Utjecaj izvora sporootpuštajuće ureje na ukupnu probavljivost proteina, škroba i vlakana u tovnih junica

Majerić, Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:100159

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

UTJECAJ IZVORA SPOROOTPUŠTAJUĆE UREJE NA UKUPNU PROBAVLJIVOST PROTEINA, ŠKROBA I VLAKANA U TOVNIH JUNICA

DIPLOMSKI RAD

Josip Majerić

Zagreb, srpanj, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Hranidba životinja i hrana

UTJECAJ IZVORA SPOROOTPUŠTAJUĆE UREJE NA UKUPNU PROBAVLJIVOST PROTEINA, ŠKROBA I VLAKANA U TOVNIH JUNICA

DIPLOMSKI RAD

Josip Majerić

Mentor: doc. dr. sc. Kristina Kljak

Zagreb, srpanj, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Josip Majerić**, JMBAG 0178079430, rođen 25.03.1991. u Koprivnici, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

UTJECAJ IZVORA SPOROOTPUŠTAJUĆE UREJE NA UKUPNU PROBAVLJIVOST PROTEINA, ŠKROBA I VLAKANA U TOVNIH JUNICA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Josipa Majerića**, JMBAG 0178079430, naslova

UTJECAJ IZVORA SPOROOTPUŠTAJUĆE UREJE NA UKUPNU PROBAVLJIVOST PROTEINA, ŠKROBA I VLAKANA U TOVNIH JUNICA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	Doc. dr. sc. Kristina Kljak	mentor	_____
2.	Prof. dr. sc. Darko Grbeša	član	_____
3.	Izv. prof. dr. sc. Krešimir Salajpal	član	_____

ZAHVALA

Želio bih iskoristiti ovu priliku da se zahvalim svim profesorima Agronomskog fakulteta u Zagrebu, koji su mi kroz ove godine studija nesebično prenosili svoja znanja i iskustva kroz stručna predavanja.

Zahvaljujem se cijenjenim članovima povjerenstva prof. dr. sc. Darku Grbeši i izv. prof. dr. sc. Krešimiru Salajpalu koji su mi pomagali tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Posebno se želim zahvaliti mentorici doc. dr. sc. Kristina Kljak koja mi je neizmjerno pomogla preporukama, savjetima i svojom profesionalnošću te osmišljavanju moga konačnog diplomskog radu koji je kao takav prezentiran obuhvaća stečena teorijska i praktična znanja u sustavu hranidbe na vlastitom obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu.

Zahvaljujem se svojim roditeljima na podršci i vjeri u moj uspjeh.

Sadržaj

1. UVOD 0

1.2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA 1

2. PREGLED LITERATURE 2

2.1. PROBAVA PROTEINA U PREŽIVAČA 2
2.1.1. Mikrobna razgradnja proteina u predželucima 2
2.1.2. Potrebe za razgradljivim proteinom 3
2.1.3. Razgradljivost proteina krmiva 4
2.1.4. Fermentirajuća organska tvar 5
2.3.1. Urea kao izvor dušika 6
2.3.2. Zaštićena urea 7
2.4. PROBAVLJIVOST 7

3. MATERIJALI I METODE 9

3.1. JUNICE I UVJETI DRŽANJA 9
3.2. HRANIDBENI TRETMANI 10
3.3. DIZAJN POKUSA I SAKUPLJANJE UZORKA 12
3.4. KEMIJSKE ANALIZE 14
3.4.1. Određivanje sadržaja vlage 14
3.4.2. Određivanje sadržaja sirovog proteina 14
3.4.3. Određivanje sadržaja neutralnih detergent vlakana 14
3.4.4. Određivanje sadržaja škroba 15
3.4.5. Određivanje sadržaja vodotopivog proteina 15
3.4.6. Određivanje sadržaja kroma 16
3.4.7. Određivanje pH fecesa 16
3.4.8. Određivanje koncentracije ureje u krvi 16
3.5. PROBAVLJIVOST 17
3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 17

4. REZULTATI I RASPRAVA 18

4.1 PROMJENA PH FECESA KROZ 24 SATA 19
4.2 PROBAVLJIVOST HRANJIVIH TVARI 20
4.3 UREJA U KRVI 21

5. ZAKLJUČAK 23

6. POPIS LITERATURE 24

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Josipa Majerića**, naslova

UTJECAJ IZVORA SPOROOTPUŠTAJUĆE UREJE NA UKUPNU PROBAVLJIVOST PROTEINA, ŠKROBA I VLAKANA U TOVNIH JUNICA

U intenzivnoj hranidbi preživača ureja se koristi kao najjeftiniji izvor neproteinskog dušika za mikroorganizme buraga. Cilj ovoga rada je usporediti utjecaj sporootpuštajuće ureje iz dodataka Ubea 70 (70% ureje, 28% bentonita i 2% S; Petrokemija Kutina, RH) i one zaštićene lipidima iz dodatka Optisync™ (88% ureje i 11,2% lipida; Alltech, Nicholasville, SAD) na ukupnu probavljivost sirovih proteina, vlakna, škroba i suhe tvari obroka tovnih junica. Četiri tovne junice pasmine Simmental, u prosjeku teške 380 kg i stare 12,5 mjeseci na početku pokusa, raspoređene su na dva različita dodatka u obroku prema cross-over dizajnu u dva perioda od po 18 dana. Obroci sa oba dodatka sastojali su se od istih krmiva sa 50%:50% omjerom voluminoze i koncentratne krme te 0,7% ureje, a kao indikator probavljivosti korišten je kromov(III)-oksid. Junice hranjene dodatkom Optisync™ u usporedbi s junicama hranjenim dodatkom Ubea 70 bolje su probavljale ($P<0,05$) sirovi protein (68,6% vs. 59,4%), ukupna vlakna (49,1% vs. 33,2%) i suhu tvar (72,1% vs. 63,1%). S druge strane, dodatak Ubea 70 ima tendenciju za 1,27% više probavljivosti škroba. Izvor sporootpuštajuće ureje nije utjecao na pH fecesa niti razinu ureje u krvi, iako brojčane razlike upućuju da dodatak OptiSync™ u obroku pokazuje ujednačenije otpuštanje ureje u buragu nego dodatak Ubea 70.

Ključne riječi: tovne junice, ureja, probavljivost, protein, vlakna

Summary

Of the master's thesis – student **Josip Majerić,** entitled

EFFECT OF SLOW-RELEASE UREA SOURCE ON TOTAL TRACT DIGESTIBILITY OF PROTEIN, STARCH AND FIBER IN FATTENING HEIFERS

Urea is a low-cost source of nonprotein nitrogen for rumen microorganism in intensive cattle production. The aim of this study was to compare effect of slow-release urea source Ubea 70 (70% urea, 28% bentonite and 2% S; Petrokemija Kutina, Croatia) and lipid-coated urea from Optisync™ (88% urea and 11,2% lipids; Alltech, Nicholasville, USA) on total tract digestibility of crude protein, fiber, starch and dry matter of ration fed to fattening heifers. Four fattening Simmental heifers, in average 380 kg of body weight and 12.5 months of age at the beginning of the trial, were assigned to two ration additives in a cross-over design with two 18-day periods. Rations with both additives had same feed ingredients in 50%:50% forage:concentrate ratio, and contained 0.7% of urea, while chromium (III) oxide was added as digestibility indicator. Heifers fed Optisync™, compared to heifers fed Ubea 70, had higher digestibility ($P<0.05$) of crude protein (68.6% vs. 59.4%), NDF (49.1% vs. 33.2%) and dry matter (72.1% vs. 63.1%). On the other side, Ubea 70 had a tendency for 1.27% higher starch digestibility. Source of slow-release urea did not affect fecal pH and concentration of urea in blood, although value differences imply that OptiSync™ had the more continuous release of urea in rumen than Ubea 70.

Keywords: fattening heifers, urea, digestibility, protein, fiber

1. Uvod

Tovna junad loše iskorištava energiju i proteine te treba oko 6 kg hrane za kilogram prirasta, pa je zato izuzetno važna hranidba sa što jeftinijim krmivima za ekonomičnost proizvodnje. Zahvaljujući mikrobima buraga junad iskorištava jeftinu voluminoznu krmu i još jeftinije neproteinske izvore dušika. Nadalje, u hranidbi junadi, odnosno preživača proteini mikroba buraga, a ne hrane, su glavni izvor aminokiselina za metabolizam životinje. Isto tako mikrobi buraga su glavni u probavi hranjivih tvari, osobito vlakana u čijoj fermentaciji glavnu ulogu imaju celulolitičke bakterije, kojima je glavni izvor dušika amonijak. Mikrobi buraga mogu sintetizirati, za razliku od životinje, sve aminokiseline iz neproteinskog dušika (amonijak ili urea) kada su opskrbljeni dovoljnom količinom fermentirajuće energije koja im daje potrebnu energiju (ATP) i ugljikov lanac.

Preživačima je ureja prirodna hrana jer se iz viška amonijaka u buragu stalno sintetizira u jetri te slinom kontinuirano vraća u burag gdje je glavni izvor dušika za celulolitičke bakterije buraga (Stewart i Smith, 2005.). Zahvaljujući mikroorganizmima do 30% od proteina obroka može se zamijeniti neproteinskim dušičnim spojevima kao što je ureja (Grbeša, 2010.) kada obrok sadrži dovoljno fermentirajuće energije i kada je dobro zdravlje probavnog sustava. Danas se junad hrani obrokom s visokim sadržajem škroba koji dajući veliku količinu energije mikrobima omogućuje i da se znatniji dio pravog proteina zamjeni s urejom. Naime, za što efikasnije iskorištenje ureje od strane mikroorganizama buraga važna je osim količine i brzina razgradnje ureje. Prebrza razgradnja (15-20 minuta) ureje u buragu dovodi do njenog lošeg iskorištenja, odnosno manje sinteze mikrobnog proteina i razgradnje vlakana te prevelike koncentracije amonijaka u krvi. Zbog ovih razloga danas se intenzivno tovljena grla preživača hrane krmivima iz kojih se ureja polako otpušta u buragu.

1.2. Hipoteza i ciljevi rada

Na temelju dosadašnjih istraživanja, postavljene hipoteze ovog rada su:

- Izvor sporootpuštaćuje ureje u obroku tovnih junica utjecati će na probavljivost suhe tvari, sirovog proteina, vlakana i škroba.
- Razlike u izvoru sporootpuštajuće ureje u obroku tovnih junica utjecati će na koncentraciju ureje u krvi i na pH fecesa.

Na temelju postavljenih hipoteza, cilj ovog istraživanja je istražiti utjecaj dva oblika dodatka sporootpuštajuće ureje [Ubea 70 – 70% ureje, 28% bentonita i 2% S (Petrokemija Kutina, RH) i OptiSync™ – 88% ureje i 11,2% lipida (Alltech, Nicholasville, SAD)] na probavljivost suhe tvari, sirovih proteina, vlakana i škroba u cijelom traktu, na sadržaj ureje u krvi te na pH fecesa tovnih junica.

2. Pregled literature

2.1. Probava proteina u preživača

2.1.1. Mikrobna razgradnja proteina u predželucima

U strukturi ukupnih troškova u svakoj stočarskoj proizvodnji hranidba čini najveći pojedinačni trošak koji iznosi čak 50-70%, te treba u sastavljanju obroka težiti odabiru i udjelu krmiva koji će omogućiti zadovoljavajuću proizvodnju iz što jeftinije krme (Grbeša, 2010.). Osobina preživača je da dobivaju najveći dio (50-80%) potrebne energije, aminokiselina i svu potrebnu količinu vitamina B grupe od mikroorgamizama predželudaca koji ih sintetiziraju preradom visoko vlaknaste i aminokiselinama siromašne krme. Zapravo, u hranidbi odraslih preživača preko mikroba hranimo kravu (Leek, 2004.).

Među brojnim vrstama mikroorganizama u buragu samo njih 30-80% pokazuje aktivnost proteolitičke razgradnje dok ostali moraju dobiti apsorptivne niskomolekularne dušične spojeve za izgradnju vlastitog proteina (Schwab i sur., 2005.). S obzirom da svi mikroorganizmi ne mogu hidrolizirati proteine hrane, proteolitički mikrobi trebaju osigurati suvišak amonijaka u buragu potreban mikrobima koji nemaju proteolitičku aktivnost. Iz ovog razloga svi proteinski sustavi imaju pojam „bilanca proteina u buragu“ koji kazuje koliko je potrebno više razgrađenog od u mikrobe ugrađenog proteina. Mikroorganizmi buraga razgrade najveći dio (60-90%) sirovog proteina obroka koje zatim upotrebe za sintezu vlastitog proteina (aminokiselina). Stoga je u hranidbi preživača važno imati na umu da hranimo dva sustava (1) mikroorganizme, a oni i njihovi proizvodi (2) hrane govedo. Naime, mikrobi trebaju razgradljivi protein, a junad treba aminokiseline. Bez podmirenja potreba i mikroba i životinje smanjuje se proizvodnost i profitabilnost tova goveda, a bez mikroba odrasla junad gladuje i na kraju umire.

Značaj mikroba i mikrobnog proteina pokazuje činjenica da goveda mogu živjeti, proizvoditi i razmnožavati se na obroku bez aminokiselina u kojem 98% proteina potječe iz ureje, odnosno razgradljivog proteina. Sva proteolitička aktivnost u buragu potječe od mikroorganizama (NRC, 2016). Mnogobrojne vrste mikroorganizama kao što su bakterije, anaerobne gljivice i protozoa proizvode enzime koji razgrađuju dušične spojeve hrane do peptida, aminokiselina i na kraju do amonijaka, a svi su oni hrana za rast svih vrsta mikroorganizama u predželucima. Prema Russell (2002.), prvi stupaj razgradnje proteina se odvija izvan stanica mikroorganizama pri čemu njihove proteaze napadaju otopljeni i neotopljeni protein obroka tako da (1) vežu otopljeni protein na bakteriju ili (2) se bakterija veže na neotopljeni protein. Ova izvan stanična početna hidroliza proteina daje oligopetide koji se opet izvan stanice mikroba dalje razgrađuju do peptida i slobodnih aminokiselina.

Peptide i aminokiseline mikrobi buraga koriste na različite načine:

- peptide hidroliziraju do slobodnih aminokiselina.,
- iskorištavaju aminokiseline za sintezu vlastitog proteina,
- kataboliziraju slobodne aminokiseline do amonijaka i ugljik dioksida,

- iskorištavaju amonijak za sintezu novih aminokiselina
- izbacuju amonijak iz stanice.

Brojne vrste bakterija koriste dio apsorbiranih aminokiselina kao izvor energije i izbacuju male količine amonijaka dok mala grupa bakterija koristi aminokiseline kao glavni izvor energije i izbacuje velike količine amonijaka u burag.

Protozoa su nakon bakterija drugi razgrađivači proteina hrane. Protozoa drugačije razgrađuju protein od bakterija koje stvaraju kompleks sa česticama hrane. Naime, protozoa kao veliki mikrobi gutaju čestice hrane, bakterije i gljive buraga, s time da su bakterije glavni izvor dušika za protozoa. Nadalje, protozoa su važnije u razgradnji netopljivog proteina, a bakterije topljivog proteina. Protozoa hidroliziraju protein progutanih čestica u sebi i samo aminokiseline mogu koristiti za tvorbu vlastitog proteina. Kako protozoa proizvode amonijak, ali ga ne koriste, njihovo uklanjanje iz buraga smanjuje koncentraciju amonijaka. Zadnja razlika između protozoa i bakterija je da prve ispuštaju u buražnu tekućinu peptide i aminokiseline. Malo se zna o uključenosti gljivica u razgradnju proteina hrane.

Mikrobi sadrže 55-65% sirovih proteina u kojima se nalazi 80% peptidima povezanih aminokiselina, 20-25% nukleinskih kiselina te ostatak koji čine drugi dušični spojevi. Aminokiselinski sastav mikrobnog proteina je sličan aminokiselinskom sastavu mesa goveda i čine najveći dio (60-80%) aminokiselina dospjelih u duodenum. Prosječna probavljivost mikrobnog proteina u tankom crijevu je 80% (NRC, 2016.). Mikrobni protein ima visoku biološku vrijednost jer sadrži jednaki ili viši udjel devet od deset esencijalnih aminokiselina. Dnevna sinteza mikrobnog proteina u buragu iznosi 130 g/kg TDN (engl. *True Digestible Nitrogen*; NRC, 2016.) što je vrlo slično INRA standardu od 135 g/kg fermentirajuće organske tvari (INRA, 2007.). Međutim, mikroba sinteza na visoko vlaknastom obroku iznosi 100 g/kg TDN. Dnevna sinteza sirovog mikrobnog proteina na visoko vlaknastom obroku u juneta teškog 500 kg iznosi 671 a u završnom tovu s kukuruznim zrnom 816 g/d (NRC, 2016.). Preračunato, june u intenzivnom završnom tovu sa žitaricama može dnevno dobiti 525g metabolizirajućih proteina [(816 × 0.8 (udjel aminokiselina u mikrobnom protein) × 0.8 (probavljivost aminokiselina mikrobnog proteina u crijevima)], a što podmiruje 95% potrebne količine Charolais juneta teškog 350 kg koji dnevno raste 1, 0 kg (Garcia i sur., 2007).

2.1.2. Potrebe za razgradljivim proteinom

Mikroorganizmi buraga najveći dio (30-80%) potrebnog razgradljivog proteina dobivaju od amonijaka a većina celulolitičkih bakterija koristi peptide i još više amonijak kao izvor dušika za sintezu vlastitog proteina (Hristov i Jounay, 2005.). Suprotno, protozoa ne koristi amonijak kao izvor dušika. Pri nedovoljno razgradljivog proteina u obroku, ureja sline je glavni izvor amonijaka za rast bakterija i fermentaciju vlakana (NRC, 2016.). Zahvaljujući reciklirajućoj ureji koja se iz amonijaka buraga sintetizira u jetri i vraća u burag putem silne, preživači mogu probavljati visoko vlaknasta i nisko proteinska krmiva.

Lapierre i Lobley (2001.) su utvrdili da se 40-80% ureje sintetizirane u jetri kroz slinu vraća u burag. Slina sadrži 65% od koncentracije ureje u plazmi koja iznosi 4-19 mg ureja-

N/100 mL (Bailey i Balch, 1961). Tipična koncentracija amonijaka u buragu junadi u tovu kreće se u rasponu 3-16 mg NH_3-N/100 mL. Međutim, konzumacija velike količine razgradljivog proteina povisuje koncentraciju amonijaka u buragu na 50 mg NH_3-N/100 mL (Hunerberg i sur., 2013.). Previsok sadržaj amonijaka zahtjeva njegovu detoksikaciju u jetri za što je potrebna energija a rezultira smanjenom opskrbom životinje energijom. Suprotno, kada je nedovoljno amonijaka u buragu, slabija je probava vlakana a time i manja energetska vrijednost obroka. Optimalna koncentracija amonijaka u buragu potrebna za maksimalnu sintezu mikrobnog proteina iznosi 8-18 mg NH_3-N/100 mL (NRC, 2016.), što odgovara dnevnom dotoku od 60 do 200 g N/d (Reynolds i Kristinsen, 2008). Sinteza mikrobnog proteina raste s porastom sadržaja razgradljivog proteina u suhoj tvari obroka do 14% a nakon toga opada (Hoover i Stokes, 1991). Zato autori zaključuju da sadržaj razgradljivog proteina ne ograničava sintezu mikrobnog proteina u buragu.

Francuski normativi INRA (2007.) uzimaju da se 80% brzo razgradljivog proteina (otopljeni protein) i 100% sporo razgradljivog proteina ugradi u mikrobe buraga, a u prosjeku se 90% razgradljivog proteina iskoristi za sintezu mikrobnog proteina u zdravom buragu. Prema FEDNA standardima (2008.) junad u tovu treba imati 13-15% sirovog proteina u obroku, a od te količine 70-75% mora biti razgradljivi protein. Nadalje, treba biti 25-30% topivog proteina od ukupnog ili 42-50% topivog proteina od razgradljivog proteina. Pri ovim omjerima frakcija proteina biti će maksimalna sinteza mikrobnog proteina, ako obrok sadrži najmanje 25% i najviše 42% škroba te minimalno 15-20% učinkovitih vlakana (>1 cm) u suhoj tvari.

2.1.3. Razgradljivost proteina krmiva

S obzirom na razgradljivost proteina u buragu, protein hrane se dijeli na topljivi ili brzo razgradljivi, razgradljivi i nerazgradljivi (NRC, 2016.). Topljivi protein se potpuno (100%) i brzo (150-250%/h) razgradi (15-20 minuta) u buragu. Topljivi protein krme se sastoji od spojeva neproteinskog dušika kao što je ureja, amonijak i peptidi silaža i drugi topljivi spojevi. Silaže voluminoznih krmiva sadrže dovoljno topivog proteina dok su njime siromašne žitarice. Kako su žitarice glavni sastojak obroka intenzivno tovljene junadi u pravilu se dopunjuju sa urejom kao izvorom velike količine topivog proteina (tablica 1).

Mikroorganizmi buraga postupno (24-48 h) razgrade razgradljivi protein i potpuno ugrade u sebe zbog čega obrok preživača treba sadržavati najviše razgradljivog proteina (oko 70%) od svih frakcija proteina. Odličan izvor razgradljivog proteina su zelena krma i njene silaže te sačme i pogače uljarica (tablica 1). S druge strane, junadi treba oko 30% nerazgradljivog proteina od ukupnog, a sijeno i suha koncentratna proteinska i energetska krmiva sadrže dovoljno nerazgradljivog proteina (tablica 1). Samo se obrok intenzivno hranjene brzo rastuće junadi nadopunjuje sa krmivima bogatim nerazgradljivim proteinom. Među standardnim krmivima, samo suhi kukuruzni trop sadrži znatniju količinu nerazgradljivog proteina (tablica 1). Zato se za podmirenje potreba za nerazgradljivim

proteinom krmiva zaštićuju od razgradnje u buragu te se dobije „*by pass*“ protein, a najraširenija je zaštićena sojina sačma u hranidbi visoko mliječnih krava.

Tablica 1. Sadržaj frakcija proteina u tipičnim krmivima junadi u tovu (NRC, 2016.)

Krmivo	Sirovi protein	Udjel (%) u sirovom proteinu		
		Topljivi	Razgradljivi	Nerazgradljivi
Voluminozna krmiva				
Zeleni engleski ljulj	18.7%	49%	74%	26%
Silaža kukuruza	8,24%	56%	74,5%	25,5%
Silaža engleskog ljulja	14,6%	60,5%	76%	24%
Livadno sijeno	8,33%	35%	58%	42%
Pšenična slama	5%	41%	66%	34%
Žitarice – energetska krmiva				
Suho zrno kukuruza	8,8%	21%	35%	65%
Silirano zrno kukuruza (30% vlage)	8,8%	30%	45%	55%
Tritikale	12%	30%	67%	33%
Pšenica	13,5%	29%	64%	36%
Ječam	10,5%	28%	49%	51%
Pšenične posije	14%	40%	64%	36%
Proteinska krmiva				
Sojina sačma	46,5%	20%	63%	37%
Suncokretova sačma	35%	32%	72%	28%
Repičina pogača	35,5%	32%	67%	33%
Pšenične posije	14%	40%	64%	36%
Ureja	287%	100%	80%	0
Suhi kukuruzni trop	31%	16,5%	32%	68%

2.1.4. Fermentirajuća organska tvar

Sinteza mikrobnog proteina treba najmanje šest puta više fermentirajuće organske od razgradljivog proteina. Kako su unos i fermentacija organske tvari ograničeni kapacitetom konzumacije i koncentracijom neophodnih vlakana tako je i sinteza mikrobnog proteina više ograničena unosom suhe tvari, odnosno količinom organske tvari koja fermentira u buragu. Prema američkim NRC standardima (2016.) u prosjeku se sintetizira 130 g a prema francuskim normativima (INRA, 2007.) nastane slična količina ili 145 g mikrobnog sirovog proteina po kilogramu ukupno probavljivih hranjiviji tvari. Kako june u sredini tova pri težini od 450 kg jede oko 7 kg organske tvari prosječne fermentabilnosti od 70% tako ono fermentira 4,9 kg organske tvari po kojoj može nastati 710 g/d mikrobnog proteina. Sa porastom unosa fermentirajuće organske tvari raste sinteza mikrobnog proteina a time i opskrba junadi aminokiselinama koje omogućuju viši prirast mesa.

Krmiva bogata škrobom sadrže više fermentirajuće organske tvari od krmiva bogatim vlaknima (tablica 2) jer se škrob žitarica, osim suhog kukuruza i sirka, potpunije (oko 80%) fermentira u buragu i daje veći prinos mikrobnog proteina (Sauvant i sur., 2004.) kada je dovoljno razgradljivog proteina i zdravi uvjeti u buragu. Zbog ovoga junad u tovu se hrani obrokom visokog sadržaja škroba koji preko sinteze mikrobnog proteina omogućuje visoke priraste mesa.

Tablica 2. Sadržaj fermentirajućeg škroba u tipičnim žitaricama u tovu goveda (Sauvant i sur., 2004.)

Krmivo	Škrob	Fermentirajući dio škroba od ukupnog	Fermentirajući škrob u krmivu
		%	
Kukuruz	64,1	60,0	38,4
Silaža zrna 26% vlage	48,5	86,0	42,0
Sirak	64,1	60	38,4
Ječam	52,2	89,0	47
Pšenica	60,5	94	57
Tritikale	60	95	57
Zob	36	93	33,5

2.3.1. Urea kao izvor dušika

Ureja je organski spoj s 46% dušika te sadrži 2875 g ekvivalenta sirovog proteina (46 × 6.25). Mikrobi buraga kada imaju dovoljno energije iskoriste 80% ureje koja se potpuno otapa u buražnoj tekućini i mikrobi je potpuno razgrađuju do amonijaka pa je količina razgradljivog proteina ureje jednaka količini sirovog proteina u ureji. Mikrobi iskoriste, odnosno ponovno ugrade u sebe 80% oslobođenog amonijaka, od čega nastane od 100 g ureje u njima se sintetizira 230 g sirovog proteina od čega je 80% aminokiselinski protein koji je 80% probavljiv u crijevima pa konačno u june „uđe“ 147 g apsorptivnih aminokiselina od 100 g ureje (Grbeša, 2014.). Preduvjet za ovo idealno iskorištenje ureje je da mikrobi imaju dovoljno brzo fermentirajuče energije i zdravi probavni sustav. Ureja sadrži 6,5 puta više sirovog proteina nego sojina sačma pa 153 g ureje zamjenjuje kilogram sojine sačme. Ureja se dodaje u obrok i zato da bi održavala stalna pozitivna bilanca dušika u buragu koja predstavlja veću količinu N iz razgrađenog proteina nego što ga mikrobi ugrade u sebe. Zato koncentracija amonijaka u buragu mora biti +12-16 mg NH_3-N/100 mL buražne tekućine čime se omogućuje stalni višak amonijaka koji omogućuje rast bakterija.

U prosjeku, sadržaj ureje u obroku junadi u SAD kreće se u rasponu od 0.6% do 1% u suhoj tvari s najvišim udjelom od 2,2% (Ceconi i sur., 2015). Obrok junad može sadržavati do 70 g/d ureje kada su grla hranjena energetski koncentratnim obrokom i adaptirana na ureju.

2.3.2. Zaštićena urea

Ureja hidrolizira znatno brže nego škrob, što smanjuje sintezu mikrobnog proteina i opterećuje jetru. Zato je rasprostranjeno u praksi davanje ureje s melasom. Nadalje, brzo otpuštanje amonijaka iz ureje ograničava njen udjel i povisuje udjel krmiva sa sporo razgradljivim proteinom što poskupljuje obrok. Teorijski gledano, usporeno i kontinuirano otpuštanje amonijaka odnosno usklađenost brzine hidrolize ureje i ugljikohidrata povisilo bi učinkovitost sinteze mikrobnog proteina. Istraživanja pokazuju brojne prednosti uključivanja u obrok sporootpuštajuće ureje koja smanjuje koncentraciju amonijaka u buragu (Highstreet i sur., 2010.), poboljšava fermentaciju (Owens i sur., 1980.), povisuje sintezu mikrobnog proteina (Cherdthong i sur., 2011.) i povisuje pH buraga (Taylor-Edwards i sur., 2009.). Nadalje, kontinuirano otpuštanje amonijaka povisuje fermentaciju vlakana u buragu (Alvarez-Almora i sur., 2012.).

Jedan od prvih spojeva sporo razgradljivog amonijaka bio je biuret (Waite i Wilson, 1968.), nakon čega se razvija ureja koja je vezana na nosač poput kalcijeva klorida (Huntington i sur., 2006.), te zaštićena ureja – ureja obložena lanenim uljem i talkom (Forero i sur., 1980.) U osnovi je pretpostavljeno da bi dodatak ureje s polaganim otpuštanjem u hranidbi preživača hranjenim brzo probavljivim ugljikohidratima moglo poboljšati sposobnost mikrobne sinteze proteina, poboljšavajući njegovu učinkovitost konverzije u meso i mlijeko (Cherdthong i Wanapat, 2010.).

Kompanije Alltech 2004. godine na tržište izlazi Optigen 1200, neproteinski dušični spoj s polaganim otpuštanjem ureje nastao oblaganjem ureje biorazgradivim lipidnim polimerom (Akay i sur., 2004.). Galo i sur. (2003.) su u svom istraživanju ispitivali utjecaj dodatka Optigena 1200 različitih razina u obroku mliječnih krava na retenciju dušika, rast mikroorganizama u buragu te proizvodnju i sastav mlijeka. Autori su utvrdili značajne razlike kod izlučivanja dušika u mokraći, izmetu i mlijeku između tretmana, međutim, izostao je pretpostavljeni efekt sporotpuštajuće ureje, jer količina izlučenog dušika je rasla razinom ureje u obroku. Isto tako, istraživanje Tedeschi i sur. (2002.) pokazuju da pri tipičnom udjelu od 0.4% do 0.8% ureje ili Optigena 1200 u suhoj tvari obroka junad postiže slične proizvodne rezultate mjerene prirastom, konzumacijom i konverzijom obroka. S obzirom da je ureja jeftinija od sporootpušajućih izvora ureje i da se postižu kontradiktorni rezultati potrebna su daljnja istraživanja njihovih učinaka u tovu goveda.

2.4. Probavljivost

Makromolekule su dolaskom u probavni sustav podvrgnute mnogim hidrolitičkim procesima u svrhu razgradnje do jednostavnih oblika, koji se mogu apsorbirati. Kod nepotpune razgradnje složenih do apsorptivnih jednostavnih molekula, kao u slučaju hranidbe s visokim udjelom vlakana, jedan manji dio od ukupne primljene hrane se izluči iz organizma u obliku fecesa. Zbog toga je probavljivost suhe i organske tvari osnovni pokazatelj

hranjivosti krmiva te se od samog kemijskog sastava važnijim smatra poznavanje količine iskorištene probavljene hranjive tvari, dobivene utvrđivanjem razlike između unesene i putem fecesa izlučene hranjive tvari. Probavljivost osnovnih hranjivih tvari se izražava koeficijentom (0-1) ili postotkom (0-100%).

Metode procjene probavljivosti uključuju *in viv*o, *in vitro* i *in situ* tehnike određivanja. *In vivo* metode određivanja probavljivosti krmiva i njihovih hranjivih tvari podrazumijevaju provođenje pokusa na životinjama. Zbog toga su zahtjevna, dugotrajna i skupa, što je dovelo do razvoja *in vitro* metoda. *In vitro* metode oponašaju glavne procese probave koji se odvijaju u tikvicama i epruvetama. Ove metode za preživače koriste inokulant dobiven iz probavnog sustava ili iz smjese komercijalno dostupnih enzima (Pérez-Vendrell i Torrallardona, 2010.). Kod *in situ* metoda podrazumijeva da se dio probave događa na prirodnom mjestu – u buragu preživača.

Kod probavljivosti u cijelom probavnom traktu, koja se provodi *in vivo*, kolekcija fecesa određuje kako će se sam postupak provoditi – metodom totalne kolekcije fecesa ili metodom indikatorom. Ukoliko je moguća totalna kolekcija fecesa tokom 24 h potrebno je provoditi određivanje probavljivosti na ovaj način s obzirom da ova metoda daje najrealnije rezultate. Međutim, totalnu kolekciju fecesa nije jednostavno provesti, pa se u hranu dodaje neprobavljivi i inertni indikator, zbog kojeg se uzimanjem uzoraka fecesa u određenim vremenskim intervalima može procijeniti probavljivost određene hranjive tvari.

Veliki utjecaj na probavljivost hranjivih tvari kod preživača imaju vrsta životinje, razina proizvodnje, priprema hrane, sastav obroka – npr. sadržaj vlakana u obroku, i drugo. Npr., probava lošije voluminozne krme, s većim udjelom neutralnih detergent vlakana, traje dulje od probave kvalitetnije voluminozne krme. Ørskov (1998.) navodi da probava slame (probavljivost ST 40%) traje 45-55 sati, lošeg sijena (probavljivost ST 55%) 30-40 sati, a trave dobre kakvoće (probavljivost ST 70%) 18- 24 sata. Također, odnos hranjivih tvari u obroku može utjecati na probavljivost i konzumaciju – visoke koncentracije vlakana i niske proteina smanjuju probavljivost i uzimanje hrane kod preživača. Prema Chamberlain i Wilkinson (1996.), s porastom udjela neutralnih detergent vlakana (NDV) od 30 na 70% u suhoj tvari naglo opada konzumacija hrane.

3. Materijali i metode

3.1. Junice i uvjeti držanja

Pokus je proveden na četiri tovne junice, pasmine Simmental. Životinje su othranjene na istom OPG-u na kojem se provodilo istraživanje. Prije početka pokusa životinje su bile smještene u drugom objektu, na rešetkastom podu u slobodnom načinu držanja. Životinje nisu imale mogućnost ispusta. Dva tjedna prije samog početka pokusa, junice su bile premještene u zasebni objekt, gdje su bile smještene tijekom cijelog pokusa, a kako bi se naviknule na novi prostor i uvjete držanja, iz slobodnog načina držanja na vezani način držanja, gdje su životinje fiksirane za rub valova u jednom redu (slika 1). Dugo ležište od armiranog betona je bilo čišćeno svaki dan, ujutro i navečer. Životinje su držane na vezu radi lakše kontrole i hranidbe. Između svake junice na valovu bila je željezna pregrada, širine 120 cm, kako bi svaka junica imala pristup samo obroku namijenjenom njoj. Napajanje je bilo iz pojilica, u kojima je voda dostupna 24 sata na dan. Junce su bile prosječne starosti 12,5 mjeseci i 380 kg težine na početku pokusa.

Slika 1. Junice u vezanom načinu držanja tijekom pokusa

Vlastiti izvor

3.2. Hranidbeni tretmani

Hranidbeni tretmani su sastavljeni tako da se razlikuju u dodatku neproteinskog dušika u obliku sporootpuštajuće ureje. U istraživanju su korišteni komercijalno dostupni OptiSync™ (Alltech, Nicholasville, SAD) i Ubea 70 (Petrokemija Kutina, RH).

Prema proizvođaču (Alltech, 2017.), OptiSync™ je jedinstveni neproteinski izvor dušika koji povećava brzinu probave energetskih i proteinskih krmiva. Zbog navedenih svojstava otvara se mogućnost korištenja šireg spektra krmiva i efikasnije zadovoljavanje energetskih i proteinskih potreba buražnih bakterija. Analitički sastav čini 41% dušika pri čemu je ekvivalent sirovih proteina 256,3%, 11,4 % sirovih ulja i masti te 0,01 % natrija. Po kilogramu proizvoda dodano je 880 g ureje, 0,023g antioksidansa BTH i 0,11 g bojila.

Prema proizvođaču (Petrokemija Kutina, 2017), Ubea 70 je mineralno krmivo s dodatkom neproteinskog dušičnog spoja za hranidbu preživača, a sadrži 70% ureje, 28% bentonita i 2% sumpora. Koristi se za izradu potpunih i dopunskih krmnih smjesa za preživače kao i za siliranje i konzerviranje vlažnih i obradu grubih, voluminoznih krmiva, djeluje protiv bakterija, plijesni i kvasca, konzervira i čuva krmiva od kvarenja godinu dana. Povećavajući postotak sirovih proteina u hrani, poboljšava probavljivost i iskoristivost celuloze, tj. dopunjava i poboljšava hranidbenu vrijednost krmnih obroka.

Tijekom pokusa životinje su hranjene potpuno izmiješanim obrokom, koji je izmiješan ručno za svaku junicu (slika 2) prema sastavu prikazanom u tablici 3. Obroci s oba dodatka sastojali su se od istih krmiva s 50%:50% omjerom voluminozne i koncentratne krme te 0,7% ureje. Sastavljeni su tako da junice imaju dnevni prirast 1,2 kg prema INRA normativima (INRA, 2007.). U suhoj tvari su sadržavali 7,2 MJ NEL, 13% sirovog proteina od kojega je 35% vodotopivi protein, 26,5% NDV i 40,3% škroba. Dopunska krmna smjesa proizvedena je u tvornici stočne hrane TSH Čakovec (Čakovec, RH) prema sastavu prikazanom u tablici 4. Kao indikator probavljivosti u dopunsku krmnu smjesu je dodan kromov(III)-oksid te je svaka junica unosila 10 g dnevno ovog indikatora (Davis i sur., 1958.).

Slika 2. Potpuno izmiješan obrok kojim su hranjene junice tijekom istraživanja utjecaja izvora sporootpuštajuće ureje na probavljivost

Vlastiti izvor

Junice su hranjene jednom dnevno u 17 sati, u *ad libitum* režimu hranidbe i slobodnom pristupu vodi. Sa svakim obrokom dodano je 10 % više TMR-a zbog odbitaka.

Tablica 3. Sastav potpunog obroka junica oba hranidbena tretmana

Krmivo	Masa kg/ dan
Silaža kukuruzne biljke	8,50
Sijeno	1,00
Zrno kukuruza	2,50
Ječam	1,00
Suncokret	0,30
Dopunska krmna smjesa	1,00
Kromov(III)-oksid	0,01
Ukupno	14,31

Tablica 4. Sastav dopunskih krmnih smjesa hranidbenih tretmana koje su se razlikovale u izvoru sporootpuštajuće ureje

Krmivo	OptiSync™	Ubea 70
	%	
Zrno kukuruza	29,50	29,50
Sojina sačma	24,00	24,00
Suncokretova sačma	20,00	20,00
Pšenične posije	6,50	6,50
OptiSync™	5,00	0,00
Ubea 70 %SP	0,00	8,00
Vapnenac	6,00	6,00
MonoCaP	1,50	1,50
Magnezij sulfat	1,00	0,50
Sol	1,50	1,50
Rindamast UNI K Ass-Co[1]	1,50	1,50
Kromov (III) oksid	1,00	1,00
Ukupno	100	100

[1]Analitički sastav: kalcij 26,5%, fosfor 1,0%, natrij 5,0%, magnezij 3,0%, HCL- neotopivi pepeo 6,9%.Vitamini i provitamini: vitamin A 400 000 mg, vitamin D3 40 000 mg, vitamin E 1 800 mg, bakar 350 mg, cink 2 500 mg, mangan 1 200 mg, jod 140 mg, selen 15 mg, kobalt 23 mg. Mikroorganizmi: *Saccharomyces cerevisiae*.

3.3. Dizajn pokusa i sakupljanje uzorka

Pokus je proveden prema cross-over dizajnu u dva perioda. Pokusno razdoblje počelo je nakon dvotjednog razdoblja prilagodbe na novi ambijent i hranidbu. Svaki eksperimentalni period imao je 18 dana pri čemu je 15 dana bila prilagodba na obrok i tri dana uzorkovanja. Za vrijeme razdoblja uzorkovanja, uzimao se uzorak obroka, odbitaka (slika 3) i fecesa. Do dostave u laboratorij i provedbe analize, svi uzorci su čuvani na +4 °C (slika 4).

Slika 3. Uzorak dnevnog odbitka junice u razdoblju uzorkovanja (vlastiti izvor)

Vlastiti izvor

Slika 4. Uzorci u hladnjaku tijekom provođenja pokusa

Vlastiti izvor

Sva krepka krmiva korištena u sastavljanju obroka uzorkovana su na početku pokusnog razdoblja, a ista šarža krmiva osigurana je za cijelo vrijeme trajanja pokusa. Svakog dana razdoblja uzorkovanja, uziman je uzorak voluminoznih krmiva – kukuruzne silaže i sijena, a uzorak za analizu svakog perioda dobiven je miješanjem dnevno uzetih uzoraka u ekvimasenim omjerima

Prije stavljanja novog obroka u valove, ostaci koji su ostali od prethodnog obroka, su sakupljeni, izvagani i reprezentativno uzorkovani (slika 3). Uzorak odbitka svake junice u eksperimentalnom periodu dobiven je ekvimasenim miješanjem uzoraka spremljenih svakog dana uzorkovanja.

Uzorci fecesa svake junice uzimali su se svakih šest sati kroz tri dana uzorkovanja. Prvi uzorak fecesa u dane uzorkovanja uzorkovan je u 17 sati, neposredno prije hranjenja junica. Uzorak se uzimao rektalno i minimalno u količini od 200 g svakog uzorkovanja. Uzorak fecesa za analizu svake junice za svaki period dobiven je miješanjem, u ekvimasenim omjerima, prosušenih uzorka uzetih tijekom tri dana uzorkovanja (ukupno 12 uzoraka za svaku junicu u svakom periodu).

Također, svakog dana razdoblja uzorkovanja, uvijek u isto vrijeme, uzet je uzorak krvi punkcijom repne vene (vena *coccygea*) koristeći vakuum sustav u epruvete volumena 6 mL (Vacutest, Kima S.R.L., Italija). Neposredno nakon vađenja uzorci krvi bili su pohranjeni u putni frižider i dostavljeni u laboratorij na analizu unutar 1 sata.

3.4. Kemijske analize

Sve kemijske analize uzoraka krmiva, odbitaka i fecesa provedene su u Analitičkom laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Svi uzorci su analizirani neposredno nakon dostave u laboratorij. Nakon pripreme (voluminozna krmiva i odbici) ili za pripremu skupnih uzoraka po periodu (feces), svi sakupljeni uzorci su prosušeni na 60 °C kako bi se mogli samljeti. Uzorci krvi su analizirani u laboratoriju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Dubrava, Zagreb.

3.4.1. Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage u uzorcima određen je u skladu s normom HRN ISO 6496:2001 (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2001). Uzorak je sušen je u sušioniku (UFE 400, Memmert, Njemačka) kroz 4 (krepka krmiva) ili 24 (voluminozna krmiva, odbici i feces) sata na 103 °C; na temelju mase uzorka prije i poslije sušenja izračunat je sadržaj vode. Rezultati svih tvari analiziranih u provedenom istraživanju preračunati su na 100% suhe tvari.

3.4.2. Određivanje sadržaja sirovog proteina

Sadržaj sirovog proteina (SP) u uzorcima određen je Kjeldhalovom metodom prema normi EN ISO 5983:2010 (Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo, 2010). Jedan gram homogeniziranih i prosušenih uzoraka izvagan je u Kjeldhalove tube. Uz dodatak 7,5 grama katalizatora, smjese modre galice i kalijevog sulfata, te 10 ml koncentrirane sumporne kiseline, uzorak je spaljen na 420 °C u bloku za spaljivanje. Razgrađeni uzorak destiliran je u automatskom sistemu Kjeltec^{TM}2200 (Foss Tecator, Švedska) uz dodatak 35%-tne otopine natrijeve lužine. Oslobođeni amonijak skupljen je u 4%-tnu otopinu borne kiseline uz dodatak smjese indikatora metil-crveno i brom-krezol-zeleno. Skupljeni destilat titriran je s 0,1 mol/l otopinom kloridne kiseline, a na temelju utroška kiseline izračunat je sadržaj dušika u uzorku. Sadržaj sirovog proteina izračunat je množenjem sadržaja dušika s faktorom 6,25. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a kao rezultat uzeta je srednja vrijednost.

3.4.3. Određivanje sadržaja neutralnih detergent vlakana

Sadržaj neutralnih detergent vlakana (NDV) određen je prema uputama proizvođača Fibertec™ sustava – aparature za iskuhavanje i hladnu ekstrakciju (Fibertec system 2021 Fiber cap, Foss Tecator, Švedska). Uzorak voluminoznih krmiva i odbitaka (oko 0,4 g) izvagan je u Fiber cap kapsule i namočen 15 min u destiliranu vodu s dodatkom 0,3 mL termostabilne α-amilaze (Sigma, Njemačka) pri 80 °C. Nakon ispiranja s vrućom destiliranom vodom, uzorci u kapsulama su kuhani pri vrenju pola sata u otopini neutralnog detergenta uz

dodatak 0,3 mL α-amilaze i 10,5 g bezvodnog natrijevog sulfita. Uzorci fecesa su kuhani u otopini neutralnog detergenta bez prethodne pripreme s α-amilazom ili njenim dodatkom u otopinu neutralnog detergenta. Otopina neutralnog detergenta pripremljena je otapanjem 18,61 g KOMPLEKSON-a III (etilen-diamin-tetraoctena natrijeva sol), 6,81 g natrijeva tetraborata dekahidrata, 30,0 g natrijeva dodecil sulfata (SDS), 10 mL trietilenglikola i 4,56 g bezvodnog natrijeva hidrogen fosfata u 1 l destilirane vode. Nakon ispiranja s vrućom destiliranom vodom, kapsule s voluminoznim krmivima i odbicima su ponovno namočene 15 min u destiliranoj vodi zagrijanoj na 80 °C uz dodatak 0,3 mL α-amilaze. Sve kapsule su zatim ponovno isprana s vrućom destiliranom vodom, odmašćene u acetonu i prosušene preko noći na 103 °C. Izvagane kapsule s uzorcima su spaljena u mikrovalnoj peći (Pyro 260, Milestone, Italija) na 600 °C. Na temelju masa uzorka prije i nakon kuhanja u neutralnom detergentu, te mase ostatka pepela i konstanti specifičnih za kapsule u kojima se nalazio uzorak izračunat je sadržaj NDV-a.

3.4.4. Određivanje sadržaja škroba

Sadržaj škroba u uzorcima obroka, odbitaka i fecesa junica određen je enzimatskom metodom korištenjem testnog kita Total Starch Assay (K-TSTA 04/2009, Megazyme International, Irska), pri čemu se škrob djelovanjem enzima prevodi do glukoze koja se detektira spektrofotometrijski. Uzorak (0,1g) je izvagan u staklene epruvete od 15 mL. Neposredno prije dodatka otopine enzima α-amilaze, u epruvete s uzorcima dodano je 0,2 ml 80 %-tnog etanola, a smjesa je žustro promiješana na vorteks miješalici (MS2 mishaker, IKA, Njemačka). Zatim je u svaku epruvetu dodano 3 ml termostabilne α-amilaze u acetatnom puferu (100 mM, pH 5,0), a smjesa je ponovo promiješana. Epruvete sa sadržajem su zatim inkubirane u kupelji s vodom pri vrenju 6 minuta s vorteksiranjem svake 2 minute. Nakon vađenja iz kupelji, u svaku epruvetu dodano je 0,1 ml enzima amilglukozidaze. Nakon inkubacije u kupelji (Water bath, 5L), Cole Parmer, SAD) na 50 °C 30 minuta sav sadržaj je kvantitativno prenesen u odmjerne tikvice od 100 mL. Alikvot otopine je zatim centrifugiran na 3 000 rpm 10 minuta (Centric 322A, Tehtnica, Slovenija). Alikvot od 0,1 ml otopine supernatanta odpipetiran je u duplikatu u epruvete od 5 ml te je dodano 3 ml GOPOD reagensa, a smjesa je inkubirana 20 min na 50 °C. Nakon hlađenja izmjerena je apsorbancija na UV/vis spektrofotometru pri 510 nm (Helios γ, Thermo Electron Corporation, UK). Na temelju dobivenih vrijednosti apsorbancije uzoraka i standarda glukoze priloženog testnom kitu izračunata je količina škroba u uzorku.

3.4.5. Određivanje sadržaja vodotopivog proteina

Sadržaj vodotopivih proteina (VSP) u svim uzorcima određen je metodom prema Hedquist i Uden (2006). U Falcon epruvetu od 50 ml izvagano je 1,5 g prosušenog uzorka, dodano je 10 mL svježe pripremljene otopine boratno-fosfatnog pufera (pH 6,75) i 5 staklenih kuglica radi lakšeg miješanja. Epruveta je sa sadržajem inkubirana na 39 °C u vodenoj kupelji

(WB 22, Memmert, Njemačka) jedan sat uz miješanje svakih 15 min. Nakon tog vremena Falcon epruvete su centrifugirane (15 min pri 4000 rpm) i alikvot uzorka odpipetiran je u Kjeldhalove tube za destilaciju. Sadržaj vodotopivog proteina u alikvotu određen je kao sadržaj sirovog proteina prema već opisanom postupku. Pri tome je rast temperature na bloku za spaljivanje bio postupan kako bi se prilikom spaljivanja uzorka izbjeglo stvaranje pjene.

3.4.6. Određivanje sadržaja kroma

Sadržaj kroma u uzorcima dopunske smjese odbitaka i fecesa određen je po metodi opisanoj u radu autora (Fenton i Fenton 1979). Pripremljeni uzorci fecesa su izvagani u tube za spaljivanje i spaljeni u bloku za spaljivanje, na temperaturi od 420 °C u vremenskom periodu od 4 sata. Za pripremu baždarnog pravca, uz uzorke spaljeno je i 6 uzoraka kromovog oksida, koji je izvagan u posebne tube u količini od 0,0090 do 0,0400 g. Nakon spaljivanja, u ohlađene tube s uzorcima dodano je 15 mL reagensa za određivanje kroma. Reagens za određivanje kroma pripremljen je otapanjem 10 g natrijevog molibdata dihidrata u 500 mL otopine koja sadrži destiliranu vodu, koncentriranu sulfatnu kiselinu i 70 %-tnu perkloratnu kiselinu u omjeru 150:150:200. Nakon dodavanja reagensa poklopljene tube su vraćene na blok za spaljivanje koji je prethodno rashlađen na 300 °C. Nakon 20-30 minuta spaljivanja sadržaj mijenja boju u žuto-crvenu, a spaljivanje je prekinuto 10-15 minuta nakon promjene boje. Nakon hlađenja tuba na sobnu temperaturu, sadržaj je kvantitativno prenesen u odmjerne tikvice od 200 mL. Sadržaj tikvica je dobro promiješan, a alikvot je centrifugiran (4000 rpm, 5 min) te mu je izmjerena apsorbancija na 440 nm. Sadržaj kromovog oksida u uzorcima izračunat je na temelju apsorbancije prema baždarnom pravcu kromovog oksida.

3.4.7. Određivanje pH fecesa

pH vrijednost svih uzoraka fecesa je određena u svježim uzorcima prije pripreme skupnih uzoraka po periodu kako bi se pratile diurnalne promjene fecesa. pH je određen direktno unošenjem elektrode pH metra (Inolab pH 720, WTW, Njemačka) u uzorak fecesa.

3.4.8. Određivanje koncentracije ureje u krvi

Koncentracija ureje u krvnom serumu određena je unutar 1 h nakon vađenja. Uzorci pune krvi su nakon stvaranja ugruška centrifugirani kroz 5 minuta na 3 000 rpm, te je potom odvojen tekući dio krvi (serum) od ugruška. Za određivanje koncentracije ureje u krvnom serumu korištena je fotometrijska UV metoda.

3.5. Probavljivost

Probavljivost sirovog proteina, NDV-a i škroba izračunata je prema udjelima ovih tvari i kromovog(III) oksida u obroku i fecesu prema formuli prikazanoj u knjizi Schneider i Flatt (1975.):

$$probavljivost_X(\%) = (1 - \frac{\%Cr_{obrok} \times \%X_{feces}}{\%Cr_{feces} \times \%X_{obrok}}) \times 100$$

pri čemu je X hranjiva tvar čija probavljivost se određuje, %Cr udio kromovog(III) oksida u obroku ili fecesu, te %X udio hranjive tvari u obroku ili fecesu.

Probavljivost suhe tvari izračuna ta je preko sljedeće formule:

$$provaljivost\ suhe\ tvari\ (\%) = \left(1 - \frac{ukupna\ suha\ tvar\ u\ fecesu}{ukupna\ suha\ tvar\ u\ obroku}\right) \times 100$$

pri čemu je ukupna suha tvar u fecesu izračunata prema formuli prikazanoj u knjizi Schneider i Flatt (1975):

$$ukupna\ suha\ tvar\ u\ fecesu(kg) = \frac{100 \times kg\ unosa\ Cr}{\%Cr_{feces}}$$

3.6. Statistička obrada podataka

Statistička obrada dobivenih podataka provedena je PROC MIXED procedurom statističkog paketa SAS 9.3 (Statistical Analysis System, 2011). Za statističku obradu provedenu prema analizi varijance, tretman dodatka sporootpuštajuće ureje je bilo fiksni utjecaj, a junica nasumična varijabla. Dnevne promjene u pH vrijednosti fecesa ispitane su kao ponovljena mjerenja s fiksnim utjecajem tretmana, vremena uzorkovanja i njihove interakcije, te nasumičnom varijablom junice unutar eksperimentalnog perioda. Srednje vrijednosti i standardne greške su određene korištenjem LSMEANS naredbe dok su razlike srednjih vrijednosti određene korištenjem PDIFF naredbe. Statistička signifikantnost bila je postignuta ako je $P \leq 0,05$.

4. Rezultati i rasprava

Prošlo je više od 50 godina kako je Virtanen (1966.) demonstrirao da preživači mogu iskoristiti neproteinski dušični spoj iz ureje za sintezu proteina. U današnje vrijeme hranidba preživača je otišla i korak dalje – dodaci sa zaštićenom urejom omogućuju bolju iskoristivost između škroba (visoke stope probavljivosti) i vlakana (niske stope probavljivosti) i pri tome potičući bolju sintezu mikrobnog proteina, probavu i povećanje konverzije hrane.

Prema proizvođaču (Alltech, 2017.), dodatak OptiSync™ je ureja obložena tehnološki naprednom biorazgradivom polimernom prevlakom na bazi lipida koje ima svojstvo kontroliranog otpuštanja dušika zbog čega optimizira konverziju dušika u mikrobni protein. Dodatak Ubea 70 u svom sastavu sadrži 28% bentonita, koji je alumosilikatna glina sastavljena od koloidalnih i plastičnih glina, pretežno od minerala montmorilonita. Prema Feldhofer i Kalovoda (1980.), benal koji se koristi za proizvodnju dodatka Ubea 70 a proizveden je iz bentonitne gline, svojim fizikalno-kemijskim svojstvima povoljno utječe na djelovanje ureaze i oslobađanje amonijaka, te poput gline privremeno ga veže na sebe čime omogućava ravnomjerno iskorištavanje amonijaka u sintezi mikrobnog proteina. Nadalje, otpušteni amonijak izbacuje iz organizma čime se otklanja opasnost od trovanja. Dodatkom bentonita, Ubea 70 spada u proizvod sa sporootpuštajućom urejom. U provedenom istraživanju ispitivao se utjecaj ova dva dodatka sporotpuštajuće ureje na ukupnu probavljivost proteina, škroba i vlakana te pH fecesa i razinu ureje u krvi tovnih junica pasmine domaći Simmental.

Udio hranjivih tvari u obrocima tretmana, te prosječni dnevni unos suhe tvari i hranjivih tvari između tretmana prikazan je u tablici 5.

Tablica 5. Udio hranjivih tvari u obrocima tretmana, te prosječni dnevni unos suhe tvari (ST), sirovog proteina (SP), neutralnih detergent vlakana (NDV), škroba i vodotopivog sirovog proteina (VSP) junica hranjenih obrocima koji se razlikuju u dodatku sporootpuštajuće ureje

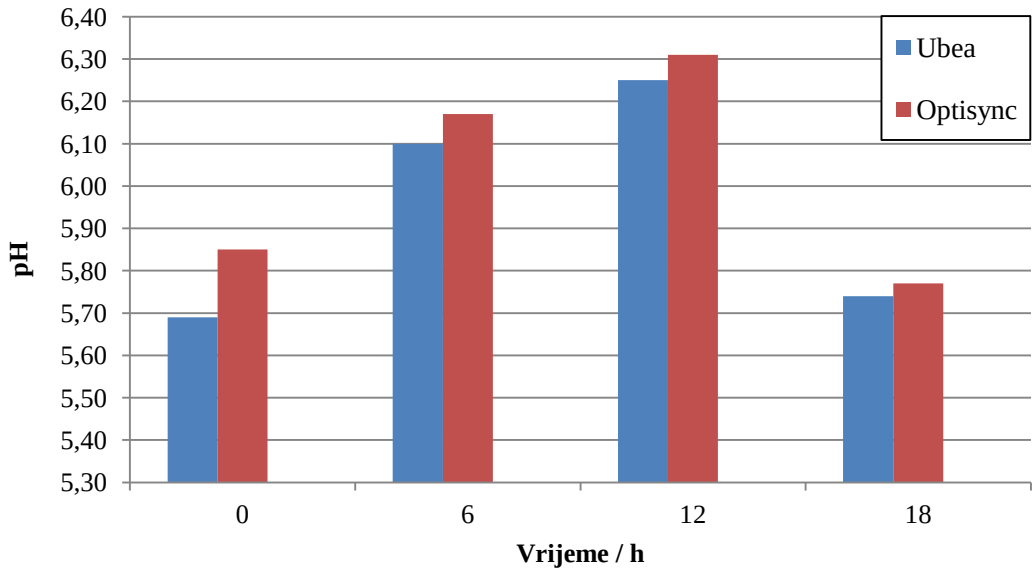
Hranjiva tvar	Ubea 70	OptiSync™	*P*
Udio u obroku			
SP	12,88	12,58	0,033
NDV	27,27	25,59	<0.001
Škrob	39,88	40,73	0,030
VSP	4,78	4,79	0,427
Unos ST /kg ST	7,99	8,15	0,425
Unos /g			
SP	1023,89	1025,93	0,940
NDV	2185,14	2088,97	0,167
Škrob	3176,19	3297,70	0,189
VSP	374,60	390,15	0,343

Iako su se obroci tretmana razlikovali u sadržaju SP, NDV i škroba, male vrijednosti tih razlika upućuju da su tretmani bili ujednačeni tijekom oba pokusna perioda. Prosječni dnevni unos suhe tvari te SP, NDV, škroba i VSP su bili slični za oba hranidbena tretmana. Junice su dnevno unosile oko 8 kg suhe tvari od čega je oko 1 kg bio SP, 2,1 kg NDV i 3,2 kg škroba.

4.1 Promjena pH fecesa kroz 24 sata

Hranidba tovne junadi zahtijeva visok udio škroba u obroku koji podmiruje velike potrebe za energijom za izgradnju organizma, što može rezultirati time da škrob neiskorišten u buragu, posebice ako u obroku nije ujednačen odnos s neproteinskim dušičnim spojevima, te u tankom crijevu, dolazi do debelog crijeva gdje može doći do ponovne fermentacije. Kao rezultat fermentacije, u najvećem obimu stvara se mliječna kiselina koja može dovesti do sniženja pH vrijednosti fecesa. Ovo također vrijedi i obratno, pH fecesa nas može uputiti na acidozu debelog crijeva. pH fecesa tokom 24 sata kod junica u ovom istraživanju prikazan je u grafikonu 1.

Grafikon 1. Promjena pH fecesa kroz 24 sata kod junica hranjenih obrocima koji se razlikuju u dodatku sporootpuštajuće ureje



U vrijeme hranjenja prosječna vrijednost pH fecesa junica bila je 5,77 te nakon hranjenja je rasla tokom 12 sati kada je zabilježena maksimalna vrijednost neovisno o dodatku sporootpuštajuće ureje – 6,28. Nakon toga, pH vrijednost je opadala do 18. sata gdje ima približno istu vrijednost kao i u vrijeme hranjenja, te u prosjeku je iznosila 5,75. Navedene promjene pH vrijednosti su u skladu s utvrđenim utjecajem vremena ($P<0,001$). Razlog rasta pH vrijednosti fecesa prvih 12 sati je najvjerojatnije uravnoteženija opskrba mikoorganizama buraga neproteinskim dušičnim spojevima i lako dostupnim ugljikohidrata nakon hranjenja.

Navedeno rezultira boljim iskorištenjem škroba u burgu i tankom crijevu zbog čega manje škroba dolazi do debelog crijeva te se smanjuje staranje produkata fermentacije.

Utjecaj dodatka sporootpuštajuće ureje na pH fecesa (P <0,329) u ovom istraživanju nije utvrđen, međutim, kao što se može vidjeti iz grafikona 1, vrijednost pH fecesa junica hranjenih dodatkom OptiSync™ je bila uvijek brojčano viša od vrijednosti junica hranjenih dodatkom Ubea 70. Ovo opažanje upućuje na bolje iskorištenje ugljikohidrata u buragu uz dodatak ureje zaštićene uljima (OptiSync™) u odnosu na dodatak Ubea 70, te samim time i boju probavu ugljikohidrata.

MacCracken (1980.) i Beasom i sur. (1982.) su zaključili su da fekalni pH prvenstveno ovisi o vrsti i količini krmiva i načinu hranidbe istih. pH vrijednosti junica u ovom istraživanju niže su od pH vrijednosti 6,53 koju su ostvarile mliječne krave hranjene obrocima s visokim udjelom škroba kako bi se ostvarili uvjeti subkliničke ruminalne acidoze u istraživanju Li i sur., (2012.). U navedenom istraživanju su krave kontrolne skupine imale pH vrijednost 6,65. Iako je vrijednost dobivena u ovom istraživanju niža od Li i sur. (2012), količina neprobavljenog škroba do debelog crijeva, nije bila dovoljna da izazove pad vrijednosti do 4,9 – 5,1 koliko su postigli Bissell i Hall (2010) koji su direktno u sirište nelaktirajućih i negravidnih Holstein krava unosili i do 4 kg kukuruznog škroba dnevno.

4.2 Probavljivost hranjivih tvari

Probavljivost je glavni čimbenik koji određuje hranidbenu vrijednost nekog krmiva jer ukazuje na dostupnost hranjiva metabolizmu – pokazuje koliki dio od pojedene količine određene hranjive tvari iz krmiva uđe u metabolizam životinje i stoji mu na raspolaganju. Povećana probavljivost hrane može biti povezana s povećanom opskrbom razgradivog dušika u buragu, što rezultira većom mikrobnom aktivnošću i time poboljšanom razgradnjom proteina i ugljikohidrata u hrani (Köster i sur., 1996.). Probavljivost ST, SP, NDV i škroba u cijelom traktu tovnih junica hranjenih s dva različita izvora sporootpuštajuće ureje prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Probavljivost suhe tvari (ST), sirovog proteina (SP), neutralnih detergent vlakana (NDV) i škroba junica hranjenih obrocima koji se razlikuju u dodatku sporootpuštajuće ureje

Hranjiva tvar	Ubea 70%	OptiSync™	*P*
	%		
ST	63,20	72,10	0,046
SP	59,43	68,60	0,020
NDV	33,18	49,12	0,020
Škrob	96,67	95,39	0,079

Probavljivost ST kod junica hranjenih dodatkom OptiSync™ iznosi 72,09%, što je za 8,9% veća probavljivost u odnosu na tretman s dodatkom Ubea 70%. Ove vrijednosti upućuju da je obrok s dodatkom OptiSync™ omogućio ravnomjerniju dostupnost dušika a samim time i bolju mikrobnu aktivnost u odnosu na dodatak Ubea 70. Dobivene vrijednosti su u rasponu probavljivosti suhe tvari (62,10-77,28%) koji su ostvarile Holstein junice hranjene obrocima koji se razlikuju u dva omjera voluminoze i koncentrata te četiri razine unosa dušika u radu Zanton i Heinrichs (2008.). U navedenom istraživanju ureja je bila jedna od krmiva koja se koristila za mijenjanje sadržaja dušika u obrocima. Vrijednosti u ovom istraživanju su blizu vrijednosti probavljivosti suhe tvari koje su ostvarila tovna goveda sa zaštićenom (69,9-73,7%) i nezaštićenom urejom (71,4-74,4%) u radu Bourg i sur. (2012.).

Dodatak sporootpuštajuće ureje je utjecao na probavljivost sirovog proteina, pri čemu je dodatak Ubea 70% ostvarila 59,43% a dodatak OptiSync™ 68,60%. Prema tome, dodatak OptiSync™ je ostvario za 9,17% višu probavljivost sirovog proteina od dodatka Ubea 70% što upućuje na bolje iskorištenje ureje. Dobivene vrijednosti su slične onima u radovima Zanton i Heinrichs (2008.; 44,17-82,51% ovisno o omjeru voluminoze i koncentrata te unosa dušika) i Bourg i sur. (2012.; 65,10-67,04% za zaštićenu ureju i 64,88-71,25% za nezaštićenu ureju).

S obzirom da je za mikrobni rast potrebna opskrba amonijakom, kontinuirana opskrba imat će pozitivan utjecaj i na rast celulolitičkih bakterija što će povećati obujam razgradnje vlakana u buragu. Junice hranjene dodatkom Ubea 70% ostvarile su probavljivost NDV-a 33,18% dok su junice hranjene dodatkom OptiSync™ ostvarile 49,12% što upućuje na bolje iskorištenje ureje od strane buražnih mikroorganizama. Dobivene vrijednosti su malo niže od 50% u radu Highstreet i sur. (2010.) u kojem su mliječne krave hranjene obrocima s 5% kapsulirane ureje u ukupnom proteinu u obroku, ali su unutar raspona od 34,82 do 51,13% u radu Zanton i Heinrichs (2008.).

Probavljivost škroba u cijelom traktu junica hranjenih s dva različita dodatka sporootpuštajuće bila je u prosjeku 96%. Dodatak Ubea 70 ima tendenciju više probavljivosti škroba za 1,27% u odnosu na dodatak Ubea 70. Vrijednosti dobivene za oba dodatka u rasponu su vrijednosti od 89,53 do 98,23% probavljivosti škroba koje su ostvarile junice u istraživanju Zanton i Heinrichs (2009.). Dobiveni rezultati su slični rezultatima Davies i sur. (2013.; 97,8%) kod junadi hranjenih s 29-69% škroba razgradivog u buragu i 46-57% proteina razgradivog u buragu. S porastom udjela škroba i proteina razgradivog u buragu, navedeni autori su dobili porast probavljivosti škroba u cijelom traktu.

4.3 Ureja u krvi

Ureja je količinski najvažniji proizvod metabolizma proteina u organizmu i povećanje udjela sirovih proteina u suhoj tvari obroka značajno povećava koncentraciju ureje u krvnom serumu (Campanile i sur., 1998.). Nadalje, na koncentraciju ureje u krvi utječu i promjene sadržaja u buragu razgradivih i nerazgradivih proteina, kao i razina unosa energije obrokom (Roseler i sur., 1993.) zbog čega je dobar pokazatelj odnosa bjelančevina i energije u obroku (Ramadan i Harapin, 1998.). Kod zdravih goveda koncentracija ureje manje od 2,46 mmol/L

ukazuje na nedostatak proteina (dušika) u obroku u odnosu na unos probavljive energije (Hammond, 1997.). Tipičan raspon koncentracije ureje u krvi goveda iznosi 8,6-40,7 mg/100 mL tj. 1,5-6,9 mmol/L (Bailey i Balch, 1961).

Tablica 7. Koncentracija ureje u krvi junica hranjenih obrocima koji se razlikuju u dodatku sporootpuštajuće ureje

Hranjiva tvar	Ubea 70%	OptiSync™	*P*
	mmol/L		
Ureja	3,22	3,92	0,125

Koncentracija ureje u krvi u tretmanu s dodatkom Ubea 70% iznosila je 3,22 mmol/L, dok u tretmanu s dodatkom OptiSync™ iznosila 3,92 mmol//L. Unatoč brojčanoj razlici, između tretmana nije utvrđena značajna razlika (tablica 7). Navedene brojčane razlike upućuju da je dodatak Ubea 70% imala veću iskoristivost sirovih bjelančevina tj. dušika obroka, no treba imati na umu da je krv vađena 14 sati nakon hranjenja te rezultati mogu upućivati i na kontinuiranije otpuštanje ureje iz dodatka OptiSync™ u odnosu na dodatak Ubea 70%. Prema nižoj pH vrijednosti fecesa i višoj probavljivosti vlakana kod junica hranjenih dodatkom OptiSync™, razlog brojčano višoj vrijednosti je najvjerojatnije ujednačenije i kontinuiranije otpuštanje ureje.

Ostvarene vrijednosti koncentracije ureje u krvi slične su drugim istraživanjima. Jurić i sur. (2014.) navode koncentraciju od 3,23 mmol/L kod Holstein krava u suhostaju, dok za krave u laktaciji je ta vrijednost 3,74 mmol/L. Vrijednost koncentracije od 3,49 mmol/L ostvarili su Angus bikovi hranjeni visoko-koncentratnim obrocima u radu Harmon i sur. (2006.). što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Tašić (2015.) navodi 4,89 mmol/L za koncentraciju ureje u serumu krava u suhostaju i 6,23 mmol/L za krave u visokoj laktaciji što prema autoru ukazuje da je protein u obroku u suvišku u odnosu na energiju, pa bi bila poželjna korekcija obroka.

5. Zaključak

Na temelju rezultata istraživanja, u uvjetima provedenog istraživanja može se zaključiti:

- Dodatak ureje obložene lipidima iz dodatka OptiSync™ rezultirao je višom probavljivošću suhe tvari, sirovog proteina i vlakana u cijelom traktu tovnih junica u odnosu na dodatak smjese ureje i bentonita u dodatku Ubea 70%. S druge strane, dodatak Ubea 70% ima tendenciju za 1,27% više probavljivosti škroba.
- Izvor sporootpuštajuće ureje nije utjecao na koncentraciju ureje u krvi i pH fecesa ali više vrijednosti probavljivosti vlakana, pH fecesa i ureje u krvi 14 sati nakon hranjenja upućuju na kontinuiranije otpuštanje ureje iz dodatka OptiSync™ u odnosu na dodatak Ubea 70%.

6. Popis literature

1. Alvarez-Almora E.G., Huntington G.B., Burns J.C. (2012). Effects of supplemental urea sources and feeding frequency on ruminal fermentation, fiber digestion, and nitrogen balance in beef steers. Animal Feed Science and Technology, 171: 136-145.
2. Akay V., Tikofsky J., Holtz C., Dawson K. A. (2004). Optigen® 1200: Controlled release of non-protein nitrogen in the rumen. In: Proceedings of the 20th Alltech Symposium (Lyons, T. P., Jacques, K. A., Ur.), Nottingham University Press, Nottingham, 179-185.
3. Alltech (2017). http://global.alltech.com/australia/solutions/optisync. Pristupljeno 08.01.2017.
4. Bailey C. B., Balch C. C. (1961). Saliva secretion and its relation to feeding in cattle: 1. The composition and rate of secretion of parotid saliva in a small steer. British Journal of Nutrition, 15: 371-382.
5. Beasom S. L., Laplant L., Howard V. W. (1982). Fecal pH of pronghorn and sheep as related to diet. The Journal of Wildlife Management, 46: 1101-1104.
6. Bissell H. A., Hall M. B. (2010). Cattle differ in ability to adapt to small intestinal digestion of starch. Journal of Dairy Science 93 (E-Suppl. 1): 845.
7. Bourg B. M., Tedeschi L. O., Wickersham T. A., Tricarico J. M. (2012). Effects of a slow-release urea product on performance, carcass characteristics, and nitrogen balance of steers fed steam-flaked corn. Journal of Animal Science, 90: 3914-3923.
8. Campanile G., De Filippo C., Di Palo R., Taccone W., Zicarelli L. (1998). Influence of dietary protein on urea levels in blood and milk of buffalo cows. Livestock Production Science, 55: 135-143.
9. Ceconi I., Ruiz-Moreno M.J., DiLorenzo N., DiCostanzo A., Crawford G.I. (2015). Effect of urea inclusion in diets containing corn dried distillers grains on feedlot cattle performance, carcass characteristics, ruminal fermentation, total tract digestibility, and purine derivatives-to-creatinine index. Journal of Animal Science, 93: 357-369.
10. Chamberlain A. T., Wilkinson J. M. (1996). Feeding the Dairy Cow. Chalcombe Publications, Lincoln.
11. Cherdthong A., Wanapat M. (2010). Development of urea products as rumen slow-release feed for ruminant production: A review. Australian Journal of Basic and Applied Science, 4: 2232-2241.
12. Davis C. L., Byers J. H., Luber L. E. (1958). An evaluation of the chromic oxide method for determining digestibility. Journal of Dairy Science, 41: 152-159.
13. Davies K. L., McKinnon J. J., Mutsvangwa T. (2013). Effects of dietary ruminally degradable starch and ruminally degradable protein levels on urea recycling, microbial

protein production, nitrogen balance, and duodenal nutrient flow in beef heifers fed low crude protein diets. Canadian Journal of Animal Science, 93: 123-136.

14. Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo (DZNM; 2001): Stočna hrana – Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari, Zagreb, Hrvatska.
15. Državni zavod za normizaciju i mjeriteljstvo (DZNM; 2010): Hrana za životinje - određivanje količine dušika i izračunavanje količine sirovih proteina – 2 dio: Razaranje u bloku/metoda destilacije parom, Zagreb, Hrvatska.
16. FEDNA (2008). Necesidades nutricionales para ruminates de cebo. NORMAS FEDNA. Ediciones Peninsular, Madrid.
17. Feldhofer S., Kalivoda M. (1980). Benural S u hranidbi preživača. Petrokemija, Kutina.
18. Fenton T. W., Fenton M. (1979). An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and excreta. Journal of Animal Science, 59: 631-63.
19. Forero O., Owens F. N., Lusby K. S. (1980). Evaluation of slow-release urea for winter supplementation of lactating range cows. Journal of Animal Science, 50: 532-538.
20. Galo E., Emanuele S. M., Sniffen C. J., White,J. H., Knapp J. R. (2003). Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. Journal of Dairy Science, 86: 2154-2162.
21. Garcia F., Agabrili J., Micol J. (2007). Alimentation des bovins en croissance et a l'engrais. In: Alimentation des bovins, ovins et caprins. Edition Quea,Versailles.
22. Grbeša D. (2010). Primjenjena hranidba krava. Interna skripta. Sveučilište u Zagrebu. Agronomski fakultet
23. Hammond A. C. (1997). Update on BUN and MUN as a guide for protein supplementation in cattle. In: Proceedings of the Florida Ruminant Nutrition Symposium, University of Florida, Gainesville, 43-52.
24. Harmon D. L., Huntington G. B., Kristensen N. B., Hanson K. C., Spears J. W. (2006). Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. Animal Feed Science and Technology, 130: 225-241.
25. Hedquist H., Uden P. (2006). Measurement of soluble protein degradation in the rumen. Animal Feed Science and Technology, 126: 1-21.
26. Highstreet A., Robinson P.H., Robison J., Garrett J.G. (2010). Response of Holstein cows to replacing urea with a slowly rumen released urea in a diet high in soluble crude protein. Livestock Science, 129: 179-185
27. Hristov A. N., Jouany J. P. (2005). Factors Affecting the Efficiency of Nitrogen Utilization in the Rumen. In: Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle (Pfeffer E., Hristov A. N., Ur.). CABI Publishing, Cambridge, 117-176
28. Huntington G. B., Harmon D. L., Kristensen N. B., Hanson K. C., Spears J. W. (2006). Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. Animal Feed Science and Technology, 130: 225-241.

29. Hoover W. H., Stokes S. R. (1991). Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. Journal of Dairy Science, 74: 3630–3644.

30. Hunerberg M., McGinn S. M., Beauchemin K. A., Okine E. K., Harstad O. M., McAllister T. A. (2013). Effect of dried distillers' grains with solubles on enteric methane emissions and nitrogen excretion from finishing beef cattle dried distillers' grains with solubles on enteric methane emissions and nitrogen excretion from finishing beef cattle. Canadian Journal of Animal Science, 93:373-385.

31. INRA (2007). Alimentation des ruminants. INRA Editions, Versailles.

32. Köster H. H., Cochran R. C., Titgemeyer E. C., Vanzant E. S., Abdelgadir I., St-Jean G. (1996). Effect of increasing degradable intake protein on intake and digestion of low-quality, tallgrass-prairie forage by beef cows. Journal of Animal Science, 74: 2473-2481.

33. Leek B. F. (2004). Digestion in the Ruminant Stomach. In: Dukes' Physiology of Domestic Animals. Cornell University Press, Ithaca, 438-474.

34. Li S., Khafipour E., Krause D.O., Kroeker A., Rodriguez-Lecompte J.C., Gozho G.N., Plaizier J.C. (2012). Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. Journal of Dairy Science, 95: 294-303.

35. Lapierre H., Lobley G. E. (2001). Nitrogen recycling in the ruminant: a review. Journal of Dairy Science 84 (suppl.), E223–E236.

36. MacCracken J. G. (1980). Intraspecific changes in fecal pH. The Journal of Wildlife Management, 44: 752-756.

37. Nutritional research Council (NRC) (2016). Nutrient Requirement of Beef Cattle. Eight revised edition. The National Academic Press, Washington, D.C.

38. Ørskov, E.R. (1998). The feeding of ruminants. Chalcombe Publications, Welton.

39. Owens F. N., Lusby K. S., Mizwicki K., Forero O. (1980). Slow ammonia release from urea: rumen and metabolism studies. Journal of Animal Science, 50: 527-531.

40. Petrokemija (2017) <http://www.petrokemija.hr/Temeljnedjelatnosti/Glinarskiproizvodiiteku%C4%87agnojiva/Primjena.aspx>. Pristupljeno 12.02.2017.

41. Pérez-Vendrell A. M., Torrallardona D. (2010). In vitro digestibility kinetics of diets containing different cereal sources. Livestock Science, 134: 47-49.

42. Ramadan P., Harapin I. (1998). Interna klinička propedeutika domaćih životinja. Pretraga krvi i krvotvornih organa. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, 115-144.

43. Reynolds C. K, Kristensen N.B. (2008). Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: Asynchronous symbiosis. Journal of Animal Science, 86(E-Suppl.1):E293– E305.

44. Roseler D.K., Ferguson J.D., Sniffen C.J., Herrema J. (1993). Dietary protein degradibility effects on plasma and milk urea nitrogen and milk non-protein nitrogen in holstein cows. Journal of Dairy Science, 76: 525-534.

45. Russell, J.B. (2002). Rumen microbes and its role in ruminant nutrition. James B. Russell, Ithaca, NY.

46. Sauvant D., Perez J.M., Tran G. (2004). Tables of composition and nutritive value of feed materials: Pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses, fish. INRA Editions Versailles.

47. Schneider B. H., Flatt W. P. (1975). The evaluation of feeds through digestibility experiments. University of Georgia Press, Athens.

48. Schwab C.G., Huhtanen P., Hunt C.W., Hvelplund T. (2005). Nitrogen requirements of cattle. In: Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle (Pfeffer E., Hristov A. N., Ur.). CABI Publishing, Cambridge, 13-71.

49. Stewart G. S., Smith C. P. (2005). Urea nitrogen salvage mechanisms and their relevance to ruminants, non-ruminants and man. Nutrition Research Reviews, 18: 49-62.

50. Tašić, F. (2015). Metabolički profil krava pasmine holstein na farmi Vrana doo. Diplomski rad, Sveučilište Josip Juraj Strossmayer Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

51. Taylor-Edwards C.C., Elam N.A., Kitts S.E., McLeod K.R., Axe D.E., Vanzant E.S., Kristensen N.B., Harmon D.L. (2009). Influence of slow-release urea on nitrogen balance and portal-drained visceral nutrient flux in beef steers. Journal of Animal Science, 87: 209-221.

52. Tedeschi L. O., Baker M. J., Ketchen D. J., Fox D. G. (2002). Performance of growing and finishing cattle supplemented with a slow-release urea product and urea. Canadian Journal of Animal Science, 82: 567-573.

53. Virtanen A.I. (1966). Milk production of cows on protein-free feed. Science, 153: 1603-1614.

54. Zanton G. I., Heinrichs A. J.(2008). Rumen digestion and nutritional efficiency of dairy heifers limit-fed a high forage ration to four levels of dry matter intake. Journal of Dairy Science, 91: 3579-3588.

55. Waite R., Wilson A. G. (1968). The composition of rumen fluid from cows fed biuret and urea. Journal of Dairy Research, 35: 203-212.