

Saanen Keçi ve Oğlaklarında Spot Örneklemeye İle İdrar Pürin Türevlerinden İnce Bağırsağa Geçen Mikrobiyal Azotun Belirlenmesi

Nurcan ÇETİNKAYA * Mustafa SALMAN *  Buğra GENÇ *

* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 55139 Kurupelit, Samsun - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2009-427

Özet

Araştırmada Saanen keçi ve oğlaklarında spot idrar örnekleme ile idrarla atılan purin türevlerinden ince bağırsağa geçen mikrobiyal N miktarı ve yem tüketiminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Denemede 3 yaşında 10 adet Saanen dişi keçi ile 1.5-2 aylık yaşta 10 adet Saanen dişi oğlak kullanılmıştır. Keçilerin ortalama canlı ağırlıkları 42±3 kg, oğlakların ise 7.5±2.5 kg olarak tespit edilmiştir. Keçilerin sabah ve akşam beslenmesinde karma yem ve kuru ot kullanılmıştır. Ayrıca keçiler meraya çıkarılmıştır. Oğlaklar ise sadece anne sütü ile beslenmiştir. Sabah yem tüketiminden sonra saat 10:00 ile 12:00 arasında Saanen keçi ve oğlaklarından idrar örnekleri toplanmıştır. Alınan idrar örneklerine 4 N H₂SO₄'den 0.5-1ml ilave edilerek idrarın pH değeri üçün altında olması sağlanmıştır. Keçilerden alınan spot idrar örneklerinde spektrofotometrik metotla ortalama allantoin, ürik asit, toplam purin türevleri (PT) ve kreatinin (K) değerleri sırasıyla 5.93±0.07, 1.91±0.10, 7.84±0.14 ve 5.75±0.08 mmol/L, oğlaklarda ise aynı sıra ile 4.70±0.09, 1.33±0.07, 6.33±0.11 ve 5.07±0.05 mmol/L olarak belirlenmiştir. Keçilerde ve oğlaklarda ince bağırsağa geçen mikrobiyal azot miktarı sırasıyla 8.45±0.13 ve 1.84±0.04 g N/gün hesaplanmıştır. Keçilerde sindirilebilir organik madde tüketimi 665.90±18.92 g olarak tespit edilmiştir. Spot idrar örneklemeyle bulunan sonuçlar değerlendirildiğinde bu çalışmadaki keçi ve oğlakların protein yönünden yetersiz beslendikleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak saha koşullarında, spot idrar toplanarak keçilerde protein beslenmesini tahmin etmekte purin türevleri: Kreatinin (PTK) indeksi kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Keçi, Oğlak, Spot örnekleme, İdrar purin türevleri, PTK indeks, Mikrobiyal N, Yem tüketimi

Estimation of the Microbial N Flow to Small Intestine in Saanen Goats and Kids Based on Urinary Excretion of Purin Derivatives by the Use of Spot Urine Sampling Technique

Summary

The objectives of the present study were to estimate the microbial N flow to small intestine and to predict the digestible organic matter intake in Saanen goats and kids based on urinary excretion of purin derivatives (PD) by the use of spot urine sampling technique under the field condition. In the experiment, 10 Saanen does (3 years of age) and 10 Saanen female kids (1.5-2 months of age) were used. The mean live weights of goats and kids were 42±3 kg and 7.5±2.5 kg respectively. Goats were fed by concentrates and grass hay in the morning and evening. They were also allowed to grazing throughout the day. Kids were only suckled milk from their mothers. After the morning feeding, spot urine samples from goats and kids were collected in between 10:00-12:00 a.m. Urine samples collected into a cup containing 0.5-1 ml of 4 N H₂SO₄ to keep the urine pH under 3. The levels of urine allantoin, uric acid and creatinine were determined by the use of spectrophotometric methods. The mean values of allantoin, uric acid, total PD and creatinine were 5.93±0.07, 1.91±0.10, 7.84±0.14 and 5.75±0.08 mmol/L of goats; 4.70±0.09, 1.33±0.07, 6.33±0.11 and 5.07±0.05 mmol/L of kids respectively. The estimated microbial N flow to small intestine for goats 8.45±0.13 g N/d and 1.84±0.04 g N/d for kids. Daily digestible organic matter intake in Saanen goats was estimated as 665.90±18.92 g/d. The estimated microbial N values show that protein nutrition of goats and kids seem insufficient under the field condition concerned. In conclusion, the prediction of protein nutrition of goats under the field condition may be possible by the use of spot urine sampling techniques, urinary excreted PD and purine derivatives: Creatinine (PDC) index.

Keywords: Goat, Kid, Spot sampling, Urinary purine derivatives, PDC index, Microbial N, Feed intake



İletişim (Correspondence)



+90 362 3121919/3893



msalman@omu.edu.tr

GİRİŞ

Purin türevleri (allantoin, ürik asit, hipoksantin, ksantin), adenin ve guanin bazlarının katabolizma ürünleri olarak pek çok memeli hayvanda idrarla atılmaktadır. İdrar purin türevleri; vücut dokularından sentezlenen (endojen) purinler, diyet ve mikrobiyal purinlerin katabolizmasından kaynaklanmaktadır. Rumen mikroorganizmaları nükleik asitler yönünden çok zengindir. Total azotun yaklaşık %18'ini nükleik asitler oluşturur. Bunun ise %11'ini purinler oluşturmaktadır. Rumen mikroorganizmaları ruminantlarda protein kaynağının önemli bir kısmını oluşturur. Normal bir besleme durumunda ince bağırsağa geçen proteinlerin %60-85'inin mikrobiyal kaynaklı olduğu ve retikulo-rumende sentezlendiği bildirilmektedir ¹. Bu durumda rumende mikrobiyal protein üretimini doğru olarak tahmin etmek suretiyle, çiftlik hayvanlarının verimlerine paralel olarak ortaya çıkan protein gereksiniminin karşılayacak dengeli rasyonların hazırlanmasına da olanak sağlanmış olacaktır ¹. Hayvanların tüketmiş oldukları her birim yem için sentezlemiş oldukları mikrobiyal protein genellikle, sindirilebilir organik madde tüketiminin (SOMT) her kg'ı için g olarak mikrobiyal-N üretimine dayanır. Rumende sindirilebilir her bir kg organik madde başına üretilen g mikrobiyal N miktarı yemlemeye bağlı olarak geniş bir aralıkta (14-60 g N/kg SOMT) farklılık göstermektedir ². Bunun nedeni ise rumen ortamı, rasyonların yapısı ve hayvanlar arası bireysel farklılıklar gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır.

Ruminantlarda gastrointestinal sistemde sentezlenen mikrobiyal purinler idrarla atılan total purin türevlerinin %80-90'nını oluşturur. Birçok araştırma, geniş getiren hayvan türleri arasında endojen purin türevlerinin miktar ve kompozisyon bakımından farklılıklar olduğunu göstermiştir. Ortalama günlük endojen kaynaklı idrarla atılan purin türevleri (PT) sığır ^{3,4}, manda ⁵ ve koyunlarda ³ sırasıyla yaklaşık 500, 210 ve 200 $\mu\text{mol/kg CA}^{0.75}$ olarak tespit edilmiştir. Sığır ve mandalar purin türevlerini allantoin formunda koyunlardan daha yüksek bir oranda (%83-96'ya karşı %37-86) idrarla atarlar. Hipoksantin + ksantin koyun idrarında önemli PT komponentidir (toplam purin türevlerinin sırasıyla %17 ve %5). Ancak sığır ve manda idrarında belirlenmemiştir. Endojen kaynaklı idrarla atılan PT'deki farklılıklar doku ve vücut sıvılarında purinlerin metabolizmasına dahil olan enzimlerin dağılımı ve aktiviteleri ile ilişkilendirilmektedir. Büyükbaş ruminantlar (sığır, zebu sığıru ve manda) ile küçükbaş ruminant (koyun, keçi) karşılaştırıldığında plazma ve dokulardaki ksantin oksidaz aktivitesi daha yüksektir ^{3,5}. Spot idrar örnekleme ile ilgili koyun ³ ve sığırlarda ⁶ idrarla atılan purin türevlerinden ince bağırsağa geçen mikrobiyal azotun belirlenmesi konusunda çalışma yapılmış olmasına rağmen Saanen keçi ve oğlaklarında böyle bir çalışma bulunmamaktadır.

Araştırmada saha şartlarında beslenen Saanen keçi ve oğlaklarında spot idrar örnekleme ile idrarla atılan purin türevlerinden rumende mikrobiyal protein miktarı ve yem tüketiminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan materyali

Bu araştırmada hayvan materyali olarak 3 yaşında 10 adet Saanen dişi keçisi ile 1.5-2 aylık yaşta 10 adet erkek Saanen oğlağı kullanılmıştır. Saanen keçilerinin ortalama canlı ağırlıkları 42.0 ± 3.0 kg, oğlakların ise 7.5 ± 2.5 kg olarak belirlenmiştir. Araştırmada Samsun Tekkeköy ilçesinin Çınaralan köyünde bulunan özel bir yetiştiricinin hayvanları denemeye alınmıştır.

Yem materyali ve hayvanların beslenmesi

Hayvanlara yem materyali olarak ticari karma yem ve kuru ot kullanılmıştır. Ayrıca keçiler meraya çıkarılmıştır. Keçilere günde yaklaşık olarak 0.5-0.75 kg karma yem (sabah+akşam), kuru ot ad libitum olarak verilmiştir. Hayvanlara günde üç kez su verilmiştir. İdrar örneklerinin toplandığı günlerde hayvanlar meraya gönderilmemiştir. Oğlaklar ise sadece anne sütü ile beslenmiştir. Oğlaklar anneleriyle meraya çıkmamıştır.

Spot idrar örneklerinin toplanması

Sabah 06:30 yemlemesinden sonra saat 10:00 ile 12:00 arasında Saanen keçi ve oğlaklarından idrar örnekleri spot (günün belirli saatinde alınan 5-10 ml idrar) olarak toplanmıştır. 22 ve 29 Şubat 2008; 7, 14, 21 ve 28 Mart 2008 tarihlerinde toplam altı kez idrar toplamaya gidilmiştir. Örnek toplamada özel yaptırılan cezve şeklinde uzun saplı kaplar kullanılmıştır. Alınan idrar örneklerine 4 N H₂SO₄'den 0.5-1 ml ilave edilerek idrarın pH değeri üçün altında olması sağlanmıştır. Seyreltme işlemi tamamlandıktan sonra idrarın yabancı maddelerden arındırılması için tülbenkten süzümüştür. Daha sonra -20°C'de derin dondurucuda analiz edilinceye kadar saklanmıştır. İdrar örnekleri allantoin için 1/30, ürik asit için 1/5 ve kreatinin için 1/15 oranlarında analizlerden önce seyreltilmiştir ¹.

Yem maddelerinin ham besin madde bileşiminin belirlenmesi

Kullanılan yem maddelerinin ham besin madde miktarları A.O.A.C.'de ¹ bildirilen analiz metotlarına göre belirlenmiştir.

Purin türevleri ve mikrobiyal N'un belirlenmesi

Purin türevlerinin analizleri kinetik UV visible spektrofotometre cihazı (Shimadzu, 1700) kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 1. Yem ham maddelerin besin madde kompozisyonu (%)**Table 1.** The nutrient composition of feeds (%)

Yem maddeleri	Organik madde	Ham protein	Ham kül
Karma yem	91.95	10.98	2.55
Kuru ot	91.31	9.40	5.60

tır. Optik dansiteler allantoin 522 nm, ürik asit 293 nm ve kreatinin 505 nm dalga boylarında ölçülmüştür ¹.

a) PTK indeksinin hesaplanması: İdrardaki toplam purin türevleri ve idrardaki kreatinin konsantrasyonu hesaplanarak belirlenmiştir. PTK indeksi için aşağıdaki denklem kullanılmıştır ¹.

$$\text{PTK indeksi} = (\text{PT}/\text{K}) \times \text{CA}^{0.75}$$

PT: purin türevleri

K: kreatinin

CA: vücut ağırlığı (kg)

b) İdrarla atılan toplam purin türevlerinin hesaplanması (PTia): Keçilerde ortalama günlük kreatinin atılımı 440 µmol/kg CA^{0.75} alınmıştır ⁸.

$$\text{İdrarla atılan purin türevleri (PTia)} = \text{PTK} \times \text{K}$$

$$\text{İdrarla günlük ortalama kreatinin atılımı (K)} = 440 \mu\text{mol/kg CA}^{0.75}$$

c) Günlük absorbe edilen purin türevlerinin hesaplanması (X): Günlük purin absorpsiyonunun belirlenmesi için aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir ¹.

$$Y = 0.84X + (0.150\text{CA}^{0.75}e^{-0.25X} - Y)$$

$$X_{(n+1)} = X_n - \frac{f(X_n)}{f'(X_n)}$$

$$f(X) = 0.84X + 0.150\text{CA}^{0.75}e^{-0.25X} - Y$$

$$f'(X) = 0.84 - 0.038\text{CA}^{0.75}e^{-0.25X}$$

X: purinlerin absorpsiyonu (mmol/gün)

Y= İdrarla atılan purin türevleri (mmol/gün)

Purinlerin absorpsiyonu için, başlangıç değeri (X₁); X₁ = Y/0.84 denkleminden hesaplandı. Daha sonra bulunan X₁ değeri denklemde yerine konularak X₂, X₂ denklemde yerine konularak X₃ değeri ve aynı şekilde devam edilerek X₄, X₅...X_n hesaplanır. İşlem sürdürüldüğünde X_n sabit bir değere ulaşılır. Elde edilen bu değer absorbe edilen mikrobiyal purinlerin miktarıdır.

d) Bağırsaklara geçen mikrobiyal N'un hesaplanması

d.1) İnce bağırsaklara geçen mikrobiyal N miktarının hesaplanmasında kullanılan faktörler;

Mikrobiyal purinlerin sindirilebilirliği 0.83 olarak kabul edilmektedir ¹.

Mikrobiyal kaynaklı purinlerin N içeriği 70 mg/g mmo'l'dür.

$$\text{Purin N/toplam mikrobiyal N} = 11.6/100 = 0.116' \text{dir} ¹.$$

$$\text{Mikrobiyal N (g N/gün)} = \frac{X(\text{mmol/gün}) \times 70}{0.116 \times 0.83 \times 1000}$$

$$\text{Mikrobiyal N (g N/gün)} = 0.727X (1)$$

d.2) İnce bağırsaklara geçen mikrobiyal N miktarının hesaplanmasında kullanılan faktörler;

Mikrobiyal purin bazların gerçek sindirilebilirliği 0.92 ve keçilerin rumeninden ekstrakte edilen mikrobiyal popülasyondaki purin bazları (164 µmol/g KM) ve N miktarı (83.8 mg/g KM) arasındaki oran 1.97'dir.

$$\text{Mikrobiyal N (g N/gün)} = X / (0.92 \times 1.97) ⁹$$

e) Sindirilebilir organik madde tüketimi (SOMT): Sığırlar için kullanılan formülden yararlanılarak sindirilebilir organik madde değeri hesaplanmıştır.

$$\text{SOMT} = 59.7 \times \text{PTK} - 678 ¹$$

İstatistik Analizler

Tanıttıcı istatistiklerden ortalama ve standart hatalar hesaplanmıştır. Ayrıca değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi amacıyla Pearson korelasyon analizi uygulanmıştır ¹⁰.

BULGULAR

Saanen keçi ve oğlaklarında alınan idrar örneklerinde purin türevleri ve kreatinin konsantrasyonu **Tablo 2'**de PTK indeksi, idrarla atılan PT (PTia), absorbe edilen PT, mikrobiyal N ve sindirilebilir organik madde tüketimi **Tablo 3'**te verilmiştir.

Tablo 2. Keçi ve oğlaklardan alınan spot idrar örneklerinde ortalama allantoin, ürik asit, toplam PT ve kreatinin değerleri**Table 2.** The value of allantoin, uric acid, creatinin and total PT in spot urine samples of goats and kids

Purin türevleri	Oğlak (n=10)	Keçi (n=10)
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
Allantoin (mmol/L)	4.70±0.09	5.93±0.07
Ürik asit (mmol/L)	1.33±0.07	1.91±0.10
Toplam PT (mmol/L)	6.33±0.11	7.84±0.14
Kreatinin (mmol/L)	5.07±0.05	5.75±0.08

Tablo 3. Keçi ve oğlaklarda pürin türevleri indeksi, idrarla atılan pürin türevleri, absorbe edilen pürin türevleri, mikrobiyal N ve sindirilebilir organik madde tüketim değerleri

Table 3. The purine derivatives index, urinary excretion of purine derivatives, absorbed purine derivatives, microbial N, digestible organic matter intake values in goats and kids

Purin türevleri	Oğlak (n=10)	Keçi (n=10)
	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	$\bar{X} \pm S\bar{x}$
PTK indeksi (mmol/gün)	5.66±0.10	22.51±0.32
PT _{ia} (mmol/gün)	2.49±0.04	9.91±0.14
PT _{ab} (mmol/gün)	2.54±0.06	11.63±0.17
MN ^a (g N/gün)	1.84±0.04	8.45±0.13
MN ^b (g N/gün)	1.81±0.03	7.18±0.10
SOMT (g)	-	665.90±18.92

PTK indeksi: Pürin türevleri indeksi; **PT_{ia}:** İdrarla atılan pürin türevleri; **PT_{ab}:** Absorbe edilen pürin türevleri; **MN:** Mikrobiyal azot; **a:** MN kaynak 1'e göre hesaplandı; **b:** MN kaynak 9'a göre hesaplandı; **SOMT:** Sindirilebilir organik madde tüketimi

TARTIŞMA ve SONUÇ

Keçilerden alınan spot idrar örneklerinde ortalama allantoin, ürik asit, toplam purin türevleri ve kreatinin değerleri sırasıyla 5.93, 1.91, 7.84 ve 5.75 mmol/L, oğlaklarda ise aynı sıra ile 4.70, 1.33, 6.33 ve 5.07 mmol/L olarak belirlenmiştir. Jetana ve ark.¹¹ Brahman sığırları ile ilgili yaptıkları araştırmada spot örnekleme ile idrarla atılan purin türevleri, toplam allantoinin mikrobiyal protein sentezinin hesaplanmasında alternatif bir metot olarak kullanılabileceğini belirtmiştir. Bu çalışmada allantoin ile mikrobiyal protein arasında pozitif bir korelasyon ($r=0.78$, $P<0.01$) bulunmuştur. Keçilerde mikrobiyal N ve sindirilebilir organik madde tüketimi sırasıyla 8.45 g N/gün ve 665.90 g olarak tespit edilmiştir. Laurent ve ark.¹² keçilerde idrarla atılan allantoinin sindirilebilir organik madde tüketimi ile korelasyon içinde olduğunu ve rumende mikrobiyal protein sentezinin bir indeksi olarak idrarla atılan allantoinin kullanılabileceğini belirtmiştir. Saanen keçi ve oğlaklarında yapılan bu çalışmada da allantoin ile sindirilebilir organik madde miktarı arasındaki korelasyonun yüksek olduğu ($r=0.86$, $P<0.01$) belirlenmiştir. Yem tüketimi¹³ ve mikrobiyal N¹⁴ miktarları idrarla atılan sadece allantoinin tayiniyle hesaplanmıştır. İdrarla atılan toplam purin türevlerinde allantoin oranı %80 -%85 arasında değişmektedir^{13,14}.

Spot idrar örneklerinde purin türevlerinin kreatinin konsantrasyonuna oranı, idrarla günlük atılan kreatinin oranı bilindiği takdirde, günlük idrarla atılan purin türevleri için iyi bir göstergedir¹⁵. Spot idrarda toplam purin türevlerinin kreatinine oranı metabolik canlı ağırlıkla çarpıldığında PTK indeksi elde edilmekte ve bu değerden idrarla atılan günlük toplam purin türevleri hesaplanmaktadır^{1,6}. İdrarla atılan kreatinin, protein tüketimi¹⁶ ve

rasyonda protein niteliğinde olmayan azot miktarı¹⁷ gibi rasyona bağlı faktörlerden çok az etkilenir. Böylece hayvanın vücut ağırlığından idrarla günlük atılan kreatinin hesaplanabilir. Günlük idrar hacmi, günde toplanan bir idrar örneğinde (spot örnek) kreatinin konsantrasyonundan hesaplanabilir ve hesaplanmış idrar hacminden idrarla atılan ürik asit ve allantoin hesaplanabilir.

Birçok araştırmacı^{18,19} ruminantlarda (süt ineği ve koyun) bağırsaklara geçen mikrobiyal N ile idrarla atılan purin türevleri arasında yüksek bir korelasyon ($R^2 = 0.97$) olduğunu belirtmişlerdir. Saanen keçi ve oğlaklarında yapılan bu çalışmada da idrarla atılan purin türevleri ile bağırsaklara geçen mikrobiyal N arasında pozitif bir korelasyon ($r=0.63$, $P<0.05$) bulunmuştur. Süt ineklerinde duodenum içeriğinin purin miktarı kullanılarak hesaplanan mikrobiyal N ile idrarla atılan purin türevleri arasında lineer bir korelasyon gösterilmiştir²⁰.

Keçilerde sığır ve koyunlarda olduğu gibi idrarla atılan purin türevlerine dayanan ince bağırsağa geçen mikrobiyal azotun hesaplanmasında kullanılacak bir model ve PTK indeks değerleri oluşturulmalıdır. Özellikle keçilerde hem türler arasında hem de farklı besleme koşullarında belirlenmiş ince bağırsağa geçen mikrobiyal azotun miktarları konusunda daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Ancak koyun ve sığırlara göre saha şartlarında keçilerden idrar toplamadaki güçlükler araştırma yapılmasını sınırlamaktadır.

Spot idrar örneklemeyle bulunan sonuçlar değerlendirildiğinde, bu çalışmada kullanılan keçi ve oğlakların protein yönünden yetersiz beslendikleri tespit edilmiştir. Ayrıca hesaplanan sindirilebilir organik madde tüketim miktarı keçilere günlük olarak verilen yem miktarı ile yakın bulunmuştur. Spot idrar örnekleme ile yetiştirici elinde bulunan meraya da çıkarılan doğal besleme koşullarındaki keçilerde idrar purin türevlerinin tayini ve PTK indeksinin kullanılmasıyla protein beslenmesinin kontrolü yapılabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın materyali, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen VET 052 nolu projedeki hayvanlardan temin edilmiştir. Materyal alımına müsaade eden Proje yürütücüsü ve araştırmacılarına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. IAEA: A training package the technique for estimating microbial protein supply in ruminants based on determination on purine derivatives in urine. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Applications in Food and Agriculture. Vienna, Austria, 2003.

- 2. Agricultural Research Council (ARC):** The nutrient requirements of ruminant livestock. Suppl. No.1, Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, 1984.
- 3. Chen XB, Orskov ER, Hovell FD DeB:** Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion, differences between cattle and sheep. *Br J Nutr*, 63, 121-129, 1990.
- 4. Fujihara T, Orskov ER, Reeds PJ, Kyle DJ:** The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric infusion. *J Agric Sci Camb*, 109, 7-12, 1987.
- 5. Samaraweera L, Orskov ER, Chen XB:** Preliminary studies on purine derivatives excretion in buffaloes. Proceeding of the 1st. Asian Buffalo Association Congress. Thailand: Koen Kaen, pp.17-21, 1994.
- 6. Cetinkaya N, Yaman S, Baber NHO:** The use of purine derivatives/creatinine ratio in spot urine samples as an index of microbial protein supply in Yerli Kara crossbred cattle. *Livest Sci*, 100, 91-98, 2006.
- 7. AOAC:** Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th ed. Inc, Arlington, Virginia, 1984.
- 8. Yáñez Ruiz DR, Martín García AI, Moumen A, Molina Alcaide E:** Ruminant fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on olive leaves. *J Anim Sci*, 82, 3006-3014, 2004.
- 9. Belenguer A, Yanez D, Balcells J, Ozdemir Baber NH, Gonzalez Ronquillo M:** Urinary excretion of purine derivatives and prediction of rumen microbial outflow in goats. *Livest Prod Sci*, 77, 127-135, 2002.
- 10. SAS Statistical Software:** SAS Compusdrive, Carry, NC 27513 USA, 2007.
- 11. Jetana T, Suthikrai W, Usawang S, Kijsamrej S, Sophon S:** The use urinary purines excreted in the urine for prediction microbial protein production from the rumen: Using spot sampling for the prediction microbial protein from the rumen of Brahman Cattle. The 4th Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference 60th Veterinary Anniversary Building, Chulalongkorn University, 2005.
- 12. Laurent F, Vignon B:** Factors of variations in urinary excretion of allantoin in sheep and goats. *Anim Sci*, 64, 281-282, 1983.
- 13. Linberg JE:** Urinary allantoin excretion and digestible organic matter intake in dairy goats. *Swed J Agric Res*, 15, 31-37, 1985.
- 14. Brun-Bellut J, Linberg JE, Hadjipanayiotou M:** Protein Nutrition and Requirements of Adult Dairy Goats. In, Morand-Fehr P (Ed): Goat Nutrition. EAAP Publ. No.46, Pudoc Wageningen Netherlands, pp. 82-93, 1991.
- 15. Valadares RFD, Broderick GA, Valadares Filho SC, Clayton MK:** Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J Dairy Sci*, 82, 2686-2696, 1999.
- 16. Kertz AF, Prewitt LR, Lane AG, Campbell JR:** Effect of dietary protein intake on creatinine excretion and the creatinine-nitrogen ratio in bovine urine. *J Anim Sci*, 30, 278-282, 1968.
- 17. Susmel P, Spanghero M, Stefanon B, Mills CR:** Nitrogen balance and partitioning of some nitrogen catabolites in milk and urine of lactating cows. *Livest Prod Sci*, 44, 209-219, 1995.
- 18. Puchala R, Kulasek GW:** Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and urinary excretion of purine derivatives. *Can J Anim Sci*, 72, 821-830, 1992.
- 19. Gonzalez-Ronquillo M, Balcells J, Belenguer A, Castrillo C, Mota M:** A comparison of purine derivatives excretion with conventional methods as indices of microbial yield in dairy cows. American Dairy Science Association. *J Dairy Sci*, 87, 2211-2221, 2004.
- 20. Gonzalez-Ronquillo M, Balcells J, Guada JA, Vicente F:** Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. American Dairy Science Association. *J Dairy Sci*, 86, 1282-1291, 2003.