog met mekaar vergelyk word.

By bakterieë is Thr-, Ser- en Leu se persentasievlakke soos deur ons verkry redelik hoog in vergelyking met waardes deur ander navorsers verkry. Oor die algemeen vergelyk waardes van die verkryde bakteriese fraksie baie goed met dié verkry deur ander navorsers (Tabel 4.17). Slegs Thr, Ser en Leu se waardes lê op 'n hoër vlak. Dieselfde argumente ten opsigte van verskille en ooreenkomste sal ook soos by protosoë ten opsigte van rantsoensamestelling geld.



Tabel 4.17

Aminosuursamestelling van verskillende bakteriese- en protosoönpreparate. Hoeveelhede van individuele aminosure aangedui as 'n persentasie van die totale aminosure in die onderskeie preparate.

Aminosuur	PROTOSOE						BAKTERIE				
	a	b	c	d	e	f	a	d	e	g	f
Lys	7,62	10,94	7,81	8,93	8,74	9,48	6,58	8,14	6,74	8,51	6,87
His	1,64	2,55	3,47	1,81	1,57	1,33	1,59	1,91	1,65	5,28	1,18
Arg	3,58	5,35	3,10	3,62	3,52	3,66	3,25	3,94	3,69	4,51	3,23
Asp	11,69	11,30	14,99	12,03	12,13	12,48	11,80	10,56	11,32	11,21	11,72
Thr	6,25	5,95	5,45	5,56	5,22	5,28	6,73	5,85	5,73	5,28	6,04
Ser	6,43	7,17	6,32	4,40	4,43	5,16	6,27	4,58	4,58	6,06	5,21
Glu	11,36	13,00	15,12	11,00	14,21	12,84	10,93	10,31	12,21	12,50	11,61
Pro	4,38	2,19	4,83	4,14	3,91	4,32	3,74	4,58	3,94	5,93	4,03
Gly	8,85	7,17	6,82	8,67	7,95	8,52	9,33	10,31	9,80	8,76	9,95
Ala	8,96	6,32	5,70	7,50	5,74	7,07	0,08	1,02	1,15	1,16	0,60
Cys	1,00	1,46	2,48	1,04	1,70	0,49	0,08	1,02	1,15	1,16	0,60
Val	6,13	4,86	4,21	5,69	6,00	6,00	6,51	7,13	7,25	4,64	7,11
Met	1,68	1,10	1,61	1,94	1,83	1,19	2,13	2,16	2,42	2,58	1,66
Ile	5,69	5,35	5,45	6,86	6,91	6,72	5,34	6,23	5,98	3,48	5,46
Leu	8,14	7,53	6,94	8,02	8,21	7,68	7,55	7,13	7,38	4,64	7,11
Tyr	3,36	3,28	2,85	3,88	3,13	3,36	3,47	2,93	3,31	3,09	3,43
Phe	4,23	4,50	2,85	4,92	4,82	4,44	3,88	3,94	3,82	3,87	3,80

- a) Resultate soos verkry in die laboratorium,  
 b) Entodinium en c) Isotricha soos aangegee in Meyer et al. (1967)  
 d) Purser & Buechler (1966)  
 e) Mediane waardes van Weller soos aangegee in Meyer et al. (1967)  
 f) Meyer et al. (1967)  
 g) Waardes van Hoeller & Harneyer soos aangegee deur Meyer et al. (1967).

'n Moontlike rede vir verskille wat veral by sekere aminosure aange-tref word, kan wees as gevolg van die tipe rantsoen wat die dier in-neem. Volgens Oltjen (1969) het die toediening van kragvoer hoër konsentrasies Leu, Ile, Phe en Lys in rumenprotosoë tot gevolg. Hier-die verandering in aminosuursamestelling is egter heelwaarskynlik 'n gevolg van 'n populasieverandering. Slegs dié protosoë wat die sub-straat kan benut, sal vermeerder terwyl die ander se getalle verminder.

'n Vergelyking tussen die gemiddelde persentasiesamestelling van die individuele aminosure in die verskillende fraksies kan ook getref word. Hierdie gemiddelde waardes word in tabel 4.18 aangebied. Hieruit blyk dat in die heelmonster en perskoek gelyke persentasies Lys en Ser aangetref word. In perskoek is die waarde van Ala en Thr laer, maar die vlakke van Gly en Ala is hoër as in die heelmonster. In protosoë en bakterieë lê Gly, Val, Thr en Ala, anders as in perskoek op die-selwe persentasievlak as in die heelmonster. Hoër persentasievlakke van Lys en Ile, maar laer vlakke van Val, Ala en Gly as in die ander fraksies word in die protosoë gevind. In die bakteriese fraksie egter is die vlakke van Lys, Phe, Ser, Pro, en Leu laer, maar die van Thr, Ala, Tyr en Met hoër as in die ander fraksies. Beide protosoë en bakterieë het 'n hoër vlak van Arg dog laer vlakke van Asp, Glu, Pro, Gly en Leu as die persentasievlakke van perskoek en heelmonster.

Aminosure soos Lys, His, Arg, Thr, Val, Met, Ile, Leu en Phe is essen-sieel vir die hoër dier. Dit is egter baie moeilik om vas te stel of 'n aminosuur vir 'n herkouer essensieel is of nie. Mikroörganismes in die rumen sintetiseer baie van die essensiële aminosure. Deur die op-name van hierdie organismes word dan aan die herkouer genoegsame hoe-

Tabel 4.18

Gemiddelde persentasiesamestelling van individuele aminosure in die verskillende fraksies wat oor die volle proeftydperk gestrek het. Vir vergelykingsdoeleindes word die persentasiesamestelling van Themeda triandra (rooigras) ook aangetoon.

Aminosuur	Individuele aminosure as % van totale aminosure				
	a	b	c	d	e
Lys	6,69	6,89	7,62	6,58	5,94
His	1,59	1,65	1,64	1,59	1,89
Arg	3,11	3,04	3,58	3,25	3,25
Asp	12,02	11,79	11,69	11,80	10,50
Thr	6,55	6,38	6,25	6,73	5,91
Ser	6,69	6,83	6,43	6,27	6,96
Glu	11,55	11,45	11,36	10,93	11,45
Pro	4,70	5,04	4,38	3,74	6,22
Gly	9,66	9,93	8,85	9,33	10,08
Ala	10,06	9,85	8,96	10,75	10,99
Val	6,51	6,48	6,13	6,51	6,64
Met	1,11	0,66	1,68	2,13	0,55
Ile	5,29	5,35	5,69	5,34	4,52
Leu	8,21	8,53	8,14	7,55	9,33
Tyr	2,18	1,93	3,36	3,47	1,53
Phe	4,13	4,24	4,23	3,88	4,26

a) Heelmonster      b) Perskoek      c) Protooë      d) Bakterieë

e) 'n Monster van Themeda triandra

veelhede van die betrokke aminosure verskaf. Dit lyk egter tog of veral die protosoë 'n belangrike funksie vervul in die voorsiening van veral lisien en isoleusien aan die dier. Bakterieë vervul weer skynbaar 'n belangrike rol in die voorsiening van aminosure soos Thr, Ala, Tyr en Met.

'n Aspek wat egter in gedagte gehou moet word is dat aminosuursamestelling van fraksies nie noodwendig die volle situasie ten opsigte van voorsiening aan die dier opklaar nie. Die relatiewe beskikbaarheid van die mikroörganisme sal ook 'n belangrike rol speel. Veral in dié opsig kan protosoë belangrik wees aangesien die organismes blykbaar makliker deur die herkouer opgeneem kan word. Latere resultate, waar verskillende tipes voer se uitwerking op die rumenfraksies bespreek word, onderskryf tot 'n groter mate die belang van protosoë vir die dier.

Die resultate van hierdie hele studie oor die tydperk van een jaar het wel duidelike moontlikhede en het sekere aspekte na vore laat kom. So is die baie konstante persentasie aminosuursamestelling van die onderskeie fraksies insiggewend. Dit weerspieël tot 'n groot mate die stabiliteit van toestande wat in die rumen heers. Verder het die resultate ook getoon dat soos die kwaliteit van die rantsoen oor die wintermaande afneem, die relatiewe hoeveelhede mikroörganismes ook beïnvloed word. Aminosuurstikstof varieer net soos totale- en organiese stikstof. Verder maak aminosuurstikstof slegs ongeveer 55% van die totale organiese stikstof uit. Daar is dus 'n groot persentasie organiese-N in 'n ander vorm as aminosure.

#### 4.4 VERGELYKENDE STUDIES VAN SKAPE OP VERSKILLENDE RANTSOENE

'n Volledige bespreking van die konsentrasie en persentasievlakke van totale -N, aminosuur -N en individuele aminosure van die skape op die veld is reeds aangebied. Die groep skape in hierdie genoemde proef was egter op 'n lae kwaliteitsrantsoen. Normaalweg sou die diere byvoeding ontvang sodat hulle in die winter in 'n beter kondisie sou bly. Om hierdie navorsing dus aan te vul is die rumenfraksies van skape op ander rantsoene wat 6, 9, 12 en 15% ruproteïen bevat het, ook ondersoek. Die samestelling van die rantsoene word in tabel 4.19 en die aminosuursamestelling in tabel 4.20 aangedui. Dieselfde fraksioneringsprosedure as in die vorige gevalle is op hierdie monsters uitgevoer. In tabel 4.21 word die bepaalde stikstofinhoud van die verskillende rantsoene en ander fraksies aangedui. Die resultate van aminosuuranalises gedoen op gras en die vier rantsoene, asook die onderskeie heelmonster-, perskoek-, protosoön- en bakteriese fraksies word as konsentrasie ( $\mu\text{mol}$  aminosuur /  $\text{dm}^3$  rumenvloeistof begin) en persentasie in tabelle 4.22; 4.23; 4.24 en 4.25 getoon.

Soos die hoeveelheid ruproteïen in die rantsoene toegeneem het, is 'n toename in die aantal mikroörganismes in die rumen waargeneem. 'n Baie interessante aspek is dat hierdie diere 'n groter massa protosoë as bakterieë vertoon het. Bakteriese massa (g) is ongeveer die helfte van dié verkry vir protosoë. By diere wat op die veld sonder byvoeding gehou is, was die hoeveelheid protosoë (g) minder as die helfte van die hoeveelheid bakterieë. Hieruit lyk dit dus asof bakterieë 'n groter rol vervul in die metabolisering van veselmateriaal. Individuele aminosuurskoneentrasies in die verskillende rumenfraksies het tesame met die

Tabel 4.19

Persentasiesamestelling van rantsoene wat aan skape verskaf is.

Bestanddeel	% in rantsoen			
	R1	R2	R3	R4
	6%	9%	12%	15%
Lusern	-	17	20	23
Mieliestronke	39	22	20	16,5
Mieliemeel	50	50	42,5	34
Melassemeel	10	10	10	10
Dikalsium	0,6	0,5	-	-
H.P.K*	-	-	7,0	16
Sout	0,5	0,5	0,5	0,5

\* hoë proteïenkonsentraat

Tabel 4.20

Aminosuursamestelling van ruproteïenrantsone en Themeda triandra (rooigras) uitgedruk as mmol/g droë massa, asook % samestelling.

	Aminosuurkonsentrasie in aangeduide monster (mmol/g droë massa)					Aminosure as % van totale aminosure in die aangeduide monster				
	a	b	c	d	e	a	b	c	d	e
Aminosuur	AMINOSUURKONSENTRASIE (mmol)					AMINOSURE AS PERSENTASIE VAN TOTAAL				
Lys	0,017	0,008	0,014	0,020	0,023	5,94	2,64	3,58	4,14	3,43
His	0,005	0,007	0,009	0,011	0,015	1,89	2,44	2,14	2,20	2,30
Arg	0,009	0,007	0,012	0,016	0,025	3,25	2,30	2,92	3,28	3,75
Asp	0,030	0,027	0,041	0,052	0,073	10,50	9,07	10,30	10,70	10,88
Thr	0,017	0,013	0,020	0,023	0,032	5,91	4,37	4,94	4,71	4,81
Ser	0,020	0,017	0,026	0,026	0,038	6,96	5,45	6,58	5,39	5,72
Glu	0,032	0,044	0,059	0,072	0,102	11,45	14,40	14,82	14,97	15,23
Pro	0,018	0,032	0,037	0,041	0,053	6,22	10,42	9,31	8,51	7,96
Gly	0,028	0,022	0,032	0,044	0,066	10,08	7,23	8,01	9,20	9,83
Ala	0,031	0,038	0,041	0,050	0,066	10,99	12,46	10,35	10,42	9,88
Cys	0,000	0,003	0,004	0,004	0,007	0,00	1,05	1,11	0,90	1,05
Val	0,019	0,017	0,023	0,028	0,040	6,64	5,52	5,68	5,82	5,94
Met	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,55	0,56	0,61	0,47	0,49
Ile	0,013	0,011	0,015	0,019	0,027	4,52	3,56	3,67	3,94	4,06
Leu	0,026	0,041	0,043	0,050	0,064	9,33	13,53	10,66	10,39	9,54
Tyr	0,004	0,003	0,006	0,005	0,008	1,53	0,97	1,50	1,06	1,20
Phe	0,012	0,012	0,015	0,019	0,026	4,26	4,02	3,82	3,93	3,93
Totaal	0,282	0,302	0,400	0,481	0,670					

- a) Themeda triandra,  
 b) Rantsoen 1 bevattende 6% ruproteïen,  
 c) Rantsoen 2 bevattende 9% ruproteïen,  
 d) Rantsoen 3 bevattende 12% ruproteïen,  
 e) Rantsoen 4 bevattende 15% ruproteïen.

Tabel 4.21

Resultate van fraksioneringsprosedure van rumenmonsters vanaf skape op  
ruproteïenrantsoene

Monster en eenheid bepaal	Rantsoene asook hoeveelhede in cm <sup>3</sup> , g of mg soos aangedui (% ruproteïen)			
	6%	9%	12%	15%
<u>Volume heelmonster</u>				
<u>getrek (cm<sup>3</sup>)</u>	550	570	740	550
<u>Massa na vries<sup>m</sup></u>				
<u>droging (g)</u>				
Heelmonster	50,0	58,0	64,0	62,0
Perskoek	34,5	44,0	22,7	40,0
Protosoë	3,12	1,75	3,63	10,42
Bakterieë	1,52	2,23	1,75	4,04
<u>Totale N (mg)</u>				
Rantsoen (mg N/g)	7,9	11,1	13,3	17,6
Heelmonster	954,5	839,8	1203,8	1395,0
Perskoek	492,4	730,9	326,5	810,2
Protosoë	203,6	144,9	258,2	520,0
Bakterieë	19,6	13,3	20,5	41,5
<u>Ammoniak -N (mg)</u>				
Rantsoen (mg N/g)	0,2	0,4	0,5	0,7
Heelmonster	150,3	130,3	162,9	258,4
Perskoek	92,9	109,7	48,8	114,2
Protosoë	28,0	13,5	35,0	127,3
Bakterieë	7,6	0,0	7,6	2,9



Tabel 4.22

Resultate van aminosuurontledings uitgevoer op heelmonsters van skape wat op verskillende rantsoene aangehou is. Waardes word aangegee asof met  $1 \text{ dm}^3$  heelmonster begin is.

	RANTSOEN*				RANTSOEN*			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Aminosuur	AMINOSUURKONSENTRASIE (mmol)				AMINOSURE AS PERSENTASIE VAN TOTAAL			
Lys	2,058	1,781	3,400	4,465	8,20	8,12	8,18	10,23
His	0,394	0,307	0,677	0,678	1,57	1,40	1,63	1,55
Arg	0,728	0,590	0,966	1,187	2,90	2,69	2,32	2,72
Asp	3,195	2,398	5,208	5,634	12,73	10,93	12,52	12,91
Thr	1,730	1,303	2,611	2,623	6,89	5,94	6,28	6,01
Ser	1,789	1,456	2,607	2,682	7,13	6,63	6,27	6,14
Glu	3,758	2,941	5,423	5,544	14,97	13,40	13,40	12,70
Pro	1,414	1,280	2,203	2,128	5,63	5,83	5,30	4,87
Gly	2,347	1,862	3,539	3,476	9,35	8,49	8,51	7,96
Ala	2,463	2,056	3,632	3,484	9,82	9,37	8,73	7,98
Val	1,618	1,309	2,370	2,410	6,45	5,97	5,70	5,52
Met	0,154	0,110	0,412	0,315	0,61	0,50	0,99	0,72
Ile	1,491	1,186	2,315	2,574	5,94	5,41	5,57	5,90
Leu	2,640	1,990	3,545	3,687	10,52	9,07	8,52	8,45
Tyr	0,545	0,443	0,977	0,919	2,17	2,02	2,35	2,11
Phe	1,147	0,933	1,713	1,850	4,57	4,25	4,12	4,24
Totaal	25,096	21,944	41,597	43,656				

- \* R1) Rantsoen 1 bevattende 6% ruproteïen  
 R2) Rantsoen 2 bevattende 9% ruproteïen  
 R3) Rantsoen 3 bevattende 12% ruproteïen  
 R4) Rantsoen 4 bevattende 15% ruproteïen

Tabel 4.23

Resultate van aminosuorontledings uitgevoer op perskoeke van skape wat op verskillende rantsoene aangehou is. Waardes word aangegee asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is.

Aminosuur	RANTSOEN*				RANTSOEN*			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
	AMINOSUURKONSENTRAAT (mmol)				AMINOSURE AS PERSENTASIE VAN TOTAAL			
Lys	0,443	0,696	0,747	0,858	5,33	5,67	9,87	6,01
Hla	0,143	0,128	0,171	0,220	1,72	1,04	2,26	1,54
Arg	0,182	0,291	0,109	0,337	2,19	2,37	1,44	2,36
Asp	0,796	1,287	0,799	1,546	9,58	10,48	10,56	10,83
Thr	0,450	0,702	0,448	0,872	5,42	5,71	5,92	6,11
Ser	0,519	0,804	0,507	1,013	6,25	6,55	6,70	7,10
Glu	1,229	1,654	0,966	1,854	14,78	13,47	12,77	12,99
Pro	0,685	0,908	0,430	0,855	8,24	7,40	5,69	5,99
Gly	0,690	1,093	0,691	1,379	8,30	8,90	9,14	9,66
Ala	0,895	1,355	0,808	1,486	10,76	11,04	10,68	10,41
Val	0,498	0,774	0,413	0,920	5,99	6,30	5,46	6,45
Met	0,032	0,067	0,097	0,083	0,38	0,54	0,50	0,58
Ile	0,407	0,628	0,388	0,757	4,89	5,12	5,13	5,31
Leu	0,893	1,187	0,690	1,316	10,74	9,66	9,12	9,22
Tyr	0,112	0,227	0,102	0,197	1,34	1,85	1,35	1,38
Phe	0,341	0,480	0,296	0,579	4,10	3,91	3,91	4,01
Totaal	8,316	12,279	7,565	14,272				

\* Sien tabel 4.22

Tabel 4.24

Resultate van aminosuorontledings uitgevoer op protosoë van skape wat op verskillende rantsoene aangehou is. Waardes word aangegee asof met  $1 \text{ dm}^3$  heelmonster begin is.

	RANTSOEN <sup>d</sup>				RANTSOEN <sup>e</sup>			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Aminosuur	AMINOSUURKONSENTRASIE (mmol)				AMINOSURE AS PERSENTASIE VAN TOTAAL			
Lys	0,493	0,320	0,635	2,510	9,27**	9,43**	8,86	9,30**
Hie	0,083	0,053	0,101	0,389	1,56	1,57	1,41	1,44**
Arg	0,170	0,102	0,210	0,814	3,19	3,01**	2,93*	3,02**
Asp	0,605	0,417	0,915	3,515	11,36	12,29*	12,76*	13,02*
Thr	0,321	0,196	0,435	1,584	6,03	5,78	6,06	5,87
Ser	0,321	0,213	0,463	1,678	6,04	6,29	6,46	6,22
Glu	0,706	0,456	0,980	3,637	13,28*	13,44*	13,67*	13,47*
Pro	0,237	0,146	0,316	1,180	4,46	4,29	4,40	4,37
Gly	0,418	0,256	0,559	1,944	7,85*	7,56*	7,80*	7,20*
Ala	0,433	0,234	0,538	1,740	8,14	6,91*	7,51*	6,44*
Cys	0,020	0,020	0,020	0,020	0,10	0,10	0,10	0,10
Val	0,292	0,178	0,386	1,384	5,48*	5,25*	5,39*	5,13*
Met	0,103	0,067	0,104	0,560	1,94	1,99	1,45	2,07
Ile	0,320	0,206	0,439	1,698	6,02	6,07	6,12	6,29
Leu	0,421	0,275	0,535	2,132	7,91	8,09	7,46**	7,90
Tyr	0,176	0,130	0,248	1,062	3,31	3,83**	3,46	3,93**
Phe	0,223	0,143	0,307	1,173	4,20	4,22	4,28	4,34
Totaal	5,321	3,394	7,171	26,998				

<sup>d</sup> Sien tabel 4.22

\*  $p < 0,01$

\*\*  $p < 0,02$

Tabel 4.25

Resultate van aminosuurontledings uitgevoer op bakterieë van skape wat op verskillende rantsoene aangehou is. Waardes word aangegee asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is.

	RANTSOEN*				RANTSOEN*			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
Aminosuur	AMINOSUURKONSENTRASIE (mmol)				AMINOSURE AS PERSENTASIE VAN TOTAAL			
Lys	0,108	0,155	0,146	0,320	5,92	6,30	6,38	6,95
His	0,025	0,036	0,030	0,075	1,39	1,46	1,31	1,64
Arg	0,052	0,079	0,070	0,148	2,85	3,21	3,05	3,22
Asp	0,216	0,287	0,269	0,514	11,80	11,71	11,75	11,16
Thr	0,129	0,160	0,140	0,284	7,07	6,53	6,09	6,16
Ser	0,122	0,165	0,152	0,301	6,65	6,75	6,63	6,53
Glu	0,223	0,268	0,241	0,470	12,20	10,93	10,50	10,22
Pro	0,076	0,096	0,088	0,184	4,14	3,93	3,86	4,00
Gly	0,174	0,226	0,208	0,450	9,53	9,20	9,09	9,78
Ala	0,196	0,246	0,224	0,448	10,69	10,04	9,80	9,73
Cys	0,020	0,038	0,008	0,008	1,09	1,55	0,08	0,08
Val	0,079	0,152	0,137	0,285	4,34	6,18	5,96	6,19
Met	0,037	0,044	0,052	0,079	2,05	1,79	2,26	1,71
Ile	0,093	0,123	0,155	0,254	5,10	5,03	6,78	5,53
Leu	0,139	0,185	0,214	0,391	7,60	7,56	9,34	8,50
Tyr	0,066	0,087	0,075	0,180	3,62	3,54	3,27	3,92
Phe	0,073	0,105	0,090	0,219	3,97	4,28	3,93	4,76
Totaal	1,829	2,452	2,292	4,600				

\* Sien tabel 4.22

persentasie ruproteïen in die rantsoen toegeneem.

As die persentasiesamestelling van aminosure in die heelmonster beskou word ten opsigte van die ooreenstemmende aminosure in die rantsoen, kan sekere algemene waarnemings oor toenames en afnames van aminosure in die rumen gemaak word. Deur dus analises op die rantsoen en heelmonster uit te voer kan afleidings in verband met sekere aminosure wat miskien in te hoë of te lae konsentrasies in die rantsoen teenwoordig is, gemaak word. Sekere aminosure, byvoorbeeld His, Gly, Ala, Val en Leu is in al die rumenfraksies laer as die persentasies wat in die rantsoene aangetref word. Al die ander aminosure was hoër in die heelmonster wat slegs verklaar kan word aan die hand van aminosuurbiosintese deur mikroörganismes. In die gevalle waar die relatiewe aminosuurkonsentrasie afneem, kan aangeneem word dat sodanige aminosure in groot genoeg hoeveelhede in die rantsoen ingeneem word. By aminosure soos Glu, Pro, Ala, Gly en Val word byvoorbeeld in die heelmonster 'n afname in die persentasie verkry hoe hoër die hoeveelheid ruproteïen in die rantsoen is.

Deur die verskillende fraksies, naamlik protosoë en bakterieë te beskou kan vasgestel word watter betekenisvolle rol hierdie organismes by die vorming van sekere aminosure het. Op hierdie manier is waargeneem dat protosoë persentasiegewys tot 3,5 keer die hoeveelheid Lys het as wat in die rantsoen teenwoordig is. Hierteenoor bevat bakterieë slegs 2,2 keer soveel. Net so vorm protosoë persentasiegewys 1,7 keer meer Ile terwyl die persentasie in bakterieë laer is as dié in die rantsoen. Die persentasie Leu is in beide protosoë en bakterieë 0,8 keer die van die oorspronklike hoeveelheid in die rantsoen.

Protoesoë se belangrikste bydrae kan dus lê in die voorsiening van Lys en Ile aan die dier. Albei hierdie aminosure is essensieel vir die hoër dier. Hierdie twee aminosure kom in baie hoër persentasies voor, hoewel ander aminosure soos Asp, Thr, Ser, Met, Tyr en Phe ook teen hoër persentasievlakke as in dié rantsoen aangetref word. Indien 'n aminosuur in groter hoeveelhede as wat die mikroörganismes benodig, teenwoordig is, word dit blykbaar in die rumen afgebreek. So is in protoesoë laer persentasievlakke van His, Arg, Glu, Pro, Gly, Ala, Val en Leu as in die oorspronklike rantsoen wat ingeneem is. Opvallend is dat veral die heterosikliese aminosure, naamlik Pro en His se persentasievlakke in die rumen gewoonlik baie laag is.

By bakterieë kom hoër persentasievlakke van Thr, Tyr en Met voor. Ander aminosure waarvan die vlakke ietwat hoër is as dié in die rantsoen, is Asp, Ser en Met terwyl His en Pro baie laer en Glu, Gly, Ala, Val en Leu net effens laer as die rantsoenvlakke is. Arg en Phe vlakke het feitlik onveranderd gebly.

In die proef waar skape net op die veld gehou is en waar dus baie veselmateriaal ingeneem is, het bakterieë blykbaar 'n groter rol by die metabolismisering van hierdie substraat. So bevat bakterieë tussen 20 en 30% en protoesoë tussen 4 en 10% van die aminosure in die rumen onder hierdie omstandighede. In gevalle waar skape egter op ruproteïenrantsoene was, bevat protoesoë tussen 20 en 40% en bakterieë slegs tussen 5 en 10% van die totale aminosure in die rumen. Onder hierdie toestande maak die oplosbare fraksie ongeveer 30% van die totale aminosure uit, terwyl baie min oplosbare aminosure in die rumen van 'n dier wat op die veld was, aangetref word. Hierdie verskynsel kan verklaar word aan die hand van

die lae kwaliteit rantsoen wat die dier inkry. Aminosure in die rumen sal dus of deur die dier opgeneem word, of deur die mikroörganismes gemetaboliseer word. Diere wat beter rantsoene ontvang, het aansienlik meer mikroörganismes in die rumen. Die rantsoen mag dus ook tot gevolg hê dat 'n redelike hoeveelheid aminosure in die vry vorm sal voorkom. Mikroörganismes sal ook tot 'n groter mate deur die dier opgeneem word (Christiansen et al., 1965). Die skape op 'n spesifieke ruproteïenrantsoen bevat massagewys meer protosoë as bakterieë. Aangesien protosoönproteïene en aminosure meer beskikbaar is aan die herkouer omdat protosoë 'n hoër biologiese waarde het (McNaught et al., 1954), kan die voorkoms van meer protosoë dus voordele vir die dier onder hierdie omstandighede inhou. Dit is in ooreenstemming met die melkproduksie resultate soos verkry deur mnr. J.E.J. du Toit (Departement Kleinveekunde). Volgens sy resultate word hoër melkopbrengste verkry hoe meer ruproteïen in die rantsoen is. Soos Meyer et al. (1967) is hier ook vasgestel dat die hoeveelhede mikroörganismes met 'n rantsoen varieer, hoewel die samestelling onderling min of meer dieselfde bly. Skape op hierdie rantsoene bevat baie meer protosoë as bakterieë. Hieruit kan dus gesien word dat protosoë 'n baie belangriker rol vervul in die metabolisering van sekere rantsoene en skynbaar wel veral by ruproteïen bevattende rantsoene.

Statistiese vergelyking van die persentasiesamestelling van die aminosure van protosoë wat op verskillende rantsoene was met dié van skape wat 'n jaar lank net op die veld sonder byvoeding gehou is, is met behulp van 'n formule soos aangegee in Sokal & Rohlf (1969) gedoen. Hiervolgens kan betekenisvolle verskille waargeneem word vir Lys en Tyr (\*\*P < 0,02); Arg, Asp, Glu, Gly en Ala (\* P < 0,01). Verskille word

al meer opvallend hoe hoër die ruproteïenkonsentrasie in die rantsoen word. Hieruit lyk dit dus asof sekere rantsoene 'n invloed op die aminosuursamestelling van protosoë het. Dit sluit aan by Oltjen (1969) se bevinding dat spesifieke voere, byvoorbeeld kragvoer, hoër konsentrasies van sekere aminosure tot gevolg het soos voorheen bespreek. Afhangende van die rantsoen sal protosoë of bakterieë dus oorheers.

Uit hierdie werk blyk duidelik dat protosoë beslis 'n belangrike rol het by die metabolisering van rantsoene wat ruproteïen bevat. Vir die dier hou hierdie tipe rantsoene wat baie protosoë in die rumen tot gevolg het ook voordele in. Protosoönproteïen en aminosure is meer beskikbaar aan die herkouer omdat protosoë 'n hoër biologiese waarde het. Verder het groot getalle protosoë konstanter toestande in die rumen tot gevolg.

#### 4.5 STUDIES OP HIDROLITIESE ENSIEME

##### 4.5.1 Suiwering van die ensiem

Tydens 'n suiweringsprosedure is 3 g gevriesdroogde protosoë gebruik. Na homogenisering en sentrifugering is 'n oplossing, 86,1 cm<sup>3</sup>, wat 450,0 mg proteïen en 1,4 eenhede ensiem bevat het, verkry. Tydens voorlopige ondersoek is verskillende volumes asetoon en etielalkohol vir fraksionering gebruik. Met asetoon is nie so 'n goeie skeiding as met etanol verkry nie. Proteïene word meer deur asetoon gedenatureer en die proteïenoplossings is ook sterker gekleur. Fraksionerings met (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> is ook ondersoek. Hier is egter 'n baie eienaardige verskynsel waargeneem. Na sentrifugering by 28 000 x g het die "presipitaat" op die bovloeistof gedryf. Geen sedimentering het plaasgevind nie. Fraksionering met etanol het goeie en



herhaalbare resultate gelewer en die metode is deurgaans gebruik. Na die behandeling is 21,9 eenhede ensiem, 20,0 mg proteïen verkry terwyl die ensiem 15,6 keer gesuiwer is om 'n herwins van 68,5% te gee. Resultate van hierdie en die opeenvolgende stappe van die suiweringsprosedure word in tabel 4.26 opgesom.

By pH 6,8 word met 'n lineêre NaCl-gradiënt vanaf 0,2 tot 0,5 M fosfaatbuffer 'n skeidingspatroon met DEAE-sellulose verkry soos in figuur 4.7 aangedui. Twee pieke met aktiwiteit ten opsigte van stysel word verkry. Hierdie bevinding stem ooreen met dié in die literatuur verkry deur Mould & Thomas (1958). Hierdie stap het die ensiem 39,4 keer gesuiwer en 'n herwins van 55,3% gegee. Die volume was 66,0 cm<sup>3</sup> wat 6,4 mg proteïen en 55,1 eenhede ensiem bevat het. Omdat groot verliese deur vriesdroging van die watergedialiseerde ensiem gekry word, is die ensiem teen 0,02 M fosfaatbuffer pH 6,8 gedialiseer voor vriesdroging. Analitiese jelelektroforese op hierdie fraksie gee 'n diffuse breë sone. Na vriesdroging is die ensiem in gedistilleerde water opgelos en gedialiseer teen die buffer wat in die volgende stap gebruik sou word.

In stap 4 is die ensiem op 'n Biogel-P60 kolom geskei met 0,1 M Tris-HCl buffer pH 7,5 wat 0,05 M NaCl bevat. Hierdie skeiding gee 'n asimmetriese piek met stertvorming soos aangedui in figuur 4.8. Die ensiem loop op die front uit en verskyn na ongeveer 10 uur. Hierdie skeiding op grond van molekulêre grootte het ook gevolg dat kleurstowwe wat nie by 280 min absorbeer nie later uit die kolom verskyn en dus van die ensiem geskei word.

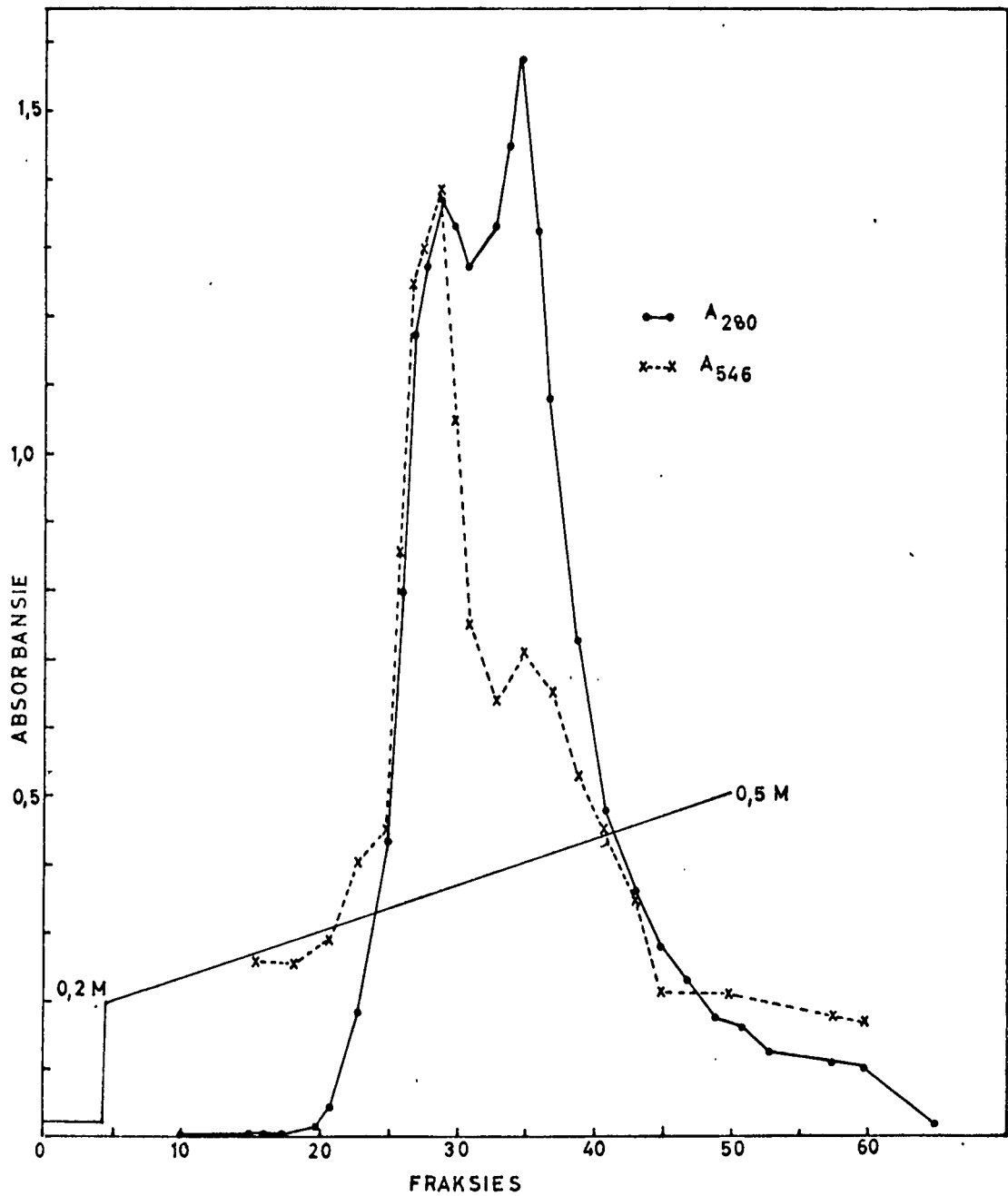
Tabel 4.26

Mate van suiwing, eenhede\* en herwins van ensiem in die verskillende suiwingstappe.

Monster	Volume (cm <sup>3</sup> )	Totale proteïen (mg)	Totale Aktiwiteit <sup>@</sup>	Aktiwiteit <sup>@</sup> per mg proteïen	Suiwing	Herwins %
ru-ekstrak	86,1	450,0	638,4	1,4	1,0	100,0
2,1 volume etanol	75,0	20,0	437,4	21,9	15,6	68,5
DEAE-sellulose	66,0	6,4	352,8	55,1	39,4	55,3
Biogel-P 60	40,3	2,1	257,0	122,4	87,4	40,3
DEAE-sellulose	17,5	1,3	189,3	145,6	104,0	29,7

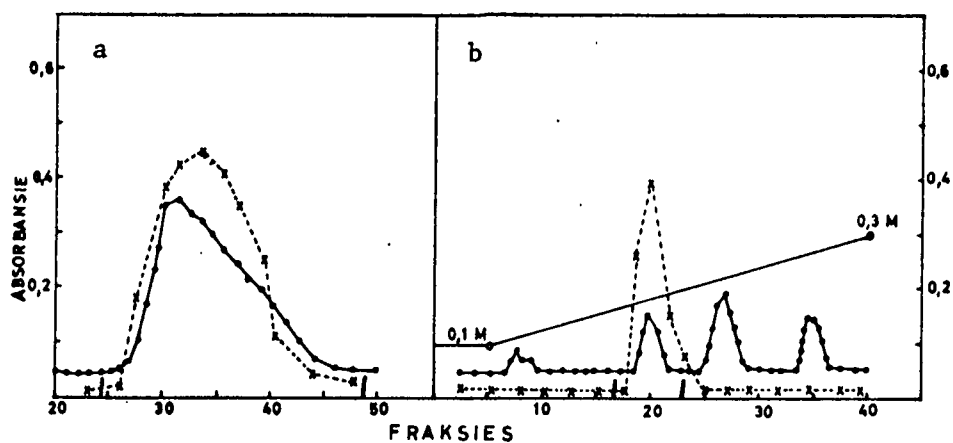
\* Ensiemeenheid = 1  $\mu$ mol reduserende groepe gevorm in 30 min

@ reduserende groepe vrygestel.



Figuur 4.7

Chromatografie van ensiem van stap 2 op 'n DEAE-sellulose kolom. 'n Lineêre konsentrasie gradiënt soos aangedui, is gebruik. Die fraksies is as 'n geheel gekombineer en vir verdere suiwering gebruik.



Figuur 4.8

- a) Chromatografie van ensiem op Biogel-P60
- b) Chromatografie van ensiem op DEAE-sellulose met 'n lineêre konsentrasie gradiënt aangedui. Die ensiem is verkry na kombinering van die fraksies soos aangedui.

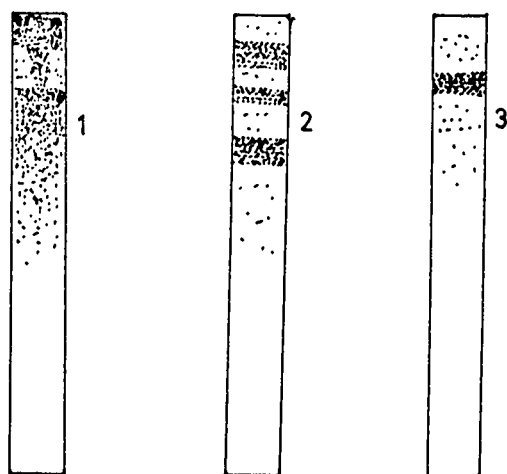
Drie sones word op hierdie stadium met behulp van analitiese jeelelektroforese waargeneem. Na hierdie stap was die ensiem 87,4 keer gesuiwer met 'n herwings van 40,3%. Die ensiemoplossing bevat 2,1 mg proteïen en 122,4 eenhede ensiem,

As finale suiwingstap is 'n DEAE-sellulose kolom gebruik. Die kolom is ontwikkel met 'n lineêre gradiënt wat vanaf 0,1 tot 0,3 M NaCl gestrek het in 0,05 M fosfaatbuffer pH 6,8. Tydens hierdie stap is die monster in vier fraksies geskei soos in figuur 4.8 aangetoon. Aktiwiteit is in die tweede piek gevind. Dié fraksie is gekombineer en na konsentrering deur vriesdroging gebruik om katalitiese eienskappe van die ensiem te bepaal. Hierdie stap het 'n suiwing van 104 met 'n herwings van 29,7% gegee. Die fraksie bevat 1,3 mg proteïen en 145,6 eenhede ensiem. Analitiese jeelelektroforese het op hierdie stadium oorwegend een fraksie getoon. Daar is egter nie ondersoeke by verskillende pH waardes uitgevoer nie aangesien min ensiem vir die tipe studies beskikbaar was.

As 'n voorbeeld van die resultate van die jeelelektroforese ondersoeke word die resultate in figuur 4.9 getoon.

#### 4.5.2 Eienskappe van die ensiem

Aanvanklik is daar in die algemeen vir koolhidrase aktiwiteite getoets. Deur die gesentrifugeerde, selvrye ekstrak van die protosoönpreparaat by styseloplossing, sellulosesuspensie, rooigrasblaarpoeier en CM-sellulose, almal 0,5% m/v, te voeg, is aktiwiteit ten opsigte van CM-sellulose en stysel vasgestel. Met stysel as substraat is vier keer meer aktiwiteit



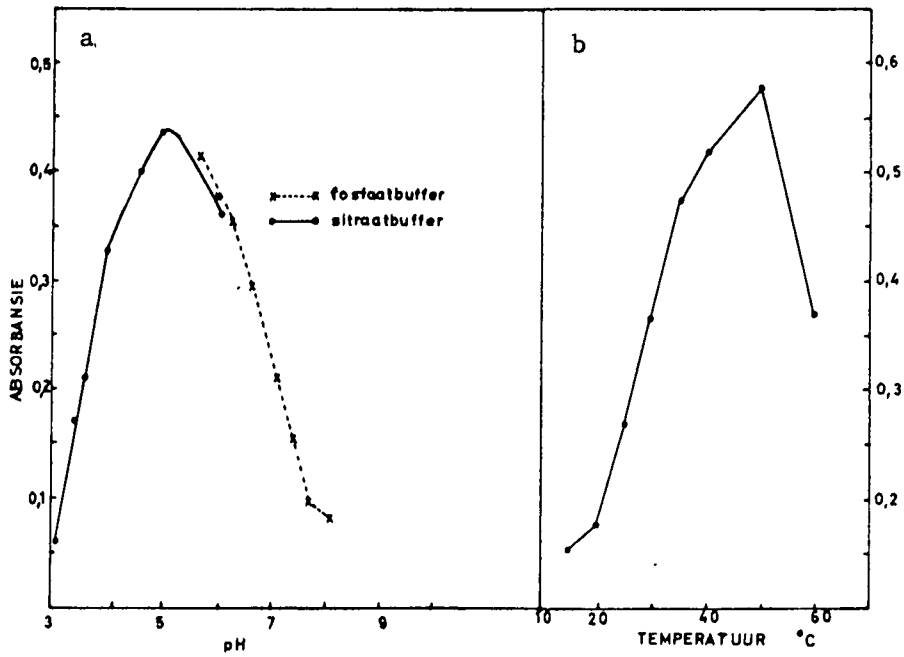
Figuur 4.9

Verskillende sones op jels verkry tydens jeelektroforese. Kondisies is soos onder 3.4.3 bespreek. 1) Na eerste DEAE kolom. 2) Na Biogel-P60 kolom en 3) Na tweede DEAE kolom.

as met CM-sellulose waargeneem. Sodra daar egter met suiwing van die ensiem begin is, is geen verdere aktiwiteit teenoor CM-sellulose waargeneem nie. Maltose, raffinose, sellobiose en sukrose is geeneen deur die ensiem gehidroliseer nie. Suiwer hemisellulase ensiem (NCP pharmaceuticals) het wel gehomogeniseerde, gefiltreerde rooigrassuspensie gehidroliseer. Reduserende groepe is tot 'n aansienlik mate deur die inwerking van die kommersieelverkrygte ensiem vrygestel. Daar was dus skynbaar wel hemisellulose in die grasmonster teenwoordig. Die onsuiver ensiempreparaat toon egter geen hemisellulose aktiwiteit teenoor hierdie substraat nie. Aansienlike aktiwiteit is egter waargeneem teenoor suiwer hemisellulose B wat uit rooigras geïsoleer is (verskaf deur mnr. P.L. van Biljon, Departement Biochemie, U.O.V.S.).

Die katalitiese aktiwiteit van die ensiem is verder met opgeloste stysel (0,5% m/v) as substraat ondersoek. Optimum pH is vasgestel deur aktiwiteitsbepalings in 0,05 M sitraat- en fosfaatbuffers oor die pH-gebied vanaf pH 3 tot pH 9. Resultate word in figuur 4.10 getoon. Optimum pH was pH 5,2 in 0,05 M sitraatbuffer en hierdie buffer is verder deurgaans gebruik. Die invloed van temperatuur op ensiemwerking word in figuur 4.10 aangedui. By 50° C is die ensiem nog aktief, maar by 60° C word 'n vinnige afname in aktiwiteit waargeneem. Voor hierdie afname is  $Q_{10}$  waardes van 1,83 en 2,03 verkry. Inkubasie by pH 5,2 by 35° C is uitgevoer vir verskillende tye. Volgens die resultate neem die reaksiesnelheid na 50 minute nog reglynig toe wat daarop dui dat in zero-orde gebied gewerk word.

Deur van dieselfde algemene kondisies gebruik te maak, pH 5,2; 35° C, is die spesifisiteit van die ensiem verder ondersoek. Aktiwiteit ten



Figuur 4.10

- a) Katalitiese eienskappe van die ensiem by wisselende pH in fosfaat- en sitraatbuffer asook by verskillende temperature soos in b) voorgestel.



opsigte van verskillende substrate word in tabel 4.27 aangedui. Die hoogste aktiwiteite was ten opsigte van die polimeriese substrate xilaan, stysel, amilopektien, dekstrien en glikogeen. Dit lyk dus asof die ensiem hoofsaaklik  $\alpha(1\rightarrow4)$  en  $\alpha(1\rightarrow6)$  bindings in polimeriese substrate hidroliseer.

Die studies betreffende die hidrolitiese ensieme kan egter hoofsaaklik as inleidende of voorlopige werk beskou word. Slegs die aktiwiteit ten opsigte van koolhidrate kon in die geval goed waargeneem word. Die rumenfraksies van skape op die veld aangehou, het baie min protease aktiwiteit getoon volgens die inkubasieprosedure met kaseïen as substraat (Du Toit, 1976). Daar was egter aanduidings dat skape op 'n ruproteïen=rantsoen heelwat meer protease aktiwiteit bevat. Studies van hierdie aard kan belangrik wees om die relatiewe bydraes van organismes ten opsigte van metabolisering van sekere substrate vas te stel. Dit kan verder ook gebruik word om die bydrae van protosoë in die rumenmetabolisme vas te stel. Sodoende kan dan bewys word tot watter mate protosoë metabolies vir die dier tot voordeel kan wees.

Tabel 4.27

Aktiwiteitsbepalings uitgevoer op verskillende substrate vir 30 min by 35° C onder optimale toestande. Aktiwiteit word uitgedruk as  $\mu\text{mol}$  reduserende groepe vrygestel.

substraat	$\mu\text{mol}$ reduserende groepe vrygestel	relatiewe aktiwiteit t.o.v. stysel (%)
stysel	2,21	100
xilaan	3,19	144
dekstien	1,65	75
CM-sellulose	0,05	2
amilopektien	1,94	88
sellulose	0,01	0,3
glikogeen	0,52	23
salisien	0,04	2
4-nitrofeniel- $\beta$ -		
D-glukopiranosied	0,22	10
4-nitrofeniel- $\alpha$ -		
D-glukopiranosied	0,08	4

GEVOLGTREKKINGS

'n Oogmerk van die studies hier gerapporteer, was om die rol van protosoë in die rumen van skape ten opsigte van aminosuursamestelling met seisoensvariasie vas te stel. Vir hierdie doel is rumenmonsters van die skape gefraksioneer en drieweekliks oor 'n tydperk van 'n jaar ondersoek. Hoewel die isolering van absoluut suiwer protosoönpreparaate uit rumenstof nie moontlik was nie, was die fraksies wat ondersoek is wel verteenwoordigend van die protosoë en kon ontledings op 'n vergelykende basis oor die proeftydperk uitgevoer word. Dit word onderskryf deur die duidelike ooreenkomste van die aminosuursamestelling van rumenprotosoë met suiwer protosoönkulture vanuit skaaprumen geïsoleer. Die konstante waardes wat verkry is vir die persentasiesamestelling van aminosure in al die fraksies en veral die protosoön- en bakteriese fraksies oor die hele proeftydperk moet ook betekenisvol wees. Indien die fraksioneringstegniek nie aan die vereiste herhaalbaarheid voldoen het nie, sou hierdie tipe resultate nooit moontlik gewees het nie. Die fraksioneringstegniek soos gebruik, kan dus met vrug toegepas word om sekere tendense en ander aspekte betreffende rumenpopulasies te ondersoek.

Analitiese bepalings soos byvoorbeeld stikstofontledings, aminosuurontledings, ensomeer, is ook deeglik ondersoek vir herhaalbaarheid en akkuraatheid. Wat hierdie tegnieke se akkuraatheid, asook herwinstbepalings soos byvoorbeeld stikstofverspreiding in die verskillende fraksies betref, bestaan daar ook geen twyfel oor die analitiese resultate nie. Daar is tydens die studies soveel aandag aan die tegnieke gegee

om te verseker dat waarnemings bo enige twyfel is. Ten einde die analitiese data van verskillende monsters met mekaar te kan vergelyk is besluit om alle bepaalde konsentrasies uit te druk asof in alle gevalle met presies dieselfde volume ( $1 \text{ dm}^3$ ) rumenmonster begin is. Sonder hierdie aanpassing sou dit onmoontlik wees om enige waardes werklik met mekaar te kon vergelyk.

Wat die groep skape wat bloot op 'n grasweiding sonder enige byvoeding aangehou is betref, is 'n aantal interessante waarnemings gemaak. Soos die kwaliteit van die weiding deur die seisoene gevarieer het, het die hoeveelheid stikstof, veral organiese stikstof ook gevarieer. Aminosuurstikstof en individuele aminosuurkonsentrasie het dieselfde tendens getoon. Wat wel interessant is, hoewel dit uit die aard van die saak verwag kon word, is die waarneming dat veranderings in die rumen vertraag word na verandering van die weiding. Die effek van rantsoenverandering word eers na verloop van 'n tydperk (ongeveer ses weke) deur analitiese bepalinge van die rumenstof getoon.

'n Reeks ontledings wat op die rumenstof van 'n tweede groep skape wat onder gekontroleerde toestande binneshuis op ruproteïenrantsoene aangehou is, het verskille met die "veldskape" getoon. Hoeveelheid rantsoen asook rantsoensamestelling het 'n groot invloed op die populasiesamestelling en die relatiewe hoeveelhede van die mikroorganismes in die rumen.

'n Interessante waarneming is verder dat by skape op die veld aangehou daar massagewys meer bakterieë as protosoë voorkom, terwyl die patroon net omgekeerd is by diere op ruproteïenrantsoene. Die rantsoen met die

hoogste ruproteïeninhoud het dan ook baie meer protosoë as bakterieë in die rumen tot gevolg. 'n Afleiding wat dus gemaak kan word, is dat hoë-kwaliteitsrantsoene tot 'n verhoging van die protosoönpopulasie lei en laer kwaliteitsrantsoene verhoudingsgewys tot hoër getalle bakterieë. Die skape wat die hoogste ruproteïenrantsoen ontvang het, het volgens mededelings deur mnr. J.E.J. du Toit (Departement Kleinveekunde) ook die beste in sy proewe presteer. Hierdie groep lakterende ooie was in die beste toestand en het ook die hoogste melkproduksie asook beste kwaliteit melk gelewer.

Hierdie waarnemings wil dus daarop dui dat wanneer rantsoene vir die dier gunstig is groter hoeveelhede mikroörganismes in die rumen gevind word. Onder hierdie toestande veral sal protosoë dus 'n baie belangrike funksie vir die dier vervul. Deur bloot op die relatiewe hoeveelheid stikstof in die protosoönfraksie van die verskillende groepe skape te let kan die belang van protosoë gesien word. Waar skape op die veld se protosoë slegs ongeveer 2 tot 5% van die totale stikstof in die ooreenstemmende rumenmonster bevat, neem die waarde toe tot 40% by skape op ruproteïenrantsoene. Daar moet dus gelet word op toestande waaronder die dier aangehou is voor gespesifiseer kan word of protosoë of bakterieë die belangrikste funksie in die rumen sal vervul. 'n Aspek wat mens verder steeds in gedagte moet hou is die feit dat protosoönproteïen en -aminosure meer beskikbaar is vir die dier as die ooreenstemmende bakteriese fraksies. Protosoë het 'n hoër biologiese waarde en is meer opneembaar as bakterieë. Groot getalle protosoë lei verder tot konstanter toestande in die rumen, 'n verdere aspek wat definitiewe voordele veral onder dié toestande, vir die dier inhou.

'n Belangrike uitvloeisel van die werk is dus om die voordeel en belang van groot getalle protosoë in die rumen te onderskryf. Die spesifieke wyse waarop protosoë die dier bevoordeel is egter nog nie ten volle opgeklaar nie. Deur na die metaboliese funksies van die groep organismes, ten opsigte van hidrolitiese ensieme en moontlik aminosuursamestelling te kyk, kan moontlik meer inligting in die verband verkry word.

Volgens aminosuurontledings van die verskillende rumenfraksies is 'n paar betekenisvolle verskille waargeneem. Protosoë het veral 'n belangrike bydrae tot die essensiële aminosure Lys, Ile en Arg terwyl bakterieë meer Thr, Ala, Tyr en Met bevat as die persentasievlakke wat in die rantsoen voorkom. Sekere aminosure soos Pro en His word tot 'n groot mate in die rumen afgebreek. Aminosure soos Asp en Glu wat 'n sentrale rol in algemene metabolisme vervul, word soos in die rantsoene ook in hoë konsentrasies in mikroörganismes aangetref. Waar dus slegs op die relatiewe hoeveelhede van die verskillende aminosure gelet word, lyk dit of die protosoönfraksie wel meer van sekere essensiële aminosure aan die dier voorsien. Indien aanvaar word dat mikroörganismes noodsaaklike funksies vir die herkouer verrig, 'n erkende feit wat onweerlegbaar is, kan mens hierdie gevolgtrekkings betreffende voorsiening van essensiële voedselbestanddele heelwaarskynlik maak. Moontlik lê die voorsieningsfunksie van protosoë en bakterieë nie soseer in die relatiewe hoeveelheid nie, maar eerder in 'n konstante tempo van verskaffing aan die dier. Mens moet dus nie slegs na hoeveelhede kyk nie, maar ook die metaboliese aktiwiteit van die organismes in ag neem.

In aansluiting hierby is die aminosure ook in groepe onderling ten opsigte van syketteienskappe beskou. Opvallende hoë konsentrasievlakke

van die alifatiese- en vertakte alifatiese aminosure kom in die rumen voor. Dit sluit natuurlik direk aan by die hoë vlakke van hierdie tipe vetsure wat ook in die rumen waargeneem word. Die suur aminosure vervul belangrike funksies in die sentrale weë van algemene metabolisme en dit kan verwag word dat die konsentrasievlakke hoog sal wees. Skynbaar word die heterosikliese aminosure in genoegsame hoeveelhede in die rantsoen voorsien sodat min oor die mikroörganismes se funksies ten opsigte van dié aminosure gesê kan word behalwe dat die persentasievlak van hierdie groep laer in die mikroörganismes as in die rantsoen is. Die baie lae konsentrasievlakke van die swaelbevattende aminosure is 'n gevolg van die baie vinnige opname van swael deur die dier. Gevolglik is die konsentrasievlakke baie laag hoewel swael belangrik is by wolproduksie. Die dier sintetiseer skynbaar self van die swaelbevattende aminosure. Dit is bekend dat hoër konsentrasievlakke van swael die dier bevoordeel, sodat verwag kan word dat swaelbevattende verbindings in die rantsoen noodsaaklik is en vinnig opgeneem sal word. Ook in die verband sal makliker opneembare mikroörganismes en proteïene die dier dus bevoordeel. Skynbaar vervul bakterieë 'n rol in die voorsiening van metionien aan die dier.

Die persentasiesamestelling van die aminosure in die verskillende fraksies het baie konstant gebly oor die hele proeftydperk. Variasie in rantsoensamestelling wat populasieverandering tot gevolg het, kan gevolglik die konsentrasies van sekere aminosure laat verander. In die verband is dit interessant dat die protosoönfraksies van die diere op ruproteïenrantsoene persentasiegewys meer Lys, Tyr, Arg, Asp en Glu, maar minder Gly en Ala bevat, as diere op 'n grasweiding aangehou. Die bakteriese fraksie toon kleiner verskille onder die toestande. Slegs

die vlakke van Thr, Tyr en Met is effens hoër. Die rol van die tipe mikroörganisme in die voorsiening van sekere aminosure bly dus ook nie konstant onder alle toestande nie, maar varieer met 'n verandering in rantsoen. Dit kan toegeskryf word aan die verandering van die populasiesamestelling binne die onderskeie fraksies.

'n Aspek wat ook na vore gekom het tydens die studies is die moontlike rol van die onderskeie groepe organismes in die afbreking van polimeriese rantsoenbestanddele. In die verband kan veral op die hidrolitiese ensieme van die groepe organismes gelet word. Intracellulêre ensieme kan binne die onderskeie fraksies waargeneem word. Volgens waarnemings vertoon die protosoönfraksie van diere op 'n grasrantsoen hoër aktiwiteit van glikosidases as die bakteriese fraksie. In die opsig sal die protosoë dus ook voordelig wees veral in die afbreking van sg. onverteerbare koolhidrate. Die ensiem wat uit die protosoönfraksie verkry en ondersoek is, het dan ook 'n relatief wye spesifisiteit vertoon. Die ensiem is egter nie ten volle gesuiwer en gekarakteriseer nie, sodat verdere studies nog uitgevoer sal moet word om die aspek ten volle op te klaar. In die verband behoort suiwer kulture van mikroörganismes ook voordelig gebruik te kan word. In alle fraksies was die proteolitiese aktiwiteit baie laag wanneer die diere op 'n grasrantsoen was. Daar is aanduidings dat dit met 'n ruproteïenrantsoen nie die geval is nie. Hierdie aspekte is egter nie verder ondersoek nie.

Samevattend kan bo enige redelike twyfel afgelei word dat die teenwoordigheid van protosoë in die rumen definitiewe voordele vir die herkouer inhou. Sekere essensiële - en ander aminosure word verhoudingsgewys in groter hoeveelhede deur die protosoë voorsien. Onder toestande waar



die protosoönpopulasie relatief groot is, heers meer konstante toestande in die rumen en die algemene toestand van die dier is ook beter. Benevens hierdie stabiliserende invloed en ook die groter beskikbaarheid van protosoë en hulle boustene as voedsel aan die dier, vervul die organismes blykbaar 'n belangrike metaboliese funksie. Veral die afbreking van polimeriese koolhidrate en bloot gebaseer op die groot getalle protosoë met die toediening van 'n proteïenryke rantsoen word ook proteïene tot 'n groot mate deur protosoë gehidroliseer. Studies betreffende hierdie laaste aspekte kan nog verder die belang van protosoë vir die dier onderskryf.

Dit is interessant dat soos toestande oor die seisoene gevarieer het, die persentasie aminosamestelling van die onderskeie fraksies tog konstant gebly het. 'n Afname in die rantsoenkwaliteit het dus tot algemeen swakker, maar tog redelik stabiele toestande in die rumen gelei. 'n Verandering in rantsoensamestelling het egter 'n opmerklike verandering in die rumen veroorsaak soos by skape op verskillende ruproteïenrantsoene gesien kan word. Veral in laasgenoemde geval vervul die protosoë skynbaar 'n steeds toenemende groter rol in die rumen, hoewel verwag kan word, veral hier waar 'n sekere populasie totaal oorheers, dat daar minder stabiliserende faktore in die vorm van 'n baie heterogene mikroorganismepopulasie teenwoordig is. 'n Logiese uitvloeisel van die werk sal nou wees om meer spesifiek op die metaboliese funksie van veral protosoë in vergelyking met bakterieë te let - 'n aspek wat reeds in die studies aangeraak is.

'n Mens kan dus onomwonde stel dat protosoë se teenwoordigheid in die rumen tot voordeel van die dier is. Dit bly nou nog slegs oor om die

omvang van hierdie voordeel vas te stel en wetenskaplik beter te bewys. Waar hierdie studies dus 'n riglyn neerlê vir so 'n tipe analitiese ondersoek kan dit nou op soortgelyke wyse tesame met byvoorbeeld produksieproewe prakties toegepas word.

## HOOFSTUK 6

OPSOMMING

Die rumenstof van skape is gefraksioneer en analities ondersoek. Monsters is drieweekliks vir 'n periode van een jaar van 'n groep van ses Merinoskape, op veldweiding aangehou, getrek. Eenmalige monsters is ook vanaf skape op ruproteïenrantsoene onder gekontroleerde toestande binneshuis aangehou, verkry. Die rumenstof is gefraksioneer in 'n protosoön-, bakteriese-, perskoek- (vesel) en 'n oplosbare fraksie. Fraksioneringsprosedure het op sentrifugale tegnieke berus en 'n herhaalbare prosedure is ontwikkel. Toestande waaronder die skape aangehou is, monsterneming en fraksioneringsprosedures is volledig beskryf en bespreek.

Ten einde die effek van seisoensvariasie op die samestelling van die rumeninhoud van die skape vas te stel, is heelmonster sowel as verkrygte fraksies analities ondersoek. Benewens droë massastikstofbepalings (mikro-Kjeldahlmetode), is ook aminosuurontledings op al die fraksies uitgevoer. In sekere gevalle is ook totale koolhidraat- en triptofaanbepalings gedoen. Die verkrygte fraksies is ook vir vergelykende doeleindes mikroskopies ondersoek. Om verteenwoordigende monsters vir veral hidroliseprosedures, maar ook ander analitiese bepalinge te verkry, is alle monsters goed gemeng of gehomogeniseer (waar nodig), gevriesdroog en daarna fyngemaal. Volgens die stikstofinhoud is die hoeveelheid monster benodig vir aminosuurontledings bereken. Vir laasgenoemde ontledings is monsters vir 22 uur onder vakuum gehidroliseer met konstant kokende HCl by  $110^{\circ}$  C. Na hidrolise is die soutsuur deur in-

damping en vriesdroging verwyder en die aminosure kwantitatief in buffer opgeneem. Aminosuurontledings is met 'n Beckman model 120 C aminosuurontleder uitgevoer en dié metode is gestandaardiseer en gekontroleer vir akkuraatheid. Daar is voorsiening gemaak vir die verliese van sekere aminosure tydens suurhidrolise.

Volgens resultate varieer die stikstofinhoud sowel as die totale aminosuurinhoud van die rumenfraksies met verloop van seisoene om 'n laagtepunt aan die einde van die winter te gee. Die persentasiesamestelling van die aminosure in die onderskeie fraksies bly egter oor die volle proeftydperk konstant. Sekere essensiële aminosure, byvoorbeeld Lys, Ile en Arg word verhoudingsgewys in groter hoeveelhede in die protosoönfraksie aangetref, terwyl die bakteriese fraksie weer meer Thr, Ala, Tyr en Met as die rantsoen bevat. Pro en His word tot 'n groot mate in die rumen afgebreek, terwyl die suur aminosure deurgaans in alle fraksies, selfs die rantsoen, in relatief groot hoeveelhede voorkom.

Rantsoensamestelling en kwaliteit het 'n groot invloed op die relatiewe grootte van mikrobiiese populasies in die rumen. Skape op 'n ruproteïenrantsoen bevat baie meer protosoë (massagewys) as bakterieë, terwyl "veldskape" die teenoorgestelde toon. Die protosoë van ruproteïenrantsoen skape bevat dan ook opmerklik hoër konsentrasievlakke van die aminosure Lys, Tyr, Arg, Asp en Glu maar laer vlakke van Gly en Ala. Die bakteriese fraksies tussen die twee groepe skape toon egter baie min verskille.

Volgens die resultate vervul protosoë 'n belangrike rol in die rumen van skape en veral wanneer beter kwaliteit rantsoene aan die dier voorsien word. Benewens die voorsiening van sekere essensiële aminosure (protosoë as bron van voeding) vervul dié organismes skynbaar ook 'n belangrike rol in die afbreking van komplekse polimeriese voedselbestanddele.

In die verband is 'n glikosiedhidrolase spesifiek vanuit die protosoönfraksie van skape op veldweiding verkry, gedeeltelik gesuiwer en ondersoek. Die ensiem is deur middel van etanolfraksionering en chromatografiese tegnieke gesuiwer en eienskappe soos die optimum pH asook aktiwiteit teenoor verskillende substrate is bepaal. Die voorkoms van spesifieke hidrolitiese ensieme in die mikroorganismefraksies word ook grootliks deur rantsoensamestelling beïnvloed. Dit is dus noodsaaklik om die spesifieke metaboliese rol van die protosoë in die rumen verder te ondersoek.

SUMMARY

The rumen content of sheep was fractionated and analyzed. Samples were obtained over a year, at three week intervals, from a group of six Merino sheep on natural veld. The rumen contents of another group receiving specified crude protein feed and kept indoors under controlled conditions, were also analyzed. Rumen samples were fractionated into protozoal-, bacterial-, fibrous- and soluble fractions by a procedure of centrifugation. Sampling and conditions under which the sheep were kept as well as fractionating procedures are described and discussed.

The rumen samples as well as the different fractions were analyzed by various means to determine the effects of seasonal variation. Dry mass, nitrogen (micro-Kjeldahl technique) and amino acid composition of these fractions were determined. In some cases the total carbohydrate- and tryptophane contents were determined. Observation of the different fractions by microscope was used for comparative purposes. For analytical determinations, including hydrolysis procedures, all samples were well mixed, homogenized where necessary, freeze-dried and pulverised to facilitate representative sampling. The amount of sample needed for amino acid determination was calculated from the nitrogen content. Samples were hydrolyzed for 22 hours at 110° C in constant boiling HCl under vacuum. Hydrochloric acid was removed by evaporation and freeze-drying after hydrolysis and the amino acids transferred quantitatively into buffer for analysis. Amino acid analysis were conducted on a Beckman Model 120 C amino acid analyzer according to a standardized procedure. The analysis were controlled for accuracy and

values compensated for losses of certain amino acids caused by acid hydrolysis.

According to results, the nitrogen as well as the total amino acid content varied with seasonal variations with minimum values at the end of the winter. Each amino acid, viewed as a percentage of the total amino acids in the fraction, remained constant within certain limits over the full duration of the experiment. Certain essential amino acids, i.e. Lys, Ile and Arg occurred at comparatively higher concentration levels in the protozoal fraction, whereas Thr, Ala, Tyr and Met were present at higher levels in the bacterial fraction as compared to the rumen sample. Pro and His seem to be degraded to a marked extent in the rumen, whereas Asp and Glu occurred at relatively high concentration levels in all fractions, including the feed.

The quality and composition of fodder have a marked effect upon the microflora of the rumen. The sheep on crude protein feed displayed much higher levels of protozoa (dry mass) than bacteria. The opposite pattern was observed with sheep on the veld. Protozoa from sheep on crude protein feed also had higher concentration levels of Lys, Tyr, Arg, Asp and Glu but lower levels of Ala and Gly. Bacterial fractions from both groups showed very little difference in amino acid composition.

These results seem to indicate a definite role for protozoa in the rumen especially when the animal is fed a high quality fodder. In addition to preferentially supplying certain essential amino acids (protozoa used as feed) these organisms also seem to aid in the break=

down of complex macromolecules present in the feed.

In this respect a glycoside hydrolase, obtained from the protozoal fraction of grazing sheep, was partially purified and studied. The enzyme was purified by ethanol fractionation as well as chromatographic procedures. The optimum pH as well as the activity towards various carbohydrates was also determined. The occurrence of specific hydrolases in the different micro-organisms is also affected by the feed supplied to the animal. It seems essential that further studies specifically concerning the metabolic role of protozoa in the rumen should be done.



## HOOFSTUK 7

BYVOEGSELSBYVOEGSEL IREËNVALSYFERSTabel 7.1

Totale maandelikse reënval op die proefplaas Sydenham in mm uitgedruk. Waardes is deur die personeel van Sydenham verskaf.

Maand	Jaar	Totale reënval in mm
November	1976	18,6
Desember	1976	37,9
Januarie	1977	63,0
Februarie	1977	76,5
Maart	1977	99,4
April	1977	31,6
Mei	1977	8,3
Junie	1977	2,0
Julie	1977	0,0
Augustus	1977	0,0
September	1977	80,1
Oktober	1977	57,8
November	1977	25,9

Tabel 7.2

Statistiese ontleding van die aminosuursamestelling van tien monsters van bakterieë (monster 12) uitgedruk as mmol. Waardes word aangegee asof met  $1 \text{ dm}^3$  heelmonster begin is.

Aminosuur	MONSTER										Gemiddeld	Standaardafwyking	Koeffisient van variësie	Betroubaarheidsinterval
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
Lys	0,59	0,63	0,63	0,64	0,64	0,62	0,63	0,64	0,67	0,71	0,64	0,033	5,12	0,65 - 0,63
His	0,14	0,14	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,15	0,15	0,16	0,15	0,006	3,71	0,15 - 0,15
NH <sub>3</sub>	1,61	1,56	1,59	1,65	1,59	1,68	1,60	1,45	1,48	1,70	1,59	0,081	5,10	1,61 - 1,57
Arg	0,31	0,33	0,32	0,31	0,31	0,31	0,30	0,32	0,31	0,32	0,31	0,008	2,68	0,32 - 0,31
Asp	1,14	1,19	1,14	1,12	1,14	1,12	1,09	1,12	1,12	1,10	1,13	0,026	2,30	1,14 - 1,12
Thr	0,65	0,66	0,63	0,64	0,65	0,65	0,64	0,65	0,64	0,63	0,64	0,009	1,54	0,65 - 0,64
Ser	0,60	0,64	0,60	0,60	0,60	0,58	0,58	0,59	0,59	0,58	0,60	0,016	2,78	0,60 - 0,59
Glu	1,04	1,07	1,06	1,07	1,01	1,23	0,97	0,98	1,02	1,00	1,05	0,072	7,21	1,06 - 1,03
Pro	0,38	0,37	0,35	0,40	0,36	0,35	0,38	0,34	0,38	0,37	0,37	0,016	4,70	0,37 - 0,36
Gly	0,87	0,92	0,88	0,89	0,88	0,87	0,86	0,86	0,85	0,88	0,87	0,020	2,36	0,88 - 0,87
Ala	1,01	1,06	1,02	1,01	1,01	0,99	0,97	1,00	1,00	0,89	1,00	0,042	4,39	1,01 - 0,99
Cys	0,07	0,00	0,05	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,029	145,00	0,03 - 0,01
Val	0,60	0,64	0,62	0,63	0,63	0,62	0,59	0,62	0,60	0,61	0,62	0,013	2,26	0,62 - 0,61
Met	0,28	0,25	0,27	0,27	0,18	0,20	0,18	0,20	0,20	0,18	0,22	0,039	17,73	0,23 - 0,21
Ile	0,51	0,51	0,52	0,52	0,52	0,52	0,51	0,51	0,50	0,52	0,51	0,007	1,52	0,52 - 0,51
Leu	0,70	0,73	0,71	0,70	0,70	0,70	0,68	0,70	0,69	0,70	0,70	0,011	1,62	0,71 - 0,70
Tyr	0,34	0,36	0,33	0,33	0,31	0,32	0,32	0,33	0,34	0,33	0,33	0,012	3,64	0,33 - 0,33
Phe	0,15	0,37	0,16	0,36	0,36	0,36	0,35	0,35	0,35	0,34	0,36	0,008	2,22	0,36 - 0,36

Tabel 7.3

Statistiese ontleding van 9 kalibrerings met standaard aminosuurmengsel

Aminosuur	Gemiddeld	Standaard-afwyking	Koëffisiënt van variasie
Lys	89,23	5,24	5,87
His	78,45	5,10	6,51
NH <sub>3</sub>	53,13	6,28	11,83
Arg	82,19	4,09	4,97
Asp	76,34	3,73	4,88
Thr	83,05	4,00	4,82
Ser	87,15	4,01	4,60
Glu	80,94	3,37	4,16
Pro	18,12	1,63	9,00
Gly	82,79	3,11	3,75
Ala	80,92	3,23	3,99
Cys	40,54	1,75	4,32
Val	80,02	4,12	5,15
Met	84,29	3,89	4,62
Ile	85,01	3,65	4,29
Leu	87,27	2,80	3,20
Tyr	85,72	2,83	3,30
Phe	85,39	2,82	3,30

Tabel 7.4

Stikstofwaardes as mg totale N en mg aminosuur-N van die onderskeie rumenfraksies bereken per gram droë materiaal.

Monster	Totale stikstof				Aminosuurstikstof			
	Heelmonster	Perakoek	Protosoë	Bakterië	Heelmonster	Perakoek	Protosoë	Bakterië
1	24,15	21,63	72,50		10,39	10,43	36,07	
2	24,15	18,20	75,75		10,58	9,38	37,37	
3	27,50	19,83	65,34		13,24	9,84	33,23	
4	24,20	19,27	63,44		12,26	10,08	34,25	
5	31,21	30,13	71,83		13,40	11,36	33,41	
6	28,21	22,35	72,64		12,60	9,04	36,62	
7	28,81	22,80	59,46		10,57	7,56	30,02	
8	28,12	17,08	56,65		10,56	7,91	29,63	
9	26,67	14,43	53,26	80,62	10,09	6,80	24,21	35,89
10	22,25	11,66	53,04	57,36	7,38	4,88	23,87	29,00
11	20,97	14,23	46,82	50,77	7,72	4,75	21,32	24,11
12	21,11	14,17	91,52	61,72	8,04	5,91	21,57	28,83
13	21,46	13,68	47,13	67,59	6,92	5,42	20,82	30,07
14	15,33	9,52	37,45	59,68	6,10	6,20	19,30	28,02
15	15,38	12,33	43,81	60,70	5,88	5,44	20,88	27,70
16	27,55	22,91	67,52	70,17	9,49	8,39	22,46	19,80
17	26,60	21,96	64,13	83,96	8,38	7,31	20,90	25,18
18	22,10	15,86	54,88	76,69	6,84	4,99	16,94	11,85

Tabel 7.5

Statistiese ontleding van 18 heelmonsters se aminosuursamestelling.

Aminosuur	Gemiddelde X samestelling van 18 monsters	Standaard- afwyking	Koëffisiënt van variasie	Betroubaarheids- interval
Lys	6,69	0,54	8,1	6,56 - 6,82
His	1,59	0,13	8,2	1,56 - 1,62
Arg	3,11	0,23	7,5	3,05 - 3,16
Asp	12,02	0,39	3,2	11,93 - 12,11
Thr	6,55	0,17	2,6	6,51 - 6,59
Ser	6,69	0,41	6,2	6,59 - 6,79
Glu	11,55	0,34	2,9	11,48 - 11,63
Pro	4,70	0,33	7,1	4,63 - 4,78
Gly	9,66	0,27	2,8	9,60 - 9,73
Ala	10,06	0,25	2,5	10,00 - 10,12
Val	6,51	0,26	4,0	6,45 - 6,58
Met	1,11	0,33	29,6	1,04 - 1,19
Ile	5,29	0,33	6,3	5,21 - 5,37
Leu	8,21	0,26	3,2	8,15 - 8,28
Tyr	2,18	0,39	17,8	2,09 - 2,27
Phe	4,13	0,21	5,1	4,08 - 4,17

Tabel 7.6

Statistiese ontleding van 18 perskoeke se aminosuursamestelling

Aminosuur	Gemiddelde % samestelling van 18 monsters	Standaard- afwyking	Koëffisiënt van variasie	Betroubaarheids- interval
Lys	6,89	0,56	8,2	6,76 - 7,03
His	1,65	0,14	8,2	1,62 - 1,68
Arg	3,04	0,34	11,1	2,96 - 3,12
Asp	11,79	0,89	7,5	11,58 - 12,00
Thr	6,38	0,24	3,7	6,33 - 6,44
Ser	6,83	0,48	7,1	6,72 - 6,95
Glu	11,45	0,32	2,8	11,38 - 11,53
Pro	5,04	0,61	12,1	4,90 - 5,18
Gly	9,93	0,53	5,4	9,81 - 10,06
Ala	9,85	0,36	3,7	9,77 - 9,94
Val	6,48	0,31	4,7	6,41 - 6,55
Met	0,66	0,29	43,6	0,59 - 0,73
Ile	5,35	0,25	4,7	5,29 - 5,41
Leu	8,53	0,30	3,5	8,46 - 8,60
Tyr	1,93	0,50	26,1	1,82 - 2,05
Phe	4,24	0,19	4,6	4,20 - 4,29

Tabel 7.7

Statistiese ontleding van 18 protosoönmonsters se aminosuursamestelling

Aminosuur	Gemiddelde % samestelling van 18 monsters	Standaard- afwyking	Koëffisiënt van variasie	Betroubaarheids- interval	a
Lys	7,62	0,74	9,7	7,44 - 7,79	8,6
His	1,64	0,13	7,8	1,61 - 1,67	0,7
Arg	3,58	0,21	5,9	3,53 - 3,63	16,4
Asp	11,69	0,28	2,4	11,63 - 11,76	5,4
Thr	6,25	0,24	3,8	6,20 - 6,31	7,1
Ser	6,43	0,31	4,8	6,36 - 6,51	3,8
Glu	11,36	0,49	4,3	11,24 - 11,48	8,0
Pro	4,38	0,42	9,5	4,29 - 4,48	7,9
Gly	8,85	0,19	2,1	8,81 - 8,89	8,0
Ala	8,96	0,45	5,0	8,86 - 9,07	17,3
Val	6,13	0,23	3,7	6,08 - 6,19	8,6
Met	1,68	0,53	31,8	1,56 - 1,81	29,5
Ile	5,69	0,30	5,3	5,62 - 5,76	7,0
Leu	8,14	0,23	2,8	8,09 - 8,19	9,7
Tyr	3,36	0,19	5,7	3,32 - 3,41	12,5
Phe	4,23	0,23	5,4	4,17 - 4,28	8,7

a) Koëffisiënt van variasie soos aangegee deur Meyer et al. (1967).

Tabel 7.8

Statistiese ontleding van 10 bakteriese monsters se aminosuursamestelling

Aminosuur	Gemiddelde % samestelling van 18 monsters	Standaard- afwyking	Koëffisiënt van variasie	Betroubaarheids- interval	a
Lys	6,58	0,21	3,3	6,53 - 6,63	3,0
His	1,59	0,12	7,4	1,56 - 1,62	12,0
Arg	3,25	0,11	3,4	3,23 - 3,28	4,3
Asp	11,80	0,18	1,5	11,76 - 11,84	2,2
Thr	6,73	0,20	2,9	6,68 - 6,78	4,9
Ser	6,27	0,22	3,5	6,22 - 6,33	8,6
Glu	10,93	0,33	3,0	10,85 - 11,00	5,3
Pro	3,74	0,56	15,0	3,61 - 3,87	7,0
Gly	9,33	0,17	1,8	9,29 - 9,37	9,5
Ala	10,75	0,27	2,5	10,69 - 10,81	3,5
Val	6,51	0,34	5,2	6,43 - 6,59	2,6
Met	2,13	0,20	9,6	2,08 - 2,17	42,9
Ile	5,34	0,33	6,2	5,26 - 5,41	4,0
Leu	7,55	0,21	2,8	7,50 - 7,60	5,2
Tyr	3,47	0,11	3,2	3,45 - 3,50	7,1
Phe	3,88	0,18	4,6	3,84 - 3,92	4,9

a) Koëffisiënt van variasie soos aangegee deur Meyer et al. (1967).



Tabel 7.9

Aminosure in die heelmonsters voorgestel as die verskillende groepe afhangende van die tipe syketting. Waardes word as mmol per fraksie asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is, aangedui.

Aminosure as groepe	Aminosuurkonsentrasie in heelmonster met nommer soos aangedui.																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
suur	9,352	8,943	11,382	13,672	15,185	13,258	11,911	9,853	8,753	7,563	7,956	8,241	6,879	4,386	4,897	7,805	12,780	8,727
basies	3,226	3,552	4,492	6,720	6,329	5,919	4,863	4,069	3,582	3,132	3,236	3,330	2,827	1,833	2,090	3,256	5,564	3,606
vertak	7,976	8,205	10,139	12,004	13,531	11,918	9,749	8,426	7,259	6,057	6,431	6,549	5,166	3,658	4,358	7,011	10,729	7,215
alifaties																		
alifaties	8,051	7,823	9,435	11,682	12,756	10,917	9,772	8,099	7,309	6,096	6,206	6,819	5,854	3,567	4,275	6,597	10,666	7,378
aromaties	2,630	2,761	3,489	4,280	4,344	3,768	3,140	2,763	2,241	1,717	1,884	1,883	1,644	1,066	1,292	2,170	3,506	2,214
hidroksi	5,482	5,117	6,380	7,973	8,359	7,183	6,759	5,472	5,116	4,311	4,412	4,646	3,826	3,274	3,736	4,532	7,052	4,972
heterosiklies	2,252	2,366	3,530	3,792	3,869	3,558	2,845	2,519	2,240	1,996	2,084	2,184	1,876	1,207	1,378	2,097	3,589	2,407
svael	0,396	0,195	0,416	0,330	0,690	0,541	0,769	0,565	0,469	0,317	0,484	0,274	0,435	0,165	0,321	0,505	0,365	0,437

Tabel 7.10

Aminosure in die perskoeke voorgestel as die verskillende groepe afhangende van die tipe syketting. Waardes word as mmol per fraksie asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is, aangedui.

Aminosure as groepe	Aminosuurkonsentrasie in perskoek met nommer soos aangedui.																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
suur	5,815	7,223	5,566	7,521	7,090	7,175	6,486	6,009	5,078	4,014	3,220	4,514	4,201	4,301	3,230	5,009	7,989	4,906
basies	1,210	3,221	2,506	3,968	3,083	2,980	2,833	2,622	2,232	1,852	1,293	5,911	1,832	1,752	1,437	1,983	3,163	1,957
vertak	5,589	7,017	5,137	6,742	6,338	6,262	5,678	5,406	4,674	3,386	2,758	3,265	3,511	3,589	2,880	4,568	6,678	4,148
alifaties																		
alifaties	5,3-8	6,388	4,813	6,664	6,204	5,873	5,350	5,038	4,352	3,313	2,934	3,225	3,421	3,461	2,841	4,384	6,820	4,228
aromaties	1,925	2,316	1,724	2,259	1,950	1,929	1,792	1,702	1,285	0,965	0,742	0,916	0,961	1,063	0,846	1,326	2,153	1,143
hidroksi	2,18-	3,932	3,259	4,045	3,974	4,019	3,679	3,412	2,978	2,496	1,920	2,313	2,313	2,562	2,072	2,919	4,340	2,715
heterosiklies	1,665	2,054	1,613	2,142	2,104	2,159	1,896	1,539	1,301	1,562	0,951	1,155	1,165	1,222	0,940	1,461	2,198	1,378
swaai	0,211	0,1-6	0,097	0,199	0,227	0,243	0,056	0,200	0,201	0,088	0,070	0,111	0,174	0,112	0,932	0,224	0,102	0,206

Tabel 7.11

Aminosure in protosoönmonsters voorgestel as verskillende groepe afhangende van die tipe syketting. Waardes word as mmol per fraksie asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is, aangedui.

Aminosure as groepe	Aminosuurkonsentrasie in protosoë met nommer soos aangedui.																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
suur	0,570	0,659	0,707	0,532	0,923	0,869	1,259	0,633	0,629	0,689	0,401	0,504	0,445	0,343	0,267	0,329	0,520	0,391
basies	0,276	0,379	0,333	0,332	0,463	0,436	0,562	0,308	0,289	0,323	0,186	0,239	0,208	0,159	0,118	0,156	0,237	0,179
vertak	0,503	0,565	0,626	0,498	0,807	0,805	1,131	0,521	0,541	0,569	0,345	0,423	0,380	0,294	0,217	0,282	0,465	0,313
alifaties																		
alifaties	0,445	0,477	0,514	0,430	0,673	0,652	1,022	0,499	0,510	0,508	0,330	0,376	0,339	0,231	0,194	0,253	0,419	0,310
aromaties	0,205	0,224	0,241	0,188	0,311	0,305	0,431	0,209	0,208	0,212	0,128	0,153	0,138	0,109	0,083	0,103	0,174	0,114
hidroksie	0,303	0,344	0,348	0,294	0,486	0,456	0,542	0,350	0,356	0,384	0,231	0,279	0,255	0,193	0,140	0,184	0,293	0,217
heterosiklies	0,155	0,181	0,170	0,147	0,233	0,248	0,315	0,141	0,148	0,198	0,108	0,119	0,104	0,089	0,064	0,090	0,152	0,105
swael	0,020	0,026	0,051	0,033	0,027	0,049	0,162	0,053	0,050	0,049	0,035	0,042	0,036	0,025	0,019	0,033	0,039	0,031

Tabel 7.12

Aminosure in bakteriese monsters voorgestel as verskillende groepe afhangende van die tipe syketting.

Waardes word as mmol per fraksie asof met 1 dm<sup>3</sup> heelmonster begin is, aangedui.

Aminosure	Aminosuurkonsentrasie in bakterieë met nommer soos aangedui.									
	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
suur	0,951	1,299	1,029	1,442	2,109	1,006	1,378	1,767	2,893	2,843
basies	0,462	0,538	0,433	0,631	0,945	0,685	0,594	0,769	1,305	1,171
vertak	0,822	1,034	0,872	1,214	1,864	1,417	1,243	1,603	2,490	2,169
alifaties										
alifaties	0,863	1,084	0,899	1,238	1,873	1,437	1,289	1,601	2,542	2,442
aromaties	0,300	0,408	0,352	0,452	0,663	0,514	0,460	0,587	0,962	0,905
hidroksie	0,537	0,762	0,582	0,822	1,201	0,925	0,802	1,034	1,620	1,628
heterosiklies	0,177	0,365	0,230	0,345	0,504	0,381	0,331	0,417	0,712	0,613
swael	0,099	0,132	0,086	0,146	0,172	0,145	0,126	0,186	0,245	0,260

Rekenaarprogram gebruik by aminosuurontledings.

```

1.      DIMENSION KAL(20), MON(20), RES(20), PRES(20)
2.      REAL MON, KAL, KONST, IPRES
3.      C      EERSTENS WORD DIE KALIBRASIE MENGSEL INGELEES.
4.      READ(5,1)(KAL(J),J=1,18)
5.      1      FORMAT(13F6.2/5F6.2)
6.      DO 7L=1,4
7.      IPRES = 0
8.      C      TWEEDENS WORD DIE MONSTER INGELEES
9.      C      MONSTER WORD OP EERSTE KAART TOT KOLOM 78 INGELEES.
10.     C      OP VOLGENDE KAART MOET ONTHOU WORD OM DIE EERSTE SPASIE OOP TE
11.     C      LOS. DIE KONSTANTE WORD HEEL LAASTE TOT IN KOLOM 36 GEGEE
12.     READ(5,6)(MON(I),I=1,18),KONST
13.     6      FORMAT(13F6.3/6F6.3)
14.     TOT = 0
15.     DO 21 = 1,18
16.     C      RESULTAAT OP (RES) IN MMOL WORD BEREKEN
17.     RES(I)=MON(I)/KAL(I)*KONST
18.     TOT=TOT + RES(I)
19.     2      CONTINUE
20.     DO 3K = 1,18
21.     C      PERSENTASIE OF (PRES) WORD BEREKEN
22.     PRES(K)=(RES(K)/TOT)*100
23.     C      AS TOETS WORD DIE PERSENTASIE TOTAAL BEREKEN
24.     IPRES = IPRES + PRES (K)
25.     3      CONTINUE
26.     WRITE(6,4)(MON(J),RES(J),PRES(J),J=1,18),KONST,TOT,IPRES
27.     4      FORMAT (1X ,2X,'H-W',5X,'AMINOSUUR',5X,'MMOL',4X,'PERSENTASIE',//
28.     *3X,F6.3,6X,'LYS',8X,F6.4,5X,F5.3/3X,F6.3,6X,'HIS',8X,F6.4,5X,F5.3/
29.     *3X,F6.3,6X,'NH3',8X,F6.4,5X,F6.3/3X,F6.3,6X,'ARG',8X,F6.4,5X,F5.3/
30.     *3X,F6.3,6X,'ASP',8X,F6.4,5X,F6.3/3X,F6.3,6X,'THR',8X,F6.4,5X,F5.3/
31.     *3X,F6.3,6X,'SER',8X,F6.4,5X,F5.3/3X,F6.3,6X,'GLU',8X,F6.4,5X,F6.3/
32.     *3X,F6.3,6X,'PRO',8X,F6.4,5X,F5.3/3X,F6.3,6X,'GLY',8X,F6.4,5X,F5.3/
33.     *3X,F6.3,6X,'ALA',8X,F6.4,5X,F5.3/3X,F6.3,6X,'CYS',8X,F6.4,5X,F5.3/
34.     *3X,F6.3,6X,'VAL',8X,F6.4,5X,F5.3/3X,F6.3,6X,'MET',8X,F6.4,5X,F5.3/
35.     *3X,F6.3,6X,'ILE',8X,F6.4,5X,F5.3/3X,F6.3,6X,'LEU',8X,F6.4,5X,F5.3/
36.     *3X,F6.3,6X,'TTR',8X,F6.4,5X,F5.3/3X,F6.3,6X,'PHE',8X,F6.4,5X,F5.3/
37.     *2X,'K',F6.3,6X,'TOT',6X,F8.4,4X ,F6.2 //2X,'EINDE')
38.     7      CONTINUE
39.     STOP
40.     END

```

Rekenaarprogram gebruik by die statistiese ontleding van data

```

1.          REAL IKVS
2.          DIMENSION A(20,20),B(20),X(20),P(20),TS(20), IKVS(20),S(20)
3.          C          BEREKENING VAN GEMIDDELD
4.          READ(5,1)((A(I,J),J=1,18),I=1,16)
5.          1          FORMAT(15F5.2/3F5.2)
6.          DO 2 I=1,16
7.              YGEM =0
8.              DO 3 J=1,18
9.                  3          YGEM = YGEM + A(I,J)
10.             2          B(I)=YGEM/18.0
11.             WRITE(6,4)((A(I,J),J= 1,18),B(I),I=1,16)
12.             4          FORMAT(1X//1X,'WAARDES INGELEES'/1X,18F6.2/1X,'GEMM' F6.2)
13.          C          BEREKENING VAN STANDAARDAFWYKING.
14.          DO 115 I=1,16
15.              DO 15 J= 1,18
16.                  15          X(J)= A(I,J)
17.              XND = -1.0
18.              N=18
19.              CALL STDEV (X,N,XND,S1)
20.              WRITE(6,5) S1
21.              5          FORMAT(1X,'STANDAARDAFWYKING IS DUS' //1X, F6.3)
22.              S(I)=S1
23.          115          CONTINUE
24.          READ (5,6)(P(I),I=1,16)
25.          6          FORMAT(16F5.2)
26.          DO 116 I=1,16
27.              TS(I)=(P(I)-B(I))/(S(I)* 1.0274)
28.          116          CONTINUE
29.          WRITE(6,7)(TS(I),I=1,16)
30.          7          FORMAT(1X//1X, F8.4)
31.          C          STANDAARDAFWYKING / GEMIDDELD*100 GEE KOEFFICIENT VAN VARIASIE
32.          DO 9 I=1,16
33.              9          IKVS(I)=S(I)/B(I)*100
34.              WRITE(6,8)(IKVS(I),I=1,16)
35.              8          FORMAT(1X/// F6.4)
36.          STOP
37.          END

```

Rekenaarprogram gebruik by die trek van grafieke

```

1*          DIMENSION XMAT(99),YMAT(99),LNTP(16)INT(15),IOP(10),IXOP(10),IYOP
2*          *(10)
3*          READ (5,1)IHOEV
4*          1  FORMAT (12)
5*          DO 100 JA =1,IHOEV
6*          C  DIE VOLGENDE WORD NOU INGELEES
7*          C  ITA =AANTAL GRAFIEKE OP DIESELPDE ASSESTELSEL
8*          C  N = AANTAL PUNTE OP ENKELE GRAFIEK
9*          C  IO, IXD, IYD = SYFERS VAN OPSKRIFTE, BV. 22,15 ENS.
10*         C  FACT = GROOTTE VAN DIE GRAFIEK
11*         READ(5,2)ITA,N,IO,IXD,IYD,KOP,KXOP,KYOP,FACT
12*         2  FORMAT (8I3,F4.1)
13*         C  FACT WORD IN F-FORMAT INGELEES VANAF KOLOM 25
14*         C  DIE OPSKRIF EN ONDESKRIFTE WORD NOU INGELEES
15*         READ (5,3)(IOP(I),I=1,KOP),(IXOP(I),I=1,KXOP),(IYOP(I),I=1,KYOP)
16*         3  FORMAT(20A4)
17*         C  DIE X-AS SE PUNTE WORD NOU INGELEES
18*         READ (5,10 )(XMAT(I),I=1,N)
19*         10  FORMAT (13 F3.0)
20*         IO = KOP*4
21*         IXD= KXOP*4
22*         IYD= KYOP*4
23*         JTA =N*ITA
24*         READ (5,11 )(YMAT(I),I=1,JTA)
25*         11  FORMAT (13F5.2)
26*         C  WAAR JTA DIE AANTAL Y-KOORDINATE AS N TOTAAL IS
27*         II = ITA *(N+2)
28*         J = N+1
29*         DO 13K =1,ITA
30*         DO 13I =1,N
31*         XMAT (J) = XMAT (I)
32*         13  J =J+1
33*         DO 14 I = 1, ITA
34*         LNTP (I) =3
35*         C  WAAR DIE 3 STAAN VIR LYN EN STIPSIMBOLE
36*         C  AS LNTP < 0, BV -3 ,WORD N GLADDE KROMME GETREK
37*         14  INT (I) = I
38*         CALL PLOTLN (ITA,FACT,XMAT,YMAT,II,IOP(1),IO,IXOP(1),IXD,IYOP(1),I
39*         *YD,LNTP,INT,100)
40*         WRITE (6,12)(XMAT(I),I=1,N),(YMAT(I),I=1,JTA))
41*         12  FORMAT (1X/1X,16 F6.2/1X,19(1XF5.2))
42*         100  CONTINUE
43*         STOP
44*         END

```

LITERATUURVERWYSINGS

ABE, M. & K., FUMIO, 1973.

In vitro simulation of rumen fermentation: apparatus and effects of dilution rate and continuous dialysis on fermentation and protozoal population. J. Anim. Sci. 36, 941 - 948.

ABOU AKKADA, A.R., P.N., HOBSON, HOBSEN & B.H. HOWARD, 1959.  
Carbohydrate Fermentation by rumen oligotrich protozoa of the genus Entodinium. Biochem. J. 73, 44p - 45p.

ABOU AKKADA, A.R. & B.H., HOWARD, 1960.  
The biochemistry of rumen protozoa. Biochem. J. 76, 445 - 451.

ABOU AKKADA, A.R. & K., EL - SHAZLY, 1964.  
Effect of absense of ciliate protozoa from the rumen on microbial activity and growth of lambs. Appl. Microbiol. 12, 384 - 390.

ALEXANDER, P. & R.J., BLOCK, 1960.  
"A laboratory manual of analytical methods of protein chemistry including polypeptides," p. 8 Pergamon press, New York.

AL - RABBAT, M.F., R.L., BALDWIN & W.C., WEIR, 1971.  
In vitro <sup>15</sup>nitrogen-tracer technique for some kinetic measures of ruminal ammonia. J. Dairy Sci. 54, 1150 - 1161.

ASH, R. & G.D., BAIRD, 1973.  
Activation of volatile fatty acids in bovine liver and rumen epithelium. Biochem. J. 136, 311 - 319.



AW, S.E., 1966.

Separation of urinary isoamylases on cellulose acetate.

Nature 209, 298 - 300.

BAILEY, R.W., R.T.J., CLARKE & D.E., WRIGHT, 1962.

Carbohydases of the rumen ciliate Epidinium ecaudatum (Crawley).

Biochem. J. 83, 517 - 523.

BAILEY, R.W. & B.D.E., GAILLARD, 1965.

Carbohydases of the rumen ciliate Epidinium ecaudatum (Crawley).

Biochem. J. 95, 758 - 766.

BARNETT, A.J.G. & R.L., REID, 1961.

"Reactions in the rumen", Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.

BECKMAN AMINO ACID ANALYZER INSTRUCTION MANUAL, 1966, Model

120 C amino acid analyzer, Beckman Instruments Inc.

BORHAMI, B.E.A., K., EL - SHAZLY, A.R., ABOU AKKADA & I.A.,  
AHMED, 1967.

Effects of early establishment of ciliate protozoa in the rumen on  
microbial activity and growth of early weaned buffelo calves.

J. Dairy Sci. 50, 1654 - 1660.

BREWER, J.M., A.J., PESCE & R.B., ASHWORTH, 1974.

"Experimental techniques in biochemistry", p. 137 - 141

Prentice - Hall, inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

BROAD, T.E. & R.M.C., DAWSON, 1975.

Phospholipid biosynthesis in the anaerobic protozoan Entodinium  
caudatum. Biochem. J. 146, 317 - 328.

BRUNO, C.F. & W.E.C., MOORE, 1962.

Fate of lactic acid in rumen ingesta. J. Dairy Sci. 45, 109 - 115.

CHAPLIN, R.K. & G.A., JONES, 1973.

Rumen microbial changes during experimental rumen acidosis.

J. Dairy Sci. 56, 671.

CHAPULA, W., 1975.

Rumen bypass and protection of proteins and amino acids.

J. Dairy Sci. 58, 1198 - 1218.

CHRISTIANSEN, W.C., R., KAWASHIMA & W., BURROUGHS, 1965.

Influence of protozoa upon rumen acid production and liveweight gains  
in lambs. J. Anim. Sci. 24, 730 - 734.

CHRISTIE, A.O. & J.W., PORTEOUS, 1957.

An invertase from the holotrich protozoa of sheep rumen liquor.

Biochem. J. 67, 19p.

CHRISTOPHER, G., C.N., RAYMOND & J.H., MOORE, 1973.

Food particles as a site for biohydrogenation of unsaturated fatty  
acids in the rumen. Biochem. J. 132, 829 - 832.

CLARK, J.H., 1975.

Lactational responses to postruminal administration of proteins and amino acids. J. Dairy Sci. 58, 1178 - 1197.

CLEMENS, E., W., WOODS & V., ARTHAUD, 1974a.

The effect of feeding unsaturated fats as influenced by gelatinized corn and by the presence or absence of rumen protozoa I. Serum lipid composition. J. Anim. Sci. 38, 634 - 639.

CLEMENS, E., W., WOODS & V., ARTHAUD, 1974b.

The effect of feeding unsaturated fats as influenced by gelatinized corn and by the presence or absence of rumen protozoa. II. Carcass lipid composition. J. Anim. Sci. 38, 640 - 645.

COLEMAN, G.S., 1967a.

The metabolism of free amino acids by washed suspensions of the rumen ciliate Entodinium caudatum. J. Microbiol. 47, 433 - 447.

COLEMAN, G.S., 1967b.

The metabolism of the amina acids of Escherichia coli and other bacteria by the rumen ciliate Entodinium caudatum. J. Gen. Microbiol. 47, 449 - 464.

COLEMAN, G.S., 1968.

The metabolism of bacterial nucleic acid and of free components of nucleic acid by the rumen ciliate Entodinium caudatum. J. Gen. Microbiol. 54, 83 - 96.

COLEMAN, G.S., 1969.

The cultivation of the rumen ciliate Entodinium simplex.

J. Gen. Microbiol. 57, 81 - 90.

COLEMAN, G.S., & J.I., LAURIE, 1974a.

The metabolism of starch, glucose, amino acids, purines, pyrimidines and bacteria by three Epidenium spp. isolated from the rumen.

J. Gen. Microbiol. 85, 244 - 256.

COLEMAN, G.S. & J.I., LAURIE, 1974b.

The utilization of Bacillus megaterium and the release of a lytic enzyme by three Epidenium spp. isolated from the rumen.

J. Gen. Microbiol. 85, 257 - 264.

DEHORITY, B.A. & J.R., MALES, 1974.

Rumen fluid osmolality : evaluation of its influence upon the occurrence and numbers of holotrich protozoa in sheep.

J. Anim. Sci. 38, 865 - 870.

DIAMOND, P.S. & R.F. DENMAN, 1973.

"Laboratory techniques in chemistry and biochemistry." 2e uitgawe.

John Wiley & Sons, New York - Toronto.

DIXON, M. & E.C., WEBB, 1964.

"Enzymes", 2e uitgawe, p. 170 - 193. Longmans, London.

DU TOIT, J.E.J.

Persoonlike samesprekings. Resultate nie gepubliseer. 'n Studie van die proteïenbehoefte van Merino-ooie gedurende vroeë laktasie.

DU TOIT, P.J., 1976.

Isolation and partial characterization of a protease from Agave americana variegata. Biochim. et Biophys. Acta. 429, 895 - 911.

EADIE, J.M. & P.N., HOBSON, 1962.

Effect of the presence or absence of rumen ciliate protozoa on the total rumen bacterial count in lambs. Nature 193, 503 - 505.

EADIE, J.M. & J.C., GILL, 1971.

The effect of the absence of the rumen ciliate protozoa on growing lambs fed on a roughage - concentrate diet. Br. J. Nutr. 26, 155 - 167.

EVELEIGH, J.W. & G.D., WINTER, 1970.

"Protein Sequence Determination" (S.B. Needleman, Red.), p. 91 - 96. Springer-Verlag Berlin.

GABRIEL, O., 1971.

"Methods in enzymology", (W.B. Jakoby, Red.), Vol XXII, p. 578 - 604. Academic Press, New York.

GARRIGUS, U.S., H.H., MITCHELL, W.H., HALE & J.S., ALBIN, 1950.

The value of elemental sulfur in a methionine deficient sheep ration. J. Anim. Sci. 9, 656 - 657.

GIL, L.A., R.L., SHIRLEY & J.E., MOORE, 1973.

Effect of methionine hydroxy analog on growth, amino acid content and catabolic products of glucolytic rumen bacteria in vitro.

J. Dairy Sci. 56, 757 - 762.

GRELL, K.G., 1973.

"Protozoology" vertaalde weergawe uit Duits, New York.

HALE, W.H. & U.S., GARRIGUS, 1953.

Synthesis of cystine in wool from elemental sulfur and sulfate sulfur.

J. Anim. Sci. 12, 402.

HALLIWEL, G. 1957.

Cellulolytic preparations from micro-organisms of the rumen and from

Myrothecium verrucaria. J. Gen. Microbiol. 17, 166.

HALLIWELL, G. 1974.

"Methods of enzymatic analysis" (H.U. Bergmeyer, Red.) Vol III,  
p. 1143 - 1148, Academic Press, New York and London.

HOWARD, B.H., 1957a.

Hydrolysis of the soluble pentosans of wheat flour and Rhodymenia palmata by ruminal micro-organisms. Biochem. J. 67, 643 - 651.

HOWARD, B.H., 1957b.

Biochemical studies of individual genera of rumen holotrich protozoa.

Biochem. J. 67, 18p.

HOWARD, B.H., 1958.

The biochemistry of rumen protozoa (1). Carbohydrate fermentation by

Dasytricha and Isotricha. Biochem. J. 71, 671 - 675.

HOWARD, B.H., 1959.

The biochemistry of rumen protozoa 2. Some carbohydrases in cell-free extracts of Dasytricha and Isotricha. Biochem. J. 71, 675 - 680.

HUME, I.D., 1970.

Synthesis of microbial protein in the rumen. III. The effect of dietary protein. Aust. J. Agr. Res. 21, 305 - 314.

HUNGATE, R.E., 1966.

"The rumen and its microbes". Academic press inc., London.

JUNGE, J.M., E.A., STEIN, H., NEURATH & E.H.; FISHER, 1959.

The amino acid composition of  $\alpha$ -amylase from Bacillus subtilis.

J. Biol. Chem. 234, 556 - 561

KEENER, H.A., A.E., TEERI, R.V., HARRINGTON & R.R., BALDWIN,

1953. Metabolic fate of  $S^{35}$  in the lactating cow when fed  $S^{35}O_2$

preserved silage. J. Dairy Sci. 36, 1205.

KENNEDY, P.M., R.J., CHRISTOPHERSON & L.P., MILLIGAN, 1976.

The effect of cold exposure of sheep on digestion, rumen turnover time and efficiency of microbial synthesis. Br. J. Nutr. 36, 231 - 242.

KULWICH, R., L., STRUGLIA & P.B., PEARSON, 1957.

The metabolic fate of sulfur<sup>35</sup> in sheep. J. Nutr. 61, 113 - 126.

LEWIS, T.R. & R.S., EMERY, 1962.

Relative deamination rates of amino acids by rumen micro-organisms.

J. Dairy Sci. 45, 765 - 768.

LOFGREEN, C.P., W.C., WEIR & J.F., WILSON, 1953.

Gains in weight, nitrogen retention and wool growth of lambs fed a ration containing urea supplemented with sodium sulfate.

J. Anim. Sci. 12, 347 - 352.

MAENG, W.J. & R.L., BALDWIN, 1976a.

Factors influencing rumen microbial growth rates and yields : effects of urea and amino acids over time. J. Dairy Sci. 59, 643 - 647.

MAENG, W.J. & R.L., BALDWIN 1976b.

Factors influencing rumen microbial growth rates and yields : effect of amino acid additions to a purified diet with nitrogen from urea.

J. Dairy Sci. 59, 648 - 655.

MAENG, W.J., C.J., VAN NEVEL, R.L., BALDWIN & J.G., MORRIS, 1976. Rumen microbial growth rates and yields : effect of amino acid and protein. J. Dairy Sci. 59, 68 - 79.

MANGAN, J.L., 1972.

Quantitative studies on nitrogen metabolism in the bovine rumen.

Br. J. Nutr. 27, 261 - 283.

MANNING, B.M. & L.L., CAMPBELL, 1961.

Thermostable  $\alpha$ -amylase of Bacillus stearothermophilus. J. Biol. Chem. 236, 2952 - 2957.

MANWELL, R.D., 1961.

"Introduction to protozoology". Edward Arnold Publishers. London.



MARTIN, R.G. & B.N., AMES, 1961.

A method for determining the sedimentation behavior of enzymes :  
Application to protein mixtures. J. Biol. Chem. 236, 1372 - 1379.

McMENIMAN, N.P., D., BEN-GHEDALIA & R., ELLIOT, 1976.

Sulphur and cystine incorporation into rumen microbial protein.

Br. J. Nutr. 36, 571 - 574.

McNAUGHT, M.L., E.C., OWEN, K.M., HENRY & S.K., KON, 1954.

The utilization of non-protein nitrogen in the bovine rumen.

Biochem. J. 56, 151 - 156.

MERRICKS, D.L. & R.L., SALSBURY, 1975.

The rate of catabolism of sulfur amino acids by rumen micro-organisms.

J. Dairy Sci. 58, 779.

MEYER, R.M., E.E., BARTLEY, C.W., DEYOE & V.F., COLENBRANDER,  
1967. Feed processing. I. Ration effects on rumen microbial protein  
synthesis and amino acid composition. J. Dairy Sci. 50, 1327 - 1332.

MOULD, D.L. & G.J., THOMAS, 1957.

Amylases of holotrich protozoa from sheep rumen. Biol. J. 67, 18p.

MOULD, D.L. & G.J., THOMAS, 1958.

The enzymic degradation of starch by holotrich protozoa from sheep rumen.

Biochem. J. 69, 327 - 337.

MUTH, O.H. & J.E., OLDFIELD, 1969.

"Symposium : sulfur in nutrition" Avi publishing company, inc.,  
Westport, Connecticut.

MUUS, J. & J.M., VNENCHAK, 1964.

Isozymes of salivary amylase. *Nature* 204, 283 - 285.

NAGA, M.A. & K., EL - SHAZLY, 1968.

The metabolic characterization of the ciliate Eudiplodinium medium  
from the rumen of buffelo. J. Gen. Microbiol. 53, 305 - 315.

NEUDOERFFER, T.S., D.B., DUNCAN & F.D., HORNEY, 1971.

The extent of release of encapsulated methionine in the intestine of  
cattle. Br. J. Nutr. 25, 333 - 341.

NOLTMANN, E.A., T.A., MAHOWALD & S.A., KUBY, 1962.

Studies on adenosine triphosphate transphosphorylases II. Amino  
acid - composition of adenosine triphosphate - creatine transphosphory-  
lase. J. Biol. Chem. 237, 1146 - 1154.

OLTJEN, R.R., 1969.

Effects of feeding ruminants non-protein nitrogen as the only nitrogen  
source. J. Anim. Sci. 28, 673 - 682.

OXFORD, A.E., 1958.

Some observations of the culture of the rumen ciliate Epidinium  
ecaudatum Crawley occuring in quantity in cows fed on red clover.  
New Zealand J. Agr. Res. 1, 809 - 824.

PHILLIPSON, A.T., 1969.

"Physiology of digestion and metabolism in the ruminant." Oriel  
press Ltd., England.

PLUMMER, D.T., 1971.

"An introduction to practical biochemistry."

McGraw-Hill, U.K.

POUNDEN, W.D., L.C., FERGUSON & J.W., HIBBS, 1950.

The digestion of rumen micro-organisms by the host animals.

J. Dairy Sci. 33, 565 - 572.

POUNDEN, W.D. & J.W., HIBBS, 1950.

The development of calves raised without protozoa and certain other  
characteristic rumen micro-organisms.

J. Dairy Sci. 33, 639 - 644.

PURSER, D.B. & S.M., BUECHLER, 1966.

Amino acid composition of rumen organisms. J. Dairy Sci.

49, 81 - 84.

RICK, W. & H.P., STEGBAUER, 1974.

"Methods of enzymic analysis." (H.U. Bergmeyer, Red.) Vol 11,

p. 885 - 888, Academic press, New York and London.

SASAKI, T., B., ABRAMS & B.L., HORECKER, 1975.

A fluorometric method for the determination of the tryptophan

content of proteins. Anal. Biochem. 65, 396 - 404.

SCHWAB, C.G., A.B., CLAY & L.D., SATTER, 1975.

Determination of limiting amino acids for lactating dairy cows.

J. Dairy Sci. 58, 778.

SINGH, U.B., A., VARMA, D.N., VERMA & S.K. RANJHAN, 1974.

Measurements in vivo of the rate of production of protozoa in the

rumen. J. Dairy Res. 41, 299 - 303.

SLEIGH, M., 1973.

"The biology of protozoa." William Claves & Sons Ltd. London.

SOKAL, R.R. & F.J., ROHLF, 1969.

"Biometry", p. 224 - 225, W.H. Freeman and company,

San Francisco.

STEIN, E.A., J.M., JUNGE & E.H., FISHER, 1960.

The amino acid composition of  $\alpha$ -amylase from Aspergillus oryzae.

J. Biol. Chem. 235, 371 - 378.

STREET, H.V., 1963.

"Methods of enzymatic analysis" (H.U. Bergmeyer, Red.)

p. 854, Academic press, New York and London.

TRAUTMAN, R., 1964.

"Instrumental Methods of Experimental Biology" (D.W. Newman, Red.),

p. 211 - 275, MacMillan Co., New York.

- ULYATT, M.J., J.C., MACRAE, R.T.J., CLARKE & P.D., PEARCE, 1975.  
Quantitative digestion of fresh herbage by sheep.  
J. Agric. Sci. 84, 453 - 458.
- VALLEE, B.L., E.A., STEIN, W.N., SUMMERWELL & E.H., FISHER,  
1959. Metal content of  $\alpha$ -amylase of various origins.  
J. Biol. Chem. 234, 2901 - 2905.
- VOGEL, A.I., 1968.  
"A text-book of quantitative inorganic analysis including elementary  
instrumental analysis", 3de uitgawe p. 234, Longmans, London.
- WELLER, R.A. & A.F., PILGRIM, 1974.  
Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of sheep  
and from a continuous in vitro fermentation system. Br. J. Nutr.  
32, 341 - 351.
- WHITAKER, J.R., 1974.  
"Food related enzymes". p. 8 - 25, American Chemical Society,  
Washington.
- WHITELOW, F.G., J.M., EADIE, S.O., MANN & R.S., REID, 1972.  
Some effects of rumen ciliate protozoa in cattle given restricted  
amounts of a barley diet. Br. J. Nutr. 47, 425 - 437.
- WOLF, R.O. & L.L., TAYLOR, 1967.  
Isoamylases of human parotid saliva. Nature 213, 1128 - 1129.

YOKOYAMA, M.T., J.R., CARLSON & E.O., DICKINSON, 1973.

Ruminal fluid and plasma concentrations of 3- methylindole associated with tryptophaninduced, acute bovine pulmonary emphysema. J. Dairy Sci. 56, 671.

