

KINDLUSTUSLISANDI JA KUIVAINE MÕJU SILO PROTEIINI LÕHUSTUVUSELE JA BIOGEENSETE AMIINIDE SISALDUSELE

A. Olt¹, O. Kärt¹, H. Kaldmäe¹, M. Ots¹, E. Songisepp², I. Smidt³

¹ Eesti Maaülikool, ² Tervisliku Piima Biotehnoloogiarenduskeskus, ³ Tartu Ülikool

Sissejuhatus

Liblikõielised heintaimed on olulised söödakultuurid lüpsilehmade söödaratsioonis ning pole kahtlust, et nende osatähtsus tõuseb lähiaastatel veelgi seoses vajadusega vähendada anorgaaniliste lämmastikväetiste kasutamist põllumajanduses. Liblikõielised heintaimed seovad tänu mügarbakteritele (elavad sümbioosis liblikõielistega) õhus olevat lämmastikku. Suur proteiinisaldus muudab nende kasutamise söödakultuurina eriti atraktiivseks.

Liblikõieliste heintaimede suur proteiinisaldus võib aga tekitada hulgaliselt probleeme nii söötmise kui lämmastiku emissiooni seisukohalt. Uurimistulemused näitavad, et liblikõielistes heintaimedes olev proteiin lõhustub intensiivselt nii heintaimede kuivatamise (Makoni jt, 1993; Givens ja Rulquin, 2002), sileerimise (Makoni jt, 1993; Kohn ja Allen, 1995, Jurgens, 1997) kui vatsafermentatsiooni (Dewhurst jt, 2003) käigus. Proteiini suur lõhustuvus liblikõielistes heintaimedes vähendab nende kasutamise efektiivsust proteiiniallikana, mille tulemusena võib küll suureneda lehmade piimatoodang, kuid väheneb piima valgusisaldus (Hojman, 2004). Suur lõhustuva proteiini hulk söödaratsioonis tekitab probleeme sigivusega (Butler, 1998; Rajala-Schultz jt, 2000), halvendab piima laapumist (Castillo, 1999), suurendab ainevahetushaiguste esinemise sagedust (Zhu jt, 2000) jne.

Vähe on tähelepanu pööranud erinevate proteiini laguproduktide sisaldusele silos ja nende toimele loomorganismis. Antud uurimistöös püüdsime selgitada muude silo kvaliteeti ja proteiini hüdrolyüsi iseloomustavate näitajate kõrval ka silo kindlustuslisandi mõju biogeensete amiinide sisaldusele.

Biogeensetest amiinidest on silos enam levinud putrestsiin, kadeveriin, histamiin ja türamiin. Kõige paremini on tõestatud biogeensete amiinide negatiivne mõju kuivaine söömusele (Harrison, 1994), sest nad pärsivad ka vatsakontraktsioone, vähendavad kuivaine seeduvust ja söödaosakeste liikumise kiirust seedekanalisis (Phuntsok jt, 1998).

Kui putrestsiin vähendab eelkõige piimatoodangut ja kuivaine söömust lehmadel ning on üks ketoosi põhjustavaid tegureid kas üksinda või koos teiste amiinidega (Lingaas, Tveit, 1992) siis histamiin soodustab laminiitide teket. Seda demonstreeris juba 1963. aastal Nilson, süstides lehmadele naha alla histamiini ja kutsudes sellega kunstlikult esile nimetatud haiguse lüpsilehmadel. Mõni aeg hiljem demonstreerisid sama Takahashi ja Young (1981), manustades suure tärglisesisaldusega ratsiooni korral lehmadele täiendavalt histamiini.

Seoses lehmade produktiivsuse tõusuga ja üha enam kontsentreeritud söödaratsioonide kasutamisega lüpsilehmade söötmisel on laminiitide esinemissagedus märgatavalt tõusnud (Stone, 2004). Kuigi biogeenseid amiine tekib keharakkude katabolismi käigus kõikjal organismis (Zilmer jt, 1999), tekib neid rohkem tärgliserikka ratsiooni söötmise korral vatsas söödaproteiini mikrobiaalse hüdrolyüsi käigus (Phuntsok jt, 1998). Kui ka silo sisaldab märkimisväärses koguses biogeenseid amiine, siis suureneb loomade haigestumise risk veelgi.

Võtmesõnad: punane ristik, silo, proteiin, lõhustuvus, amiinid.

Materjal ja meetodika

Uurimiseks kasutati punase ristiku (*Trifolium pratense* L., sort 'Jõgeva 433') ja timuti (*Phleum pratense* L., sort 'Tika') segu (50% punast ristikut ja 50% timutit). Uuritav materjal niideti 5 cm kõrguselt. Pool sellest sileeriti kohe, pool pärast 24-tunnist närvutamist. Sileerimiseks silomaterjal hekseldati 2 cm pikkusteks tükikesteks. Hoolikalt segades pihustati sileeritavale materjalile kindlustuslisand ning valmistati katsesilod, kasutades selleks kolmeliitrisid klaaspurke.

Kõik katsesilod, kaasa arvatud kontrollvariandid, valmistati kolmes korduses. Kindlustuslisanditena kasutati keemilist konservanti AIV 2000 ja bioloogilist inokulanti (*L. plantarum* + *L. fermentum*), mis oli valmistatud Tartu Ülikooli Mikrobioloogia Instituudis. Nii keemilist kui mikrobioloogilist kindlustuslisandit lisati arvestusega 5 liitrit tonni kohta. Piimhappebakterite kontsentratsioon bioloogilises kindlustuslisandis oli 8×10^9 cfu/g.

Katsesilode purgid avati 90 päeva möödudes. Kuivaine kadu määrati kuivaine kontsentratsiooni vahena enne ja pärast sileerimist. Lenduvate rasvhapete (LRH), etanooli, pH ja ammoniaaklämmastiku (NH₃-N) sisaldus

määrati vesilahusest. pH määrati pH-meetriga (MP 120 Mettler Toledo), NH₃-N-sisalduse määramiseks kasutati selleks kohandatud Kjeldec Auto 1030 (FOSS Tecator) analüsaatorit, etanooli piimhappe ja LRH-sisaldus määrati kromatograafiliselt (Perkin Elmer 900), kasutades kolonni täidisega 80/120 Carbowax B-DA/4% carbowax 20 M (Faithfull, 2002).

Kuivatatud (20 tundi 60 °C juures) ja kuni 1 mm jämeduseks jahvatatud proovidest määrati kuivaine-, toorproteiini-, toortuha- ja toorkiusisaldus (AOAC, 1990). Toortuha kontsentratsiooni määramiseks proov tuhastati muhvelahjus 550 °C juures 6 tunni jooksul. Toorproteiin määrati Kjeldahli meetodil, kasutades Kjeldec Auto 1030 analüsaatorit (FOSS Tecator). Toorkiusisaldus määrati Fibretec süsteemiga. Peale selle määrati proovidest orgaanilise aine seeduvus *in vitro* (IVOMD), samuti neutraalkiu (NDF) ja happeki (ADF) sisaldus, kasutades firma ANKOM tehnoloogiat (ANKOM Technology, Fairport, NY USA) ja seadmeid – inkubaatorit DAISY II ja kiuanalüsaatorit ANKOM 200 (Van Soest *et al.*, 1991).

Lõhustuvuse määramiseks jahvatati –20 °C külmetatud proovid ning kaaluti 4 g silo kuivainet polüesterkotikestesse (tihedusega 28 µm). Lahustuv fraktsioon määrati proovide külmpesemisel automaatpesumasinas. Kiiresti lahustuv fraktsioon saadi, kui proove inkubeeriti vatsas 8 tundi, ja potentsiaalselt lõhustuv fraktsioon, kui proove inkubeeriti 64 tundi. Selleks kasutati vatsafistuliga lehma. Silo proteiini lõhustuvus vatsas arvatati toitainete kao järgi kottidest inkubatsiooniperioodi jooksul (Varvikko, Vanhatalo, 1992).

Biogeensete amiinide määramiseks võeti –20 °C juures külmutatud ja jahvatatud siloproovist 10 g, millele lisati 20 ml metanooli vesilahust ja segati 2 minutit. Pärast seda proov inkubeeriti 45 °C juures 45 minutit ja jahutati 30 °C-ni. Tsentrifugimisega eraldati filtraat, mis derivatiseeriti, tsentrifugiti ja säilitati –20 °C juures gaaskromatograafi (GC) vialides (Yen, Hsieh, 1991). GC analüüs teostati gaaskromatograafiga HP 6890 Series GC System, kasutades kapillaarkolonni HP-5.

Fermentatsioonikoefitsient (FC) arvatati Pahlow ja Weissbachi (1999) valemi

$$FC = DM [\%] + 8 WSC/BC^{-1} \text{ järgi,}$$

kus DM on kuivainesisaldus %, WSC on suhkrusisaldus g/kg kuivaines ja BC on puhverduvõime.

Suhkrusisaldus määrati Bertrani meetodil (Thomas, 1977) ja puhverduvõime piimhappe tiitrimisel pH 4,0-ni (Pahlow, Weissbach, 1999).

Statistiline analüüs

Andmed analüüsiti, kasutades statistikatarkvara SAS protseduuri GLM. Töötlemisviisi ja kindlustuslisandi mõju väljaselgitamiseks kasutati ortogonaalseid kontraste. Nullilisi väärtusi sisaldavate tunnuste analüüsil kasutati väärtuste astakuid ning ülejäänud tunnused logaritmiti. Kontrastid leiti järgmisest mudelist:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + K_j + E_{ijk};$$

kus Y_{ijk} – uuritav tunnus, μ – keskmine; T_i – töötlemise viis, K_j – kindlustuslisandi mõju, ja E_{ijk} – juhuslik viga.

Tulemused ja arutelu

Silo keemiline koostis ja kuivaine kaod

Katses kasutatud materjal niideti loomise faasis. Haljasmassi kuivainesisaldus oli koristuse ajal 185 g/kg ja kuivaine sisaldas 147 g/kg toorproteiini, 201 g/kg toorkiudu ja 432 g/kg NDF (tabel 1). Sileeritava materjali kuivatamise käigus suurenes kuivaine- ja toorproteiinisaldus, kuid rakusisese hingamise tõttu vähenes suhkrute sisaldus 7,9%. Heintaimede sileeruvust saab hinnata nn fermentatsioonikoefitsiendi abil. See võtab arvesse sileeritava materjali kuivaine- ja kergesti seeduvate süsivesikute sisalduse ning puhverduvõime. Et liblikõielistes heintaimedes on suhteliselt vähe kergesti seeduvaid süsivesikuid ning tänu suurele proteiinisaldusele on neil ka suur puhverduvõime, sileeruvad liblikõielised heintaimed suhteliselt halvasti (McDonald *et al.*, 1991; Wilkinson, 2005). Hästi sileerub selline materjal, millel on fermentatsioonikoefitsient üle 45 (Pahlow *et al.*, 2002). Antud uurimuses jäi vastav näitja ka heintaimede närvutamise järel sellest oluliselt madalamaks.

Silo fermentatsiooni käigus kasutavad mikroorganismid osa orgaanilisest ainest (põhiliselt kergesti fermenteeruvaid süsivesikuid) ära enda elutegevuseks (McDonald *et al.*, 1991). See oli ka põhjuseks, miks vähenes fermentatsiooni käigus, võrreldes algmaterjaliga, nii lämmastikuta ekstraktiivainete kui kuivainesisaldus silos (tabel 2). Kuivainekaod olid suhteliselt suured, ulatudes närvutamata, suure niiskusesisaldusega materjalist valmistatud kontrollsilol puhul isegi 24,1%-ni. Närvutatud materjali kuivainekaod olid väiksemad, kontrollsilol vastavalt 17,4%. Ka Petterssoni (1988) andmetel on närvutamata silo kuivainekaod suuremad, keskmiselt 19,4% (kõikudes 0,8–71,1%) kui närvutatud silos (13,1–13,4%). Kuivainekaod vähenevad materjali närvutamise ja kindlustuslisandite kasutamisel (Wilkinson, 2005), mida näitasid ka antud uuringud. Kõnealusel katses olid toitainete kaod närvutamata materjali puhul konservanti kasutades väiksemad ($P < 0,0001$) (tabel 2).

Tabel 1. Punase ristiku – timuti segu keemiline koostis, puhverdusvõime ja fermentatsioonikoefitsient enne sileerimist

Näitaja	Värske materjal	Närvutatud materjal
Kuivaine, g/kg	185	310
Kuivaines, g/kg		
toorproteiin	147	161
toortuhk	82	89
toorkiud	201	203
NDF	432	440
ADF	245	245
N-ta ekstraktiivained	537	515
suhkrud	101	93
puhverdusvõime*	90	86
Fermentatsioonikoefitsient	27,5	39,6

* piimhappe hulk grammides, mis kulub 100 g kuivaine tiitrimiseks

Tabel 2. Kindlustuslisandi mõju silo keemilisele koostisele ja kuivainekadudele sileerimisel (g/kg KA-s)

Silomaterjali töötlemise viis / kindlustuslisand	Kuiv- aine	Toor- proteiin	Toor- kiud	N-ta ekstraktiiv- ained	Kuivaine kaod, %
Närvutamata					
kontroll	140	153	274	421	24,1
bioloogiline	171	161	220	481	7,7
keemiline	162	172	222	471	12,4
Närvutatud 24 tundi					
kontroll	256	178	209	468	17,4
bioloogiline	274	172	192	498	11,6
keemiline	295	172	185	506	4,7
Erinevuse olulisus, P					
Närvutamata					
kontroll vs. bioloogiline	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
kontroll vs. keemiline	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
bioloogiline vs. keemiline	0,0005	<0,0001	0,5771	0,0056	0,0005
Närvutatud 24 tundi					
kontroll vs. bioloogiline	<0,0001	0,0062	<0,0001	<0,0001	0,0014
kontroll vs. keemiline	<0,0001	0,0027	<0,0001	<0,0001	<0,0001
bioloogiline vs. keemiline	<0,0001	0,8847	0,0196	0,0194	0,0417

Kindlustuslisandi ja närvutamise mõju silo kvaliteedile

Analüüsidest fermentatsiooni kvaliteeti iseloomustavaid näitajaid (tabel 3), näeme, et nii närvutatud kui närvutamata silomaterjal sileerus ilma silo kindlustuslisanditeta halvasti. Kõrge pH, suur võihappe- ja väike piimhappesisaldus kontrollsilodes on selle indikaatoriteks. Hästi fermenteerunud ja stabiilse silo pH peaks olema 200 g KA/kg juures 4,2 või madalam ja 400 g KA/kg puhul alla 4,75 (Weissbach, 2003). Sellise silo kuivaine sisaldab üle 35 g/kg piimhapet, alla 20 g/kg äädikhapet ning ei sisalda võihapet (Moisio, Heikonen, 1992; Wilkinson, 2005). Nii bioloogiline kui keemiline lisand parandasid tunduvalt punase ristiku – timuti segu sileeruvust.

Keemiline lisand parandas närvutamata silol 7% ja närvutatul 4% võrra orgaanilise aine seeduvust ($P < 0,0001$). Kuid närvutamata, lisandita silol olid riknemise tunnused (pH 5,9 jt), mis võis vähendada seeduvust (Muck, Pitt, 1993). Keemilise konservandiga (AIV) valmistatud silo 3,8% võrra parema seeduvuse on saanud Jatkauskas ja Vrotniakiene (1999) ning 3,1% võrra Kaldmäe jt (2001) oma uurimistulemustes.

Keskmiselt lõhustub söödaproteiin vatsas 60–80%, seejuures mittevalgulised lämmastikühendid peaaegu täielikult (Kaufmann, 1979). Uuritud silode lämmastikust lõhustus vatsas ligikaudu 90%, mida näitas fraktsioon B3 (tabel 4). Silomaterjali närvutamine proteiini lõhustuvusele ega selle kiirusele mõju ei avaldanud, fraktsioon B2 oli sama (77%, tabel 4).

Tabel 3. Kindlustuslisandi mõju silo fermentatsiooni kvaliteedile ja orgaanilise aine seeduvusele

Silomaterjali töötlemise viis / kindlustuslisand	pH	Piimhape, g/kg KA-s	Võihape, g/kg KA-s	Äädikhape, g/kg KA-s	OAS, %
Närvutamata					
kontroll	5,9	14	47	8	66
bioloogiline	4,0	43	1	7	76
keemiline	4,5	39	2	9	73
Närvutatud 24 tundi					
kontroll	5,0	74	24	8	74
bioloogiline	4,2	110	0	9	77
keemiline	4,8	44	0	10	78
Erinevuse olulisus, P					
Närvutamata					
kontroll vs. bioloogiline	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,1798	<0,0001
kontroll vs. keemiline	<0,0001	0,0003	<0,0001	0,5620	<0,0001
bioloogiline vs. keemiline	<0,0001	0,7616	<0,0001	0,0605	0,0010
Närvutatud 24 tundi					
kontroll vs. bioloogiline	<0,0001	0,1002	<0,0001	0,6379	0,0014
kontroll vs. keemiline	0,0015	0,0729	<0,0001	0,1229	<0,0001
bioloogiline vs. keemiline	<0,0001	0,0015		0,2727	0,0417

Tabel 4. Kindlustuslisandi mõju proteiini hüdroolüüsile

Silomaterjali töötlemise viis / kindlustuslisand	Üld-N sisaldus, g/kg	NH ₃ -N üld-N, %	Lahustuv fraktsioon, % üld-N B1	Kiiresti lõhustuv fraktsioon, % üld-N B2	Potentsiaalselt lõhustuv fraktsioon, % üld-N B3
Närvutamata					
kontroll	24,5	18,7	67,2	77,1	89,6
bioloogiline	25,8	1,1	65,5	79,8	91,1
keemiline	27,5	5,8	64,2	76,1	94,3
Närvutatud 24 tundi					
kontroll	28,5	6,3	74,7	77,2	92,6
bioloogiline	27,5	1,6	65,2	76,0	92,6
keemiline	27,5	3,9	60,0	68,0	91,8
Erinevuse olulisus, P					
Närvutamata					
kontroll vs. bioloogiline	<0,0001	<0,0001	0,3150	0,0210	0,0025
kontroll vs. keemiline	<0,0001	<0,0001	0,0003	0,3677	<0,0001
bioloogiline vs. keemiline	<0,0001	<0,0001	0,0928	0,0018	<0,0001
Närvutatud 24 tundi					
kontroll vs. bioloogiline	0,0062	<0,0001	<0,0001	0,2852	0,9491
kontroll vs. keemiline	0,0027	0,0034	<0,0001	<0,0001	0,1146
bioloogiline vs. keemiline	0,8847	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1011

Kõige vähem lahustus keemilise kindlustuslisandiga valmistatud silo proteiin, vastavalt närvutamata materjalist 64,2% (P<0,001) ja närvutatust 60,0% (P<0,0001). Ka proteiini lõhustuvuse intensiivsust vähendas keemiline konservant, mida näitab B2-fraktsiooni lõhustuvus, mis oli isegi 9,2% võrra väiksem. Konservandi mõju silo lämmastiku lõhustuvuse vähenemisele ja kineetikale on täheldanud oma uuringutes Flores jt (1999), kus raiheinast silo lämmastiku lõhustuvus vähenes 81,22%-lt 79,31%-le ja Kaldmäe jt (2004). Hristovi ja Sandevi (1998) andmetel vähenes keemilise lisandiga valmistatud lutsernisilo proteiini lahustuvus 9,5% võrra (656 g/kg kontroll ja 561 g/kg KK).

Ammoniaaklämmastiku osa üldlämmastikust iseloomustab valkude lagunemise intensiivsust. Mida rohkem on silos ammoniaaklämmastikku, seda suurem on ka mittevulguliste lämmastikuühendite osa kogulämmastikus ning seda rohkem peaks lämmastikust lahustuma. Meie andmetel oli kontrollsilodel NH₃-N-sisaldus 18,7% ja 6,3%, mis oli tunduvalt suurem kui lisanditega silodes. Nende proovide proteiini lahustuvus oli samuti kõrgem (tabel 4).

Kindlustuslisandi mõju silo biogeensete amiinide sisaldusele

Antud katses esines biogeenseid amiine arvestatavas koguses vaid vähese kuivainesisaldusega silodes, mille valmistamisel ei kasutatud kindlustuslisandeid (tabel 5). Närvutatud silodes, kus sileeritava materjali kuivainesisaldus oli 310 g/kg, esines biogeenseid amiine väga vähe või ei esinenud neid üldse. Vähesel kuivainesisaldusega, ilma kindlustuslisanditeta sileeritud silodes esines kõiki uuritud biogeenseid amiine. Enam esines histamiini (5,24 g/kg) ja mõnevõrra vähem putrestsiini (0,86 g/kg). Kindlustuslisandi kasutamine pärssis täielikult putrestsiini, histamiini ja türamiini tekke ning vähendas ligi 100 korda kadaveriini teket.

Kirjandusallikates leidub andmeid biogeensete amiinide esinemise kohta silos suhteliselt vähe. Ühe hilisema, märkimisväärse uurimuse korraldasid Norra teadlased Krizsan ja Randby (2005), kes selgitasid fermentatsiooni kvaliteedi mõju silo söömusele. Teadlased sileerisid, kasutades erinevat tehnoloogiat ja kindlustuslisandeid, väikese kuivainesisaldusega (166–237 g/kg) silomaterjali ja määrasid teiste fermentatsiooni-näitajate kõrval ka biogeensete amiinide sisaldused. Putrestsiinisaldus kõikus piirides 0,17–3,73, kadaveriinisaldus 1,22–5,41, histamiinisaldus 0–1,43 ja türamiinisaldus 0,29–2,68 g/kg. Toodud andmeid meie uurimistulemustega võrreldes näeme, et histamiini esines meie katses närvutamata kontrollvariandi puhul mõnevõrra enam kui kirjeldatud Norra teadlaste katses. Kahjuks ei selgu aga esitatud andmetest sileeritud heintaimede liigiline koosseis, kasutatud tehnoloogia ja kindlustuslisandi mõju biogeensete amiinide sisaldusele. Küll osutasid aga kõik uuritud biogeensed amiinid usutavateks söömuse vähendavateks mõjufaktoriteks.

Tabel 5. Kindlustuslisandi mõju silo biogeensete amiinide sisaldusele (g/kg KA-s)

Silomaterjali töötlemise viis / kindlustuslisand	Putrestsiin	Kadaveriin	Histamiin	Türamiin
Närvutamata				
kontroll	0,86	2,32	5,24	2,00
bioloogiline	0	0,03	0	0
keemiline	0	0,03	0	0
Närvutatud 24 tundi				
kontroll	jäljed	0,05	0	0,08
bioloogiline	0	0	0	0,01
keemiline	0	0,03	0	0

Tagasihoidlikult on seni uuritud biogeensete amiinide mõju mäletsejaliste ainevahetusele. Et halvasti fermenteerunud silo söötmine lüpsilehmadele suurendab ainevahetushaiguste esinemise sagedust ja alandab piima kvaliteeti, väärib senisest enam tähelepanu kindlasti ka probleemistik, mis on seotud biogeensete amiinide sisaldusega silos.

Kokkuvõte

Kuna punase ristiku – timuti segu (50+50%) puhverdusvõime on madal (27,5) ja närvutamisel paraneb vaid 39,6-ni, siis on vaja fermentatsiooni parandamiseks lisada konservanti. Nii bioloogilise kui keemilise lisandi kasutamine vähendas silo kuivainekadusid 1,9 kuni 3,7 korda ning parandas tunduvalt fermentatsiooni kvaliteeti (võihappesisaldus (VH) kontrollis 47 g/KA kg ja lisanditega silos 1–2 g/KA kg või 0).

In vitro määratud orgaanilise aine seeduvus paranes keemilise konservandiga silos 4% võrreldes kontrolliga ($P < 0,0001$).

Uuritud silode lämmastikust lõhustus vatsas umbes 90%.

KK silo proteiini lahustuvus oli väiksem ning tema lõhustuvus vatsas aeglasem. Kaheksa tunniga oli lõhustunud vatsas silo proteiinist kontrollil 77,2%, BK-l 76% ja KK-l 68%.

Vähesel kuivainesisaldusega (140 g/kg) ilma lisandita sileeritud silodes esines kõiki uuritud biogeenseid amiine. Enam esines histamiini – 5,24 g/kg, vähem putrestsiini – 0,86 g/kg kuivaines. Silo materjali närvutamine ja lisandi kasutamine vähendas tunduvalt või takistas biogeensete amiinide tekkimist.

Kasutatud kirjandus

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. – 15th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, VA.
- Butler, W. R. 1998. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle: A review. – J. Dairy Sci, vol. 83, p. 2533–2539.
- Castillo, A. R. 1999. Improving nitrogen utilization in dairy cows. Academic dissertation. The University of Reading, 180 pp.

- Dewhurst, R. J., Scollan, N. D., Moorby, J. M., Evans, R. T., Merry, R. J., Wilkins, R. J. 2003. Comparison of grass and legume silages for milk production. 2. *In vivo* and *in sacco* evaluations of rumen function. – *J. Dairy Sci.*, vol. 86, p. 2612–2621.
- Faithfull, N. T. 2002. *Methods in Agricultural Chemical Analysis: a practical handbook*, CABI Publishing, UK, 266 pp.
- Flores, G., Castro, J., Arraez, A. G., Amil, A., Brea, T., Warleta, M. G. 1999. Effect of a biological additive on silage fermentation, digestibility, ruminal degradability, intake and performance of lactating dairy cattle in Galicia. – *Proceedings of the XIIth International Silage Conference*, Uppsala, Sweden, p. 181–182.
- Givens, D. I., Rulquin, H. 2002. Utilisation of protein from silage-based diets. – *Proceedings of the XIIIth International Silage Conference*, Auchincruive, Scotland, p. 268–282.
- Harrison, J. H., Blauwiel, R., Stokes, M. R. 1994. Symposium: Utilization of grass silage. Fermentation and utilization of grass silage. – *J. Animal Sci.*, vol. 77, p. 3209–3235.
- Hojman, D., Kroll, O., Adin, G., Gips, M., Hanochi, B., Ezra, E. 2004. Relationships between milk urea and production, nutrition, and fertility traits in Israeli dairy herds. – *J. Dairy Sci.*, vol. 87, p. 1001–1011.
- Hristov, A. N., Sandev, S. G. 1998. Proteolysis and rumen degradability of protein in alfalfa preserved as silage, wilted silage or hay. – *Animal Feed Science Technology*, vol. 72, p. 175–181.
- Jatkauskas, J., Vrotniakiene, V. 1999. The effects of feeding AIV-2 and AIV-3 treated silages on the growth and efficiency of nutrient utilization of fattening bulls. – *Proceedings of the XIIth International Silage Conference*, Uppsala, Sweden, p. 185–186.
- Jurgens, M. H. 1997. *Animal feeding and nutrition*. 8th ed. – Kendall/Hunt Publishing Company, 577 pp.
- Kaldmäe, H., Kirsell, R., Kärt, O., Vadi, M. 2001. Silo orgaanilise aine seeduvuse määramine erinevate meetoditega. – *APSi toimetised*, nr 14, lk 85–88.
- Kaldmäe, H., Olt, A., Vadi, M. 2004. Liblikõieliste heintaimede proteiini lõhustuvusest. – *Agraarteadus*, XV, nr 2, lk 90–95.
- Kaufmann, W. 1979. Protein utilization. – *Feeding strategy for the high yielding dairy cow*. Eds. W. H. Broster, H. Swan. EAAP publication, No. 25, p. 90–113.
- Kohn, R. A., Allen, M. S. 1995. Effect of plant maturity and preservation method on *in vitro* protein degradation of forage. – *J. Dairy Sci.*, vol. 78, p. 1544–1551.
- Krizsan, S. J., Randby, Å. T. 2005. The effect of fermentation quality on voluntary intake of grass silage by growing steers. Silage production and utilization. – *Proc. of the XIVth International Silage Conference*, July 2005, Belfast, Wageningen Academic Publishers, p. 269.
- Lingaas, F., Tveit, B. 1992. Etiology of acetonemia in Norwegian cattle. 2. Effect of butyric acid, valeric acid, and putrescine. – *J. Dairy Sci.*, vol. 75, p. 2433–2439.
- Makoni, N. F., Shelford, J. A., Nakai, S., Fisher, L. J. 1993. Characterization of protein fractions in fresh, wilted, and ensiled alfalfa. – *J. Dairy Sci.* vol. 76, p. 1934–1943.
- McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S. J. E. 1991. *The biochemistry of silage*. – Chalcombe Publications. 340 pp.
- Moisio, T., Heikonen, M. 1992. AIV-rehun Perusteet. Kirjayhtymä Oy, Helsinki, 170 L.
- Muck, R. E., Pitt, R. E. 1993. Ensiling and its effect on crop quality. – *Proceedings of National Silage Production Conference*, Syracuse, New York, p. 55–66.
- Nilson, S. 1963. Clinical, morphological and experimental studies of laminitis in cattle. – *Acta Vet. Scand.* 4(Suppl. 1), p. 188–222.
- Pahlow, G., Rammer, C., Slottnier, D., Touri, M., 2002. Ensiling of legumes. – *Landbauforschung Voelkenrode*, Sonderheft 234, p. 27–30.
- Pahlow, G., Weissbach, F. 1999. New aspects of evaluation and application of silage additives. – *Landbauforschung Voelkenrode SH 206*, p. 141–158.
- Phuntsok, T., Froetschel, M. A., Amos, H. E., Zeng, M., Huang, Y. W. 1998. Biogenic amines in silage, apparent post-ruminal passage, and the relationship between biogenic amines and digestive function and intake by steers. – *J. Dairy Sci.* 81, p. 2193–2203.
- Pettersson, K. 1988. *Ensiling of forages. Factors affecting silage fermentation and quality*. – Dissertation, Uppsala, 75 pp.
- Rajala-Schultz, P. J., Saville, W. J. A., Frazer, G. S., Wittum, T. E. 2000. Association between milk urea nitrogen and fertility in Ohio dairy cows. – *J. Dairy Sci.*, vol. 84, p. 482–489.
- Stone, W. C. 2004. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. – *J. Dairy Sci.*, vol. 87 (E. Suppl.): E13–E26.
- Zhu, L. H., Armentano, L. E., Bremmer, D. R., Grummer, R. R., Bertics, S. J. 2000. Plasma concentration of urea, ammonia, glutamine around calving, and the relation of hepatic triglyceride, to plasma ammonia removal and blood acid-base balance. – *J. Dairy Sci.*, vol. 83, p. 734–740.
- Zilmer, M., Karelson, E., Vihalemm, T. 1999. *Meditsiiniline biokeemia II*. Tartu, 337 lk.

- Thomas, T. A. 1977. An automated procedure for the determination of soluble carbohydrates in herbage – *J. Sci. Food Agric.* 28, p. 639–642.
- Takahashi, K., Young, B. A. 1981. Effects of grain overfeeding and histamine injection on physiological responses related to acute bovine laminitis. – *Jpn. J. Vet. Sci.*, vol. 43, p. 375–385.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. – *J. Dairy Sci.*, vol. 74, p. 3583–3597.
- Varvikko, T., Vanhatalo, A. 1992. Effect of supplementary energy and protein feeding on the true digestion of grass-silage organic matter, cell wall and nitrogen estimated by the combined synthetic-fibrebag method in cows. – *Can. J. Sci.*, vol.72, p. 671–678.
- Weissbach, F. 2003. Theory and practice of ensuring good quality of silages from grass and legumes. – *Proceedings of 11th International Scientific Symposium "Forage Conservation" Nitra*, p. 31–36.
- Wilkinson, J. M. 2005. *Silage*. Chalcombe Publications, UK, 254 pp.
- Yen, G., Hsieh, L. C. 1991. Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. – *J. Food Sci.*, vol. 56, p. 158–161.