การวัดผลผลิตจุลินทรีย์ไนโตรเจนจากกระเพาะรูเมนโดยใช้ อัลแลนตอยในน้ำปัสสาวะ และค่าทางเคมีของเลือดในโครุ่นพันธุ์บราห์มันที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนของอาหารหยาบกับอาหารข้นต่าง ๆกัน

วรรณวิภา สุทธิไกร[1*] สังวร อยู่สว่าง [1] สุริยา กิจสำเร็จ [2] สรรเพชญ โสภณ[1] และ ทองสุข เจตนา[1]
[1] คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ ปทุมวัน กทม. 10330 โทร.02-2189733-39
[2] เอส เค พัทยา แรนซ์ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี 20150

บทคัดย่อ

การวัดผลผลิตจุลินทรีย์ไนโตรเจนจากกระเพาะรูเมนโดยการใช้อัลแลนตอยในน้ำปัสสาวะและค่าทางเคมีในเลือดเพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้อาหาร ในการศึกษานี้ใช้โครุ่นพันธุ์ บราห์มันเพศผู้ อายุประมาณ 1 ปี จำนวน 4 ตัว โดยได้รับอาหารที่มีอาหารหยาบ (ใยสับปะรด) กับอาหารข้นในอัตราส่วนต่างๆกัน 4 แบบ ดังนี้ 1) ใยสับปะรด 80 % : อาหารข้น 20 % 2) ใยสับปะรด 60% : อาหารข้น 40 % 3) ใยสับปะรด 40% : อาหารข้น 60 % และ 4) ใยสับปะรด 20 % : อาหารข้น 80 %) โดยมีแผนการทดลองเป็นแบบ 4 ×4 Latin square design

ผลการทดลองพบว่า การเพิ่มสัดส่วนของอาหารข้นในอาหารทำให้ปริมาณการผลิตจุลินทรีย์ไนโตรเจนในกระเพาะรูเมนของโค และค่าความเข้มข้นของ Insulin และ Urea-N ในเลือด ค่าความเข้มข้นของ Urea-N ในน้ำปัสสาวะมีการเพิ่มขึ้นเป็นแบบเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลต่อค่าความเข้มข้นของ Glucose และ Creatinine ในเลือด ซึ่งสรุปได้ว่า การวัดประสิทธิภาพของการใช้อาหารในโคบราห์มันนั้น นอกจาก การใช้ Allantoin ในน้ำปัสสาวะเพื่อประเมินผลผลิต จุลินทรีย์แล้วนั้น ยังสามารถใช้ค่าทางเคมีของเลือดหลายๆค่าประกอบด้วยทำให้การประเมิน ประสิทธิภาพของการใช้อาหารของโคพันธุ์บราห์มันได้ถูกต้อง

Determination of Microbial Nitrogen Production by Using Urinary Allantoin and Blood Metabolite Concentrate in Growing Brahman Cattle Fed the Different Proportion of Roughage and Concentrate in Diets

Wanvipa Suthikrai [1*], Sungwon Usawang [1], Suriya Kijsamrej [2], Sunpetch Sophon [1] and Thongsuk Jetana [1]

[1] Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Henri-Dunant street ,Phathumwan, Bangkok 10330, Tel (662)2189733-39

[2] S.K. Pattaya Ranch, , Bang LaMung, Chonburi, Thailand 20150

Abstract

Determination of microbial nitrogen synthesis by using urinary allantoin and blood metabolite for evaluating the efficiency of feed utilization, in this study was conducted by using four Brahman bulls (about 1 year old). Animals were fed *ad libitum* with 4 fixed diets of four combinations of pineapple fibre (P) and concentrate (C) in the proportions, on dry matter basis of 0.8:0.2 (P80:C20), 0.6:0.0.4 (P60:C40), 0.4:0.6 (P40:C60) and 0.2:0.8 (P20:C80). The experiment was designed as a 4 ×4 Latin square design

The results showed that increasing in the proportion of concentrate linearly increased the rumen microbial nitrogen production (p<0.001), the concentrations of Insulin and urea-N in plasma and the concentration of urea-N in the urine, but not affected on the concentrations of glucose and creatinine in plasma. In conclusion, the using of allantoin urinary associated with blood metabolite can evaluate the accuracy in evaluation of feed utilization in Brahman cattle.

Key words: Microbial nitrogen, Allantoin, Pineapple fibre, Urea-N, Insulin, Creatinine, I^{125}, Brahman cattle

คำนำ

สัตว์เคี้ยวเอื้องมีรูเมน(Rumen)เป็นกระเพาะส่วนใหญ่ที่สุดและเป็นแหล่งผลิตจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จำนวนมาก จุลินทรีย์เหล่านี้ทำหน้าที่ย่อยสารอาหารต่างๆ โดยเฉพาะสารเยื่อใย เมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้ไหลผ่านไปยังกระเพาะจริงก็จะถูกย่อยและกลายเป็นแหล่งโปรตีนอย่างดีต่อตัวสัตว์อาจมีปริมาณคิดเป็น40-80% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ไหลมายังกระเพาะจริง (McDonald *et al*., 1995). สัตว์เคี้ยวเอื้องที่กินวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรโดยเฉพาะในเขตร้อนแหล่งโปรตีนที่ได้รับเกือบทั้งหมดของสัตว์จะมาจากจุลินทรีย์เหล่านี้ (Orskov,1982) ดังนั้นโปรตีนที่สัตว์เคี้ยวเอื้องได้รับจะมาจาก 2 แหล่งสำคัญ คือ อาหารที่กินเข้าไป และปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ในกระเพาะรูเมน ดังนั้นการวัดปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตในกระเพาะรูเมน จะเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพการใช้อาหารในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

วิธีการวัดปริมาณผลผลิตของจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ในกระเพาะรูเมน โดยทั่วๆไปจะอาศัยการใช้ markers ที่มีอยู่ในตัวของจุลินทรีย์เองเช่น Ribonucleic acid (RNA), Diamino pimelic acid (DAPA) หรือสารรังสีเคมี เช่น ^{3}H, ^{35}S, ^{15}N หรือ ^{32}P อย่างไรก็ดีการวัดด้วยวิธีเหล่านี้ต้องอาศัยสัตว์ที่ได้รับการผ่าตัดที่ลำไส้เล็กมาศึกษา และมีวิธีการที่ยุ่งยาก ทำให้วิธีการนี้มีข้อจำกัดมากขึ้นที่จะนำไปใช้

อนุพันธุ์พิวรีนได้แก่ Allantoin และ uric acid ในน้ำปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับปริมาณจุลินทรีย์ของกระเพาะรูเมนในแกะ (Topps and Elliott, 1965) ต่อมาได้มีการศึกษาและพัฒนาจนกระทั่งมีการสร้างสมการที่ใช้พยากรณ์การผลิตจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนกับอนุพันธุ์พิวรีนในน้ำปัสสาวะของแกะ (Chen *et al.,* 1990A) แพะ (Jetana *et al.,* 2003A) และโค (Verbic *et al.,* 1990) และมีรายงานว่า Allantoin เพียงค่าเดียวในน้ำปัสสาวะสามารถใช้วัดปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตได้จากกระเพาะรูเมนได้ดีในโค (Lamothe *et al.,* 2002) ต่อมาการใช้อนุพันธุ์พิวรีนเพื่อวัดปริมาณการผลิตจุลินทรีย์จากกระเพาะรูเมนจึงกลายเป็นวิธีการวัดที่นิยมวิธีหนึ่ง เนื่องจากสัตว์ทดลองไม่ต้องมีการผ่าตัด แต่อย่างไรก็ดีการย่อยได้ในกระเพาะรูเมนจะมีผลต่อความเข้มข้นของ Blood metabolite ในเลือด (Shingfield *et al*., 2002)

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อวัดปริมาณจุลินทรีย์ไนโตรเจนที่ผลิตได้จากกระเพาะรูเมน โดยการคำนวณจากปริมาณ Allantoin น้ำปัสสาวะของโคบราห์มันที่ได้รับอาหารที่มีสัดส่วนระหว่างใยสับปะรดกับอาหารข้นต่างกัน
2. เพื่อวัดระดับ Urea-N, Creatinine, Glucose และ Insulin ในเลือดและหาความสัมพันธ์กับค่าพารามิเตอร์ตัวอื่น เพื่อประเมินประสิทธิภาพการใช้อาหารมีสัดส่วนระหว่างใยสับปะรดกับอาหารข้นต่างกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

โคบราห์มันเพศผู้อายุประมาณ 1 ปี จำนวน 4 ตัว มีน้ำหนักเริ่มต้นการทดลองเฉลี่ย 290.0 $\pm$ 7.8 กิโลกรัมและน้ำหนักสิ้นสุดการทดลองเฉลี่ย 356.0 $\pm$ 12.0 กิโลกรัม โดยทำการทดลองที่ เอส เค พัทยา แรนช์ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี

วิธีการทดลอง

โคทุกตัว ได้รับอาหารที่กำหนด 4 แบบ โดยให้กินอย่างเต็มที่ อาหารแต่ละแบบ มีสัดส่วนของน้ำหนักแห้ง (DM basis) ซึ่งประกอบด้วย

1. ใยสับปะรด 80% กับอาหารข้น 20% (P 80)
2. ใยสับปะรด 60% กับอาหารข้น 40% (P 60)
3. ใยสับปะรด 40% กับอาหารข้น 60% (P 40)
4. ใยสับปะรด 20% กับอาหารข้น 80% (P 20)

การทดลองนี้ออกแบบเป็น 4x4 Latin square โดยแบ่งออกเป็น 4 รอบ รอบละ 16 วัน ในแต่ละรอบแบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ

ระยะที่ 1 10 วัน เป็นช่วงปรับตัวเข้ากับอาหาร

ระยะที่ 2 6 วัน เป็นช่วงเก็บตัวอย่าง

โคแต่ละตัวจะถูกขังในกรงเดี่ยวและให้อาหารตามตารางที่ 1 เป็นเวลา 9 วัน ก่อนที่จะย้ายไปอยู่ในกรง metabolic crate ซึ่งมีที่เก็บน้ำปัสสาวะ และอุจจาระแยกกัน

Table I Rotation of Brahman Cattle and Diets in a 4×4 Latin Square Design

Rotation	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
1	P20	P40	P60	P80
2	P80	P20	P40	P60
3	P60	P80	P20	P40
4	P40	P60	P80	P20

การเก็บตัวอย่าง

ปริมาณการกินได้

ปริมาณการกินได้ และปริมาณอุจจาระทำการบันทึกทุกวันเป็นเวลา 5 วัน โดยเก็บ 10 % ของปริมาณอาหารที่ให้ และอาหารที่เหลือทุกวัน และ 10 % ของปริมาณอุจจาระ แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์

น้ำปัสสาวะ

น้ำปัสสาวะของโคแต่ละตัวถูกเก็บจากการไหลผ่านตะแกรงใต้กรงแล้วและมีถุงพลาสติกที่บรรจุ 20% กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) 100 มิลลิลิตรรองรับ เพื่อให้ได้น้ำปัสสาวะที่สะอาด และ มี pH ต่ำกว่า 3 น้ำปัสสาวะจะถูกเก็บทุก ๆ 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 5 วัน ในวันที่ 11-15 ในแต่ละรอบของการทดลอง น้ำปัสสาวะที่เก็บได้จะถูกบันทึกและถูกทำเจือจาง 5 เท่า ด้วยน้ำกลั่นทันที และเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ –20 เซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์หา Allantoin และ Creatinine

เลือด

การเก็บตัวอย่างเลือดเก็บที่เวลา 0, 3, 6 และ 9 ชั่วโมงหลังจากการให้อาหารเช้า ของวันที่ 16 ของแต่ละรอบการทดลองรวม 4 รอบของการทดลองทั้งหมด เลือดที่เก็บได้จะนำมาปั่นแยก ที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที Plasma ถูกแยกเก็บไว้ในหลอดพลาสติกขนาด 5 ml จำนวน 2 หลอด แล้วเก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ –20 เซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์หา Urea-N, Creatinine, Glucose และ Insulin

การวิเคราะห์ทางเคมี

การวิเคราะห์ทางเคมีของอาหารที่ให้และอาหารที่เหลือ กับอุจจาระ

ตัวอย่างอาหารถูกอบแห้งจนได้รับน้ำหนักคงที่ ในตู้อบอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นตัวอย่างอาหารถูกบดให้มีขนาดเล็กกว่า 2 มิลลิเมตร ก่อนที่นำมาทำการวิเคราะห์ทางเคมี

วัตถุแห้ง (Dry matter) ในอาหารสัตว์ วัดโดยการอบแห้งจนได้น้ำหนักคงที่ ในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ไนโตรเจนของอาหารสัตว์ใช้วิธี Kjedahl (AOAC,1984)

การวิเคราะห์หา Allantoin และ Creatinine ในน้ำปัสสาวะ

การวัดอนุพันธุ์พิวรีนได้แก่ Allantoin และ Creatinine ในน้ำปัสสาวะ ทำตามวิธีการวัดของ Balcells *et al.,* (1992) โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์หา Metabolite ในเลือด

ความเข้มข้นของ Creatinine ในเลือดทำการวัดทุกๆตัวอย่างที่เก็บโดยใช้วิธีการตามแบบ Jaffe ด้วยวิธีการของ Haeckel and Hannover (1972) โดยโปรตีนในตัวอย่างเลือดถูกแยกออก (Deproteinization) ด้วย Tungstic acid แล้วปั่นแยก ที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เวลา 20 นาที หลังจากการปั่นแยก แล้ว ของเหลวที่ได้นำมาทำการ Form สี ด้วยสารละลาย Picrate alkaline ได้เป็นสารละลายที่มีสีส้ม แล้วนำมาอ่าน Absorbance ที่ Wave length 500 ηm.

ความเข้มข้นของ Glucose ในเลือดทำการวัดทุกๆตัวอย่างที่เก็บโดยใช้วิธีการของ Barham and Trinder (1972) โดยที่ Glucose ถูกย่อยด้วย Glucose oxidase เพื่อเปลี่ยนเป็น Hydrogen peroxide แล้ว Hydrogen peroxide ก่อนทำปฏิกริยาให้เกิดสีม่วงกับ Phenol และ 4-aminophenazone โดยที่มี Peroxidase เป็นตัวเร่งปฏิกริยา ก่อนอ่าน Absorbance ที่ Wave length 500 ηm

ความเข้มข้นของ Urea-N ในเลือดและน้ำปัสสาวะทำการวัดทุกๆตัวอย่างที่เก็บโดยใช้วิธีการของ Kassirer (1971) โดยที่ Urea-N ในตัวอย่างถูกย่อยด้วย Urease แล้วได้ Ammonia กับ CO_2 จากนั้น Ammonia ถูกทำปฏิกริยากับ 2-oxyglutarate และ NADH โดยที่มี Glutameta-dehydrogenase (GLDH) ร่วมอยู่ด้วยก่อนที่เปลี่ยนเป็น Glutamate และ NAD^+ เนื่องจากข้อจำกัดของ GLDH ตัวอย่างต้องอ่าน Absorbance ที่ Wave length 340 ηm ในเวลาที่เท่ากันหลังทำการทำ ปฏิกริยา

ความเข้มข้นของ Insulin ในเลือด ทำการวัดทุกๆตัวอย่างที่เก็บโดยใช้ชุดสำเร็จ Coat-A-Count®-Insulin (Diagnostic Products Corporation, USA) ซึ่งเป็น Solid-Phase ^{125}I radioimmunoassay สำหรับการตรวจวัดระดับ Insulin ใน Plasma โดยที่ ^{125}I-labeled insulin และ Insulin ในตัวอย่างเลือดมาแย่งกันจับ Insulin-specific antibody ที่จับอยู่ที่หลอดทดลอง แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้งและนำส่วนที่จับกับ Insulin antibody ทำการตรวจวัดด้วย Gramma Counter ค่าที่ได้เป็น Count Per Minute (CPM) และคำนวณหาความเข้มข้นจากการเปรียบเทียบกับ Insulin มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0, 5, 15, 50, 100, 200 และ 350 μIU/ml

การคำนวณ

1) Microbial purines absorption = (PD excretion-0.385× $BW^{0.75}$)/0.85 (Chen and Gomez, 1995)

2) Microbial Nitrogen Production = (Microbial purines absorption × 70)/(0.116 × 0.83 × 1000) (Chen and Gomes, 1995)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบบของการให้อาหาร วิเคราะห์โดย Analysis of Variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis (SAS, 1988) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบด้วยวิธี least significant difference (LSD)

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ที่เป็นแบบ Linear, quadratic และ cubic ใช้วิธี General Linear Measurement (Proc GLM, SAS, 1988)

ความเข้มข้นของ Creatinine Urea-N Glucose และ Insulin ในเลือดที่เวลาต่างกัน วิเคราะห์แบบ Spilt-plot analysis of variance (Snedecor and Cochran, 1967) ตามแบบ

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + P_j + T_k + eijk + H_i + (A_{hil}) + (TH)_{kl} + eijklm$$

โดยที่ μ คือ ค่าเฉลี่ยของ โคทดลอง(A_i) ระยะเวลา (P_j) อาหาร(T_k) และ อิทธิพลของเวลาที่เก็บตามลำดับ *eijk* คือ main plot error and *eijklm* คือ sub-plot error โดยที่ main plot คือ อิทธิพลของ อาหาร ระยะเวลา และ โคทดลอง และ อาหาร × ระยะเวลา × โคทดลอง คือ the main-plot error ส่วน subplot error คือการทดสอบว่าปฏิกริยาร่วมระหว่าง อาหาร × เวลาของการเก็บตัวอย่าง ถ้าค่าทดสอบพบว่า $p<0.05$ ถือว่าเวลาของการเก็บตัวอย่างกับอาหารมีปฏิกริยาร่วมกัน

การวิเคราะห์หาความค่าสัมพันธ์ระหว่าง ค่าความเข้มข้นทางเคมีของเลือดกับค่าเฉลี่ยของ Urea-N, Allantoin และ Creatinine ในน้ำปัสสาวะใช้วิธี Proc Corr. และ GLM (SAS, 1988)

การเปรียบทางสถิติในการทดลองนี้ ถือว่ามีความแตกต่างกันก็ต่อเมื่อ ค่า $p<0.05$ ส่วนค่า $0.05<p<0.01$ นั้นถือว่ามีแนวโน้มที่เป็นไปได้

ผลการทดลอง

ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ทดลองกับค่าวิเคราะห์ทางเคมีแสดงในตารางที่ 2 ระดับโปรตีนในอาหารมีความแตกต่างกันตาม รูปแบบการให้อาหาร (20 % 15.6 % 11.2 % และ 6.8 %) แต่ไม่มีผลต่อปริมาณการกินได้ (5.06-5.63 กิโลกรัม) ของโคบราห์มันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) อย่างไรก็ดีปริมาณการกินได้ของไนโตรเจนมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.001) เนื่องจากความเข้มข้นของไนโตรเจนในอาหารเพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 3

ผลกระทบของอาหารต่อปริมาณการกินได้ของโค ปริมาณ Urea-N, Allantoin และ Creatinineในน้ำปัสสาวะ และปริมาณจุลินทรีย์แสดงในตารางที่ 3 การศึกษานี้พบว่าปริมาณ Urea-N (p<0.0001), Allantoin (p<0.001), Creatinine (p<0.03) และปริมาณ จุลินทรีย์ Purines (p<0.0001) มีการเพิ่มขึ้นแบบ Linear อย่างมีนัยสำคัญเมื่อสัดส่วนของอาหารข้นเพิ่มขึ้น ปริมาณจุลินทรีย์ไนโตรเจนในกระเพาะรูเมนก็มีการเพิ่มขึ้นแบบ Linear (p<0.0001) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อสัดส่วนของอาหารข้นเพิ่มขึ้นเช่นกัน อย่างไรก็ดี Urea-N (p<0.03) มีการเพิ่มขึ้นแบบ Quadratic อย่างมีนัยสำคัญเมื่อสัดส่วนของอาหารข้นเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4 แสดงผลกระทบของอาหารต่อปริมาณความเข้มข้นของค่าทางเคมีในเลือด ปรากฏว่าเวลาของการเก็บต่างๆไม่มีอิทธิพล (p>0.05) ต่อค่าความเข้มข้นของค่าทางเคมีในเลือดที่วัดทุกตัวหลังทดสอบ Spilt-plot Analysis of Variance แล้ว อย่างไรก็ดีความเข้มข้นของ Urea-N (PUN) ในเลือด (p<0.008) และ ความเข้มข้นของ Insulin (p<0.05) มีการเพิ่มขึ้นแบบ linear อย่างมีนัยสำคัญเมื่อสัดส่วนของอาหารข้นเพิ่มขึ้นและยังมีการเพิ่มขึ้นแบบ Quadratic (p<0.02) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อสัดส่วนของอาหารข้นเพิ่มขึ้น ส่วนความเข้มข้นของ Glucose มีค่าสูงสุดในโคที่ได้รับอาหารที่มีอาหารข้น 40% ส่วน Creatinine ในเลือดไม่มีความแตกกัน (p>0.05) ในโคที่รับอาหารต่างๆ

ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นทางเคมีในเลือด (Blood metabolite) กับค่าเฉลี่ยของ Urea-N, Allantoin และ Creatinine ในน้ำปัสสาวะ การศึกษานี้พบว่าความเข้มข้นของ Urea-N ในเลือดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อ Allantoin (r=0.6119 และ p=0.0118) และ Creatinine (r=0.7297และ p=0.0013) ในน้ำปัสสาวะ ในขณะเดียวกัน ความเข้มข้นของ Insulin ในเลือดมีแนวโน้มที่มีสัมพันธ์ต่อความเข้มข้นของ Urea-N (r=0.4688 และp=0.0670) ในน้ำปัสสาวะ ความเข้มข้นของ Urea-N ในน้ำปัสสาวะมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อปริมาณ Allantoin (r=0.5422 และ p=0.0300) ในน้ำปัสสาวะ เช่นเดียวกันปริมาณ Allantoin ในน้ำปัสสาวะมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อ Creatinine (r=0.5422 และ p=0.0300)ในน้ำปัสสาวะ

วิจารณ์ผลการทดลอง

อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องส่วนมากมีปริมาณพิวรีนรีนต่ำและพิวรีนเหล่านั้นจะถูกย่อยด้วย จุลินทรีย์ในกระเพาะอย่างรวดเร็ว ดังนั้น Nucleic acids ที่ไหลออกมาจากกระเพาะรูเมนผ่านมายังลำไส้เล็กส่วนใหญ่มาจากจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน (McAllan and Smith, 1973) แล้ว Microbial nucleic acids ที่ถูกดูดซึมจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ต่าง ๆ แล้วเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์พิวรีนต่างๆ เช่น Allantoin, uric acid, xanthine และ hypoxanthine แล้วถูกขับออกทางปัสสาวะโดยที่มี Allantoin จะเป็นตัวสุดท้ายของ Purine metabolismในแกะและแพะ แต่เนื่องจาก Xanthine oxidase ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของโค จะมีปริมาณสูง ทำให้เราพบเพียง a Allantoin และ uric acid ในน้ำปัสสาวะ (Chen *et al*., 1990B) แล้วพบว่า Allantoin ในน้ำปัสสาวะ มีความสัมพันธ์อย่างสูงกับปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้เล็ก ทำให้การวัดปริมาณ Allantoin ในน้ำปัสสาวะ เป็นวิธีการหนึ่งที่จะใช้วัดปริมาณจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนได้ (Rys *et al.,* 1975 และ Phuchala and Kulasak, 1992)

ปริมาณ Allantoin ในน้ำปัสสาวะมีผลมาจากหลายปัจจัยเช่น ปริมาณการกินได้ ชนิดของโปรตีน พลังงาน อาหารเสริม น้ำหนักตัวและสายพันธุ์ ในการศึกษานี้แม้ว่าปริมาณการกินได้ไม่แตกต่างกันระหว่างแบบการให้อาหาร แต่ปริมาณ Allantoin ในน้ำปัสสาวะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณโปรตีนและอาหารข้นเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา (Vercoe, 1976, Giesecke *et al.,*1993, and Liang *et al.,*1994) ว่า ปริมาณ Allantoin ในน้ำปัสสาวะของโคมีผลอันเนื่องมาจากการกินได้ของพลังงาน และโปรตีน De Boever *et al.,* (1998) ได้รายงานว่าปริมาณโปรตีนที่ย่อยได้ง่ายมีความสัมพันธ์อย่างสูงกับ ปริมาณ Allantoin ในน้ำปัสสาวะ

ของโค การศึกษานี้สอดคล้องกับ Gonda *et al.,* (1996) รายงานว่า Allantoin ในน้ำปัสสาวะของโคนมที่ได้รับอาหารหยาบและอาหารข้นที่มีสัดส่วนต่าง ๆเพิ่มขึ้นเมื่อสัดส่วนของอาหารข้นเพิ่มขึ้น เป็นการยืนยันว่าปริมาณ Allantoin ในน้ำปัสสาวะมีผลมาจากปริมาณการกินได้ของโปรตีนในสัดส่วนของอาหารข้นที่เพิ่มขึ้น

การศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณ Creatinine ในน้ำปัสสาวะมีผลมาจาก แบบการให้อาหาร ได้แก่ ปริมาณโปรตีนและพลังงาน ซึ่งตรงกับรายงานของ Faichiney *et al.,* (1995) รายงานว่าปริมาณ Creatinine ในน้ำปัสสาวะของแกะมีผลมาจากการกินโปรตีน กับ Gonda *et al.,* (1996) รายงานว่าปริมาณ Creatinine ในน้ำปัสสาวะของโคนมมีการเพิ่มขึ้นก็ต่อเมื่อสัดส่วนของอาหารข้น เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ดีการศึกษานี้ให้ผลตรงข้ามกับ Gonda และ Lindberge, (1994) รายงานไว้ก่อนว่า ปริมาณ Creatinine ในโคนมไม่มีผลมาจากอาหาร ความแตกต่างในเรื่องนี้ยังไม่ชัดเจน อาจอธิบายได้ว่าปริมาณ Creatinine ในน้ำปัสสาวะ มีผลมาจากขบวนการใช้โปรตีน (Protein metabolism) หรือ สถานภาพทางสรีระ (physiological status) ในสัตว์

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนมีผลมาจาก แบบการให้อาหาร คือ ปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นก็ต่อเมื่อปริมาณโปรตีนและอาหารข้นเพิ่มขึ้น ซึ่งตรงกับรายงานของ Kolade และ Ternouth, (1996) รายงานว่าปริมาณจุลินทรีย์ในกระเพาะของโค Braford steer เพิ่มขึ้น 40 % เมื่อโปรตีนในอาหารเพิ่มขึ้น 40 % ซึ่งคล้ายกับรายงานของ De Boever *et al.,* (1998) พบว่าปริมาณอาหารโปรตีนที่ย่อยง่ายมีความสัมพันธ์อย่างสูงกับปริมาณจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ในโค นอกจากนั้น Kolade และ Ternouth, (1996) พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนไม่ได้มีผลเนื่องจากโปรตีนในอาหารเพียงอย่างเดียว แต่พลังงานในอาหารก็มีส่วนสำคัญด้วย ตรงกับรายงานของ Jetana *et al.,* (2000) ว่าปริมาณจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนไม่มีผลอันเนื่องมาจากโปรตีนในแกะ ที่ให้หญ้ากินนี และเสริมด้วยโปรตีน 2 ชนิด ถั่วเหลืองและปลาป่น กับพลังงาน 2 ชนิด แป้งข้าวโพด กับ กระดาษ แต่มีแนวโน้มที่มีผลอันเนื่องมาจากแป้งข้าวโพด เป็นการสะท้อนให้เห็นว่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ มีผลมาจากชนิดของพลังงาน ขณะที่ปริมาณโปรตีนมีปริมาณไม่จำกัด

การเพิ่มขึ้นของปริมาณของจุลินทรีย์ไนโตรเจนนั้นเป็นการแสดงเห็นว่ามีประสิทธิภาพของการใช้โปรตีนในกระเพาะรูเมนซึ่งทำให้ปริมาณ Urea-N ในเลือดลดลง ในการศึกษานี้พบว่า ความเข้มข้นของ Urea-N ในเลือดมีความสัมพันธ์ต่อปริมาณ Allantoin และ Creatinine ในน้ำปัสสาวะ และยังพบว่าความเข้มข้นของ Insulin ในเลือดมีแนวโน้มที่มีสัมพันธ์ต่อความเข้มข้นของ Urea-N ในน้ำปัสสาวะ และความเข้มข้นของ Glucose ในเลือด ซึ่งสอดคล้องกับ Guerino *et al.,* (1991) รายงานว่า ความเข้มข้นของ Insulin ในเลือดจะสูงขึ้นในโคที่ได้รับโปรตีนสูงขึ้น อย่างไรก็ดีความเข้มข้นของ Urea-N ในเลือดสูงเป็นการสะท้อนให้เห็นว่าอาหารที่ให้มีโปรตีนสูงเกินไป และเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการใช้อาหาร (โปรตีน) ในกระเพาะรูเมนต่ำ

ในขณะเดียวกันพบว่าความเข้มข้นของ Urea-N ในน้ำปัสสาวะมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันปริมาณ Allantoin ในน้ำปัสสาวะ เช่นเดียวกันปริมาณ Allantoin ในน้ำปัสสาวะมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญต่อ Creatinine ในน้ำปัสสาวะ เป็นการแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนสูงขึ้นนั้น ไม่ได้หมายความว่ามีการเพิ่มประสิทธิภาพของของการใช้อาหารโปรตีนสูงขึ้นตาม ซึ่งเห็นได้จากมีการสูญเสียโปรตีนมากในรูปของ Urea-N สูงขึ้นในเลือดและน้ำปัสสาวะ อาจเป็นไปได้ว่าพลังงานในอาหารนั้นอาจไม่เพียงพอหรือไม่ได้สัดส่วนที่เหมาะกับปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ ซึ่ง Gonda and Lindberg, (1994) ได้รายงานว่า Milk urea-N and plasma urea-N เป็นดัชนีชี้วัดว่าปริมาณระดับโปรตีนในอาหารสัดส่วนระหว่างพลังงานและโปรตีนในอาหาร รวมทั้ง protein metabolism ในกระเพาะรูเมน

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนจากการวัดโดยอาศัย Allantoin ในน้ำปัสสาวะนั้นเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของอาหารข้นที่เพิ่มขึ้น และทำให้ความเข้มข้นของค่า Blood metabolite ได้แก่ Urea-N และ Insulin สูงขึ้นตามไปด้วย ส่วนความเข้มข้นของ Glucose และ Creatinine ในเลือดไม่มีการเปลี่ยนแปลง และยังพบว่าค่าความเข้มข้นของ Urea-N ในเลือดและปัสสาวะมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับค่า Allantoin ในน้ำปัสสาวะด้วย การศึกษานี้สรุปว่า การประเมินประสิทธิภาพของการใช้อาหารโดยเฉพาะโปรตีนและอาหารหยาบของโคบราห์มัน โดยมีค่าความเข้มของ Insulin, Urea-N ในเลือดและ Urea-N ในปัสสาวะร่วมกับการวัดจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนโดยอาศัยค่า Allantoinในน้ำปัสสาวะ ทำให้

การประเมิน ประสิทธิภาพการใช้อาหารโดยเฉพาะโปรตีนและอาหารหยาบได้ถูกต้องมากขึ้น การศึกษานี้ชี้ว่าอาหารที่มีสัดส่วนของใยสับปะรด 40% และอาหารข้น 60% เป็นอาหารที่ให้ประโยชน์สูงสุดต่อโคบราห์มัน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ ศ. น.ส.พ. ดร. ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุมัติให้ทำโครงการนี้ ขอบพระคุณ คุณสุริยา กิจสำเร็จ เจ้าของ เอส เค พัทยาแรนช์ ที่กรุณาให้ใช้โคบราห์มันในการทดลองตลอดจนให้ความร่วมมือเป็นอย่างดียิ่งขณะทำการทดลองที่ฟาร์ม ขอบพระคุณ รศ. น.สพ. ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ ผู้อำนวยการศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่กรุณาให้ใช้เครื่อง HPLC วิเคราะห์หาอนุพันธุ์พิวรีน และขอบพระคุณภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่กรุณาให้ใช้กรงสัตว์ทดลอง

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ Associate Professor Dr. Qium Balcells of Departmento de Produccion Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Spain. สำหรับคำแนะนำที่มีคุณค่ายิ่งต่อการศึกษานี้

เงินทุนวิจัยนี้เป็นเงินงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2545 ที่จัดสรรให้กับโครงการการใช้นิวเคลียร์เทคโนโลยีเพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก

เอกสารอ้างอิง

Association of Official Analysis Chemists. (1984). *Official Methods for Analysis of the Association Official Agriculture Chemists.* 14th ed. AOAC, Washington, D.C.: Association Official Agriculture Chemists.

Balcells, J., J. A. Guada, J. M. Peiró and D. S. Parker (1992) “Simultaneous Determination of Allantoin and Oxypurines in Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography,” *J. Chromatography* 575:153-157

Barham, D. and P. Trinder (1972) “An Improved Colour Reagent for the Determination of Blood Glucose by the Oxidase System” *Analyst,* 97:142-145

Chen X. B. and M. J. Gomez, (1995) “Estimation of Microbial Protein Supply to Sheep and Cattle Based on Urinary Excretion of Purine Derivatives- An Overview of the Technical Details. Occasional Publication 1992, International Feed Resources Unit, Rowette Research Insititute, Aberdeen, UK.

Chen, X. B., F. D. DeB. Hovell, E. R. Ørskov, E. R. and D. S. Brown (1990A) “Excretion of Purine Derivatives by Ruminants: Effect of Exogenous Nucleic acid Supply on Purine Derivative Excretion by Sheep,” *Brit. J. Nutri.* 63:131-142.

Chen, X.B., E. R. Ørskov and F. D. DeB. Hovell. (1990B) "Excretion of Purine Derivatives by Ruminants :Endogenous Excretion, Differences between Cattle and Sheep." *Brit. J. Nutr.,* 63:121-129.

De Boever J. L., N. Iantcheva, B. G. Cottyn, S. De Campeneere, L. O. Fiems and Ch. V. Boucqué (1998) “Microbial Protein Synthesis in Growing-finishing Bulls Estimated from the Urinary Excretion of Purine Derivatives,” *Anim. Feed Sci and Technol,* 75: 93-109.

Faichney, G. J., R. J. Welch and G. H. Brown (1995) “Prediction of the Excretion Allantoin and Total Purine Derivatives by Sheep From the ‘Creatinine Coefficient.” *J. Agri. Sci. Camb.* 125: 425-428.

Giesecke, D., J. Balsliemke, K. H. Sudekum and M. Stangassinger (1993) “Plasmaspiegel, Clearance sowie renale Ausscheidung von endogenen und ruminalen Purinen beim Rind.” *J. Anim. Physiol Anim. Nutr.,* 70:180-189

Gonda, H. L. and J. E. Lindberg, (1994) “Evaluation of Dietary Nitrogen Utilization in Dairy Cows based on Urea Concentrations in Blood, Urine and Milk and on Urinary Concentration of Purine Derivatives.” *Acta Agric. Scan., Sect. A, Anim. Sci.* 44: 236-245.

Gonda, H. L., M. Emanuelson and M. Murphy. (1996) " The Effects of Roughage to Concentrate Ratio in the Diet on Nitrogen and Purine Metabolism in Dairy Cows." *Anim. Feed. Sci. and Technol* 64: 24-42.

Guerio, F., G. B. Huntington, R. A. Erdman, T. H. Elsassaer and C. K. Reynolds (1991) “The Effects of Abomasal Casein Infusions in Growing Beef Steers on Portal and Hepatic Flux of Pancreatic Hormones and Arterial Concentrations of Somatomedin-C.” *J. Anim. Sci.* 69:379-386.

Haeckel, R. and M. H. Hannover (1972) “Assay of Creatinine in Serum, with Use of Fuller’s Earth to Remove Interferents” *Clin. Chem.* 27/1: 179-183.

Jetana T., N. Abdullah, J. B. Liang, S. Jalaludin and Y. W. Ho (2003A) “Urinary Excretion of Purine Derivatives as Markers for Development of Model to Estimate Rumen Microbial Nitrogen Production in Goats” The 20th Pacific Science Congress “Science & Technology for Healthy Environments” , 17-21 March, 2003, Sofitel, Bangkok, Thailand *Sym 3.2 poster- 9.*

Jetana, T., W. Suthigri, S. Usawang, S. Kijsamraj and S. Sophon (2003B) “The Use Urinary Purines for Prediction Microbial Protein Production in Rumen: Using Spot Sampling Times for the Prediction Microbial Protein in the Rumen of Brahman Cattle” The 41st Kasetsart University Annual Conference, 3-7 February, 2003, Kasetsart University, Bangkhen, Bangkok, Thailand *pp.* 82-95

Jetana T., N. Abdullah, R. A. Halim, S. Jalaludin and Y. W. Ho (2000) “Effects of Energy and Protein Supplementation on Microbial-N Synthesis and Allantoin Excretion in Sheep Fed Guinea Grass.” *Anim. Feed Sci. and Technol.* 84:167-181.

Kassirer, J. P. (1971) “Clinical Evaluation of Kidney-Function Glomerular Function.” New Eng. J. Med. 285:385-389.

Kolade, M.M., and J. H. Ternouth (1996) *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* Vol. 21 *p* 448.

Lamothe, M., T. Klopfenstein, D. Adams, J. Musgrave and G. Erickson (2002) “Urinary Allantoin as an Estimate of Microbial Protein Synthesis.” *J. Anim. Sci*. 80:91 (Supl. 2).

Liang. J. B., M. Matsumoto and B. A. Young. (1994) "Purine Derivative Excretion and Ruminal Microbial Yield in Malaysia Cattle and Swamp Buffalo." *Anim. Feed Sci. and Technol*. 47: 189-199.

McAllan, A. B. and R. H. Smith (1973) “Degradation of Nucleic Acids in the Rumen.” *Br. J. Nutr.* 29: 331-345.

McDonald, P., Ewards, R.A., Greenhalgh, J. F. D. and Morgan, C. A. (1995*) Animal Nutrition* Fifth edition, Longman scientific and technical, New York.

Ørskov., E. R. (1982) *Protein Nutrition in Ruminants* New York : Academic Press

Phuchala, R. and G. W. Kulasak (1992) “Estimation of Microbial Protein Flow from the Rumen of Sheep Using Microbial Nucleic Acid and Urinary Excretion of Purine Derivatives.” *Can. J. Anim Sci*. 721: 821-830.

Rys, R., A. Antoniewicz and J. Maciejewicz. (1975) “Allantoin in Urine as an Index of Microbial Protein in the rumen.” *In* Tracer Studies on Non-protein Nitrogen for Ruminants II, Vienna: IAEA, *pp* 95-98.

SAS, (1988). User,s Guide: Statistics, Relases 6.03 Edition, SAS Institute Inc., Cary NC.

Shingfield, K. J., S. Jaakkola and P. Huhtanen (2002) “Effect of Forage Conservation Method, Concentrate Level and Propylene Glycol on Diets Digestibility, Rumen Fermentation, Blood Metabolite Concentrations and Nutrient Utilisation of Dairy Cows” *Anim. Feed Sci. and Technol*. 97:1-21.

Snedecor and Cochran, (1967) *Statistical Methods*. 6th ed. Ames: The Iowa State University Press.

Topps, J. H. and R. C. Eillott (1965) “The Relationship Between Concentration of Ruminal Nucleic Acids and Purine Derivatives in Sheep.” *Nature.* 205: 498-499.

Verbic J., X. B. Chen, N. A. Macleod and E. R. Ørskov (1990) “Excretion of Purine Derivatives by Ruminants.” *J. Agri. Sci. (Camb)* 114: 243-248.

Vercoe, J. E. (1976) “Urinary Allantoin Excretion and Digestible Dry Matter Intake in Cattle and Buffalo.” *J. Agric. Sci. (Camb)* 86: 613-615.

Table II *Ingredients and Chemical Composition of the Diets*

Items	P 20	P 40	P 60	P 80
Ingredient (fresh weight/kg)				
Pineapple fiber [1/]	42.6	85.2	127.8	170.4
Concentrate [2/]	90.9	68.2	45.5	22.7
Chemical Composition (DM basis)				
Dry matter	100	100	100	100
% CP	20	15.6	11.2	6.8

[1/] contained (%): DM 47.79 %, ash 8.89%, organic matter 91.11% and nitogen 0.92%

[2/] contained (kg/100 kg): Cassava meal 35.3, Palm kernel cake 31 kg, Soybean meal 26, Mollasses 3.5 kg, dicalcium 0.8 kg, calcium carbonate 1.5 kg, urea 1.5 kg, sulphur 0.2 kg, salt 0.5 kg and 0.2 premix[3/]

[3/] contained (g/kg): vitamin A 4,000,000 unit, vitamin D3 400,000 unit, vitamin E 4000 unit, vitamin B12 0.002 g, Mn 16 g, Fe 24 g, Zn 10 g, Cu 2g, Se 0.05 g, Co 0.2 g, I 0.5 g .

Table III *Effect of Diets on Voluntary Intake(g/d), Urea-N (g/d), Allantoin and Creatine Excretion in the Urine (mmol/d) and Rumen Microbial Nitrogen (g/d)*

Items	Diets				SED [1/]	Treatment contrast (*p*-value)		
	P 20	P 40	P 60	P 80		*Lin*	*Qua*	*Cubic*
Body Weight (kg)	324	336	333	334				
BW $^{0.75}$	76	78	78	78				
Intakes (g/d)								
DM	5.244	5.063	5.632	5.413	0.53	ns	ns	ns
Nitrogen	168^{a}	126^{b}	101^{b}	59.5^{c}	0.01	0.001	ns	ns
In Urine								
Urea –N (g N/d)	9.56^{a}	10.1^{a}	5.96^{b}	2.26^{c}	1.16	0.0001	0.03	ns
Allantoin (mmol/d)	166^{a}	165^{a}	120^{b}	95^{b}	15	0.0001	ns	ns
Creatinine(mmol/	112^{a}	114^{a}	91.5^{bc}	86.7^{c}	11	0.03	ns	ns

d)								
Microbial Purines absorption [2/] **(mmol/d)**	192[a]	190[a]	129[b]	93.9[b]	**20**	**0.0001**	**ns**	**ns**
Rumen Microbial Nitrogen [3/] **(g N/d)**	140[a]	138[a]	93.8[b]	68.3[b]	**15**	**0.0001**	**ns**	**ns**

[1/] ***Standard Error Difference***

[2/] ***Microbial purines absorption = (PD excretion-0.385× $BW^{0.75}$)/0.85 (Chen and Gomes, 1995) where : 1 mmol allantoin in the urine = 0.84 mmol of PD in the urine (averaged from Jetana et al., 2003B).***

[3/] ***MN = (Microbial purines absorption × 70)/(0.116 ×0.83 × 1000)***

*** Means within the same row with the different superscripts are significantly (p<0.05) different***

ns : not significantly different (p>0.05)

Lin : Linear regression Qua: Quadratic regression and Cubic : Cubic regression

Table IV Effect of Diets on Blood Metabolite Concentration

Items	**Diets**				**SED** [1/]	**Treatment contrast (*p*-value)**		
	P 20	**P 40**	**P 60**	**P 80**		***Lin***	***Qua***	***Cubic***
Blood plasma								
Glucose (μmol /ml)	**5.17[b]**	**5.54[ab]**	**6.23[a]**	**5.32[b]**	**0.38**	**ns**	**ns**	**ns**
Urea N (mg/dl)	**24.35[a]**	**21.87[ab]**	**14.33[c]**	**14.11[c]**	**3.18**	**0.008**	**ns**	**ns**
Insulin (μIU/ml)	**14.6[a]**	**13.1[ab]**	**16.6[a]**	**8.9[b]**	**2.57**	**0.05**	**0.02**	**ns**
Creatinine (μmol/ml)	**121**	**126**	**130**	**125**	**6.12**	**ns**	**ns**	**ns**

[1/] ***Standard Error difference***

*** Means within the same row with the different superscripts are significantly (p<0.05) different***

ns : not significantly different (p>0.05)

Lin : Linear regression Qua: Quadratic regression and Cubic : Cubic regression

Table V Correlation Coefficient between Means of Blood Metabolite Concentration and Means of Urea-N, Allantoin and Creatinine in the Urine Based on Individual Animal (n=16)

	Plasma urea -N	Plasma insulin	Plasma glucose	Creatinine in plasma	Urea-N in urine	Allantoin in urine	Creatinine in urine
Plasma urea -N		0.0668	-0.0448	0.3546	0.0935	0.6119**	0.7297***
						(0.0118)	(0.0013)
Plasma insulin			0.3790	-0.2520	0.4688^{T}	0.3101	0.2978
			(0.1477)		(0.0670)		
Plasma glucose				-0.0846	-0.0720	0.1490	0.0078
Creatinine In plasma					-0.13882	-0.018	0.2418
Urea-N in urine						0.5422*	0.40747^{T}
						(0.0300)	(0.1172)
Allantoin in urine							0.8685***
							(0.0001)

( ) Number in blanket is value of probability * Significantly different at p<0.05 ** Significantly different at p<0.01 *** Significantly different at p<0.001

^{T} ***Tendency*** **(0.05<*p*<0.01)**