

تصحیح ضرایب قابلیت هضم پروتئین در جوجه‌های گوشتی با اندازه‌گیری میزان اسید اوریک کود، با روش‌های اسپکتروفتوتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد

فریبرز خواجه‌علی^۱، حسن نصیری مقدم^۱، رونالد مارکوارت^۲ و محسن دانش مسگران^۱

چکیده

میزان اسید اوریک موجود در کود جوجه‌های گوشتی نر آرین تعییده شده با خوراک‌های آزمایشی حاوی مقادیر مختلف متیونین، با دو روش اسپکتروفتوتری فرابنفش و کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد (HPLC) اندازه‌گیری، و سپس داده‌های حاصل از دو روش مقایسه گردید. در روش HPLC از یک ستون فاز معکوس C-18 استفاده شد (250*4.6 mm. i.d.)، و سرعت جريان فاز متحرک یک میلی‌متر در دقیقه تنظیم گردید. در روش اسپکتروفتوتری فرابنفش، جذب نوری در ۲۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از داده‌های حاصل از روش اسپکتروفتوتری برای تصحیح ضرایب قابلیت هضم پروتئین در جوجه‌های گوشتی استفاده گردید.

ضریب همبستگی (r) بین دو روش برای اندازه‌گیری میزان اسید اوریک در کود جوجه‌های گوشتی، ۰/۹۷۶ بود. مقادیر قابلیت هضم پروتئین پس از تصحیح بر اساس میزان نیتروژن اسید اوریک، به طور معنی‌داری ($P<0.01$) بیشتر از مقادیر تصحیح نشده بود. ضرایب قابلیت هضم پروتئین پس از تصحیح بر اساس میزان نیتروژن اسید اوریک، قابل مقایسه با ضرایب به دست آمده از روش اندازه‌گیری اسید‌های آمینه بود.

واژه‌های کلیدی: اسید اوریک، کود مرغی، اسپکتروفتوتری، HPLC

۱. به ترتیب دانشجوی سابق دکتری، استاد و استادیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲. استاد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مانیتوبا، کانادا

مقدمه

این آزمایش با استفاده از ۳۲ قطعه جوجه نر یک روزه آرین انجام گرفت. جوجه‌ها تا هفت روزگی با یک جیره آغازین معمولی تغذیه شده، در روز هشتم پس از یک شب گرسنگی به صورت انفرادی وزن‌کشی شدند. دو قطعه جوجه به هر واحد قفس متنقل شد، به گونه‌ای که میانگین وزن هر جوجه در تمامی قفس‌ها تقریباً مشابه بود.

تعداد چهار خوارک آزمایشی (تیمار) بررسی گردید. تیمار اول، جیره پایه بدون مکمل متیونین بود. این جیره از نظر متیونین کمبود داشت، ولی نیاز سیستین را تأمین می‌نمود (کمبود اسیدهای آمینه گوگردار در جیره پایه ۰/۲۷ درصد بود). ترکیب جیره پایه در جدول ۱ نشان داده شده است. با افزودن مکمل مصنوعی متیونین به جیره پایه، تیمارهای دوم، سوم و چهارم تهیه شد، به طوری که به ترتیب ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد از مقدار کمبود اسیدهای آمینه گوگردار جیره پایه تأمین گردید. جیره آخر نیاز اسیدهای آمینه گوگردار توصیه شده توسط انجمن ملی تحقیقات (۱۴) را تأمین نمود.

به هر یک از چهار تیمار چهار تکرار (جایگاه قفس) اختصاص یافت. جوجه‌ها به مدت دو هفته (۸ تا ۲۱ روزگی) خوارک‌های آزمایشی را دریافت نمودند. در سه روز آخر دوره آزمایش، کل خوارک مصرفی و کل کود حاصل مربوط به هر قفس اندازه‌گیری شد. نمونه‌های کود پس از خشک شدن در آون (۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت)، برای تجزیه نیتروژن، اسید اوریک و اسیدهای آمینه در یخچال با دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

برای اندازه‌گیری غلظت اسید اوریک در کود جوجه‌های گوشتشی، روش‌های پیشنهادی توسط مارکوارت (۹) و مارکوارت و همکاران (۱۰) با اندکی تغییر جزئی به کار گرفته شد. تغییرات مذکور در روش اسپکتروفوتومتری، استفاده از اسید پرکلریک ۶/۲۵ درصد به جای ۵ درصد و سانتریفوژ نمودن نمونه‌ها در ۱۳۵۰۰×g به جای ۲۰۰۰۰×g بود. در روش HPLC نیز، رقیقسازی استاندارد با اسید پرکلریک ۱۰ درصد پیش از

اسید اوریک مهم‌ترین فراورده نهایی سوخت و ساز پروتئین در بدن پرندگان است (۲۱). این ترکیب ۶۰ تا ۸۲ درصد از کل نیتروژن ادرار پرندگان را شامل می‌شود (۱۱). گزارش دیگر نشان می‌دهد که نیتروژن اسید اوریک ۸۸ درصد از کل نیتروژن ادرار جوجه‌های گوشتی را تشکیل می‌دهد (۷). بخش اعظم این پراکنده‌گی در پژوهش‌های گوناگون ناشی از بی‌دقیقی در روش‌های اندازه‌گیری است (۱۵).

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری اسید اوریک در کود پرندگان پیشنهاد شده است. از آن جمله می‌توان به روش‌های ثقل‌سنگی (۵)، رنگ‌سنگی (۱)، و اسپکتروفوتومتری (۹) اشاره کرد. روش‌های آنزیمی (۱۷ و ۱۸)، گرچه تاکنون برای اندازه‌گیری اسید اوریک در کود پرندگان به کار نرفته، ولی بی‌توجهی به این روش‌ها به علت تأثیر احتمالی ترکیبات ناشناخته موجود در نمونه بر فعالیت آنزیم‌ها است.

اندازه‌گیری میزان اسید اوریک دفعی به عنوان روشی برای تعیین کیفیت منابع پروتئینی در جوجه‌ها استفاده شده است (۴، ۶ و ۲۰). در پرندگان، اندازه‌گیری قابلیت هضم پروتئین و تعیین ارزش بیولوژیک منابع پروتئینی به دلیل مخلوط بودن ادرار و مدفع پیچیده است. عموماً فرض می‌شود که تمامی اسید اوریک موجود در کود از ادرار منشأ می‌گیرد. از این رو، نیازی به جداسازی ادرار از مدفع نیست (۱۲).

روتر و همکاران (۱۵) ضرایب قابلیت هضم پروتئین را پس از تصحیح بر اساس نیتروژن اسید اوریک، با ضرایب حاصل از اندازه‌گیری اسیدهای آمینه مقایسه نمودند. نتایج آنها سازگاری خوبی را بین دو روش نشان داد.

این پژوهش بهمنظور اندازه‌گیری غلظت اسید اوریک در کود جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با مقادیر مختلف متیونین، توسط دو روش اسپکتروفوتومتری فرابینش و کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد، و کاربرد مقادیر حاصل برای تصحیح ضرایب قابلیت هضم پروتئین انجام گرفت.

جدول ۱. ترکیب خوارک آزمایشی پایه و مواد مغذی محاسبه شده و تجزیه شده آن

مواد غذایی	٪
درت (۷/۷٪ پروتئین) ^۱	۵۷/۱۰
کنجاله سویا (۴۴/۵٪ پروتئین) ^۱	۳۷
روغن سویا	۲
دی کلسیم فسفات	۰/۶۸
سنگ آهک	۱/۷
نمک	۰/۴۲
مکمل ویتامینی ^۲	۰/۲۵
مکمل مواد معدنی ^۳	۰/۲۵
مواد مغذی محاسبه شده (درصد هوا خشک)	
پروتئین خام (٪)	۲۰/۸۵
متیونین	۰/۴
متیونین + سیستئین (٪)	۰/۶۸
لیزین (٪)	۱/۱۴
تریونین (٪)	۰/۸
آرژنین (٪)	۱/۳۸
مواد مغذی تجزیه شده (درصد هوا خشک)	
انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری در کیلوگرم)	۲۹۱۱
پروتئین خام (٪)	۱۹/۸۵
متیونین (٪)	۰/۳۵
متیونین + سیستئین (٪)	۰/۵۸
لیزین (٪)	۰/۹۲
تریونین (٪)	۰/۸
آرژنین (٪)	۱/۱۲

۱. تعیین شده در آزمایشگاه

۲. هر کیلوگرم مکمل حاوی: ویتامین A ۴۰۰۰۰، ویتامین D ۷۲۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین E ۱۴۴۰۰ میلی‌گرم، ویتامین K ۲۰۰۰ میلی‌گرم، پیروفلاوین ۳۰۰۰ میلی‌گرم، اسید پانتوتئیک ۴۸۹۶ میلی‌گرم، نیاسین ۱۲۱۶۰ میلی‌گرم، پیریدوکسین ۶۱۲ میلی‌گرم، کوپالامین ۶۴۰ میلی‌گرم، بیوتین ۲۰۰۰ میلی‌گرم و کولین کلراید ۴۴۰ گرم می‌باشد.

۳. هر کیلوگرم مکمل حاوی: منگنز ۶۴/۵ گرم، روی ۳۳/۸ گرم، آهن ۱۰۰ میلی‌گرم، کربات ۱۹۰ میلی‌گرم و سلنیم ۸ گرم است.

برای تهیه استاندارد به روش اسپکتروفوتومتری، با حل نمودن اورات سدیم در آب مقطر غیر یونیزه، یک محلول استاندارد پایه با غلظت یک میلی‌مول تهیه شد. سپس با رقیق نمودن این محلول، محلول‌هایی با غلظت ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومول در میلی‌لیتر تهیه گردید. پیش از اندازه‌گیری میزان جذب، این محلول‌ها با چهار حجم اسید پرکلریک ۶/۲۵٪ رقیق شد. جذب محلول‌ها در ۲۸۵ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد به

تزریق به ستون انجام نگرفت. اسید اوریک (MW=۱۶۸/۱) و سدیم اورات (MW=۱۹۰/۱) از شرکت Sigma، و گلاسین و اسید پرکلریک از شرکت Fisher Scientific تهیه گردید. در روش HPLC، از یک سیستم فاز معکوس با ستون Nova Pack ۲۵۰×۴ mm استفاده شد. این سیستم مجهز به یک ستون محافظ بود و سرعت جریان متحرک (آب مقطر غیر یونیزه) یک میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید.

اندازه‌گیری شد، در یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار توسط نرم افزار SAS (۱۶) تجزیه گردید، و میانگین‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شد (جدول ۲). از آن جا که مقدار اسید اوریک نمونه‌های کود با روش HPLC نیز اندازه‌گیری شد، در مرحله دوم، داده‌های مربوط به مقدار اسید اوریک نمونه‌های کود جوچه‌های تغذیه شده با مقادیر مختلف متیونین حاصل از دو روش مذکور، با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در چارچوب فاکتوریل 4×2 تجزیه گردید. در مرحله سوم، از داده‌های مربوط به مقدار اسید اوریک کود، اندازه‌گیری شده به روش اسپکتروفوتومتری، به عنوان روشی برای تصحیح قابلیت هضم پروتئین خوارک‌های آزمایشی استفاده شد. این روش با روش معمولی (بدون تصحیح برای نیتروژن اسید اوریک) و روش حاصل از اندازه‌گیری اسیدهای آمینه مقایسه گردید. داده‌های مربوط به قابلیت هضم پروتئین به دست آمده در سه روش مذکور، در یک طرح کاملاً تصادفی در چارچوب فاکتوریل 3×4 ، با استفاده از روش GLM نرم افزار SAS (۱۶) تجزیه آماری شد.

نتایج و بحث

در روش اسپکتروفوتومتری حداقل جذب اسید اوریک در ۲۸۵ نانومتر به دست آمد. منحنی استاندارد اسید اوریک در شکل ۱ نشان داده شده است. همان طور که دیده می‌شود، یک رابطه خطی بین غلظت اسید اوریک و جذب آن در ۲۸۵ نانومتر وجود دارد.

کروماتوگرام استاندارد اسید اوریک در شکل ۲ نشان داده است. چنان که در شکل دیده می‌شود، اسید اوریک دارای تنها یک نقطه فراز در ۲۸۵ نانومتر است، و زمان خروج آن $3/45$ دقیقه می‌باشد.

غلظت اسید اوریک نمونه‌های کود جوچه‌های گوشتی تغذیه شده با مقادیر مختلف متیونین توسط روش اسپکتروفوتومتری در جدول ۲ نشان داده شده است. بیان نتایج اسید اوریک به صورت غلظت این ماده در کود (میلی‌گرم در

دست آمد (شکل ۱).

برای تهیه استاندارد به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد، با حل نمودن اسید اوریک در آب مقطر غیر یونیزه یک محلول استاندارد پایه به غلظت 500 میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. با رقیق نمودن این محلول، محلولی با غلظت 20 میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه، و میزان 20 میکرولیتر از این محلول به ستون تزریق گردید. جذب نوری در 285 نانومتر اندازه‌گیری و سطح زیر منحنی تعیین شد (شکل ۲).

برای آماده‌سازی نمونه‌ها مقدار 50 میلی‌گرم از نمونه کود کاملاً آسیاب شده وزن گردید، و به یک فلاسک 125 میلی‌لیتری منتقل شد. سپس 50 میلی‌لیتر بافر گلایسین $0/1$ مولار با $pH=9/3$ به آن افزوده شد. محلول حاصل به مدت یک ساعت در دمای 40 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عصاره به دست آمده در $13500 \times g$ به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ، و سپس بخش محلول فوقانی جدا، و تا هنگام تجزیه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

میزان نیتروژن نمونه‌های غذا و کود به روش کلدار اندازه‌گیری شد (۳). ترکیب اسیدهای آمینه نمونه‌ها به کمک کروماتوگرافی تعویض یونی تعیین گردید (۲). روش اکسیداسیون با اسید پرفرمیک، برای تعیین میزان متیونین و سیستئین جیره‌ها به کار رفت (۱۳). قابلیت هضم ظاهري پروتئین به سه روش زیر محاسبه گردید:

روش اول:

$$\frac{\text{میزان پروتئین دفعی} - \text{میزان پروتئین مصرفی}}{\text{میزان پروتئین مصرفی}} = \text{قابلیت هضم پروتئین}$$

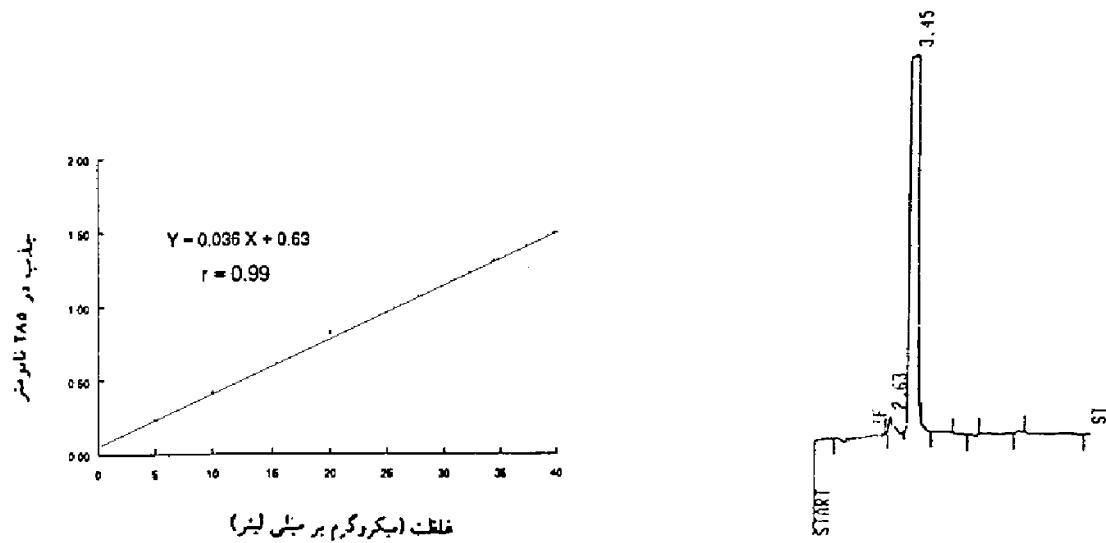
روش دوم:

$$=\text{قابلیت هضم پروتئین}$$

$$\frac{\text{میزان پروتئین اسید اوریک} - \text{میزان پروتئین دفعی} - \text{میزان پروتئین مصرفی}}{\text{میزان پروتئین مصرفی}}$$

روش سوم:

میانگین قابلیت هضم مجموع اسیدهای آمینه = قابلیت هضم پروتئین تجزیه آماری داده‌ها در سه مرحله انجام گرفت. در مرحله اول مقدار اسید اوریک نمونه‌های کود جوچه‌های تغذیه شده با مقادیر مختلف متیونین، که به روش اسپکتروفوتومتری



شکل ۱. کروماتوگرام استاندارد اسید اوریک

جدول ۲. مقدار اسید اوریک دفعی جوجه‌های تغذیه شده با مقادیر مختلف متیونین

خوارک آزمایشی	اسید اوریک دفعی (گرم به سهم نیتروژن اسید اوریک از کل نیتروژن متابولیکی بدن در روز)	اسید اوریک دفعی (گرم به میلی‌گرم در هر گرم دفعی)	اسید اوریک دفعی (گرم در روز)	دفحه	خوارک پایه
خوارک پایه	۵۶/۵	۳/۵	۱/۱۶	۱۱۴	
+٪۵۰ متیونین	۵۱/۵	۳/۲۲	۱	۱۰۲/۶	
+٪۷۵ متیونین	۵۳/۱	۳/۲	۱	۱۰۴/۴	
+٪۱۰۰ متیونین	۵۱/۶	۲/۷۸	۰/۹۶	۹۴/۱	
خطای استاندارد	۱/۴	۰/۰۲	۰/۰۴	۷/۵۲	
سطح احتمال	*	**	**	**	

* و **: به ترتیب معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

جدول ۳. مقایسه قابلیت هضم پروتئین جیره‌های حاوی مقادیر مختلف متیونین به سه روش ^{۳,۲,۱}

روش I	روش II	روش III
جیره پایه	۵۱/۴۱ ^c	۷۷/۶
+٪۵۰ متیونین	۵۲/۹ ^{bc}	۷۶/۸
+٪۷۵ متیونین	۵۳/۹ ^{ab}	۷۸
+٪۱۰۰ متیونین	۵۵/۱ ^a	۷۷/۴
خطای استاندارد	۴/۴۵	۱/۷۲

- قابلیت هضم پروتئین بدون تصحیح بر اساس نیتروژن اسید اوریک
- قابلیت هضم پروتئین پس از تصحیح بر اساس نیتروژن اسید اوریک
- قابلیت هضم پروتئین به روش میانگین قابلیت هضم مجموع اسیدهای آمینه

محاسبه قابلیت هضم در جدول ۳ نشان داده شده است. این جدول نشان می‌دهد که در روش اول، مقادیر قابلیت هضم پروتئین، تفاوت معنی‌داری ($P < 0.01$) بین جیره‌های مختلف داشت، به گونه‌ای که با افزایش مقدار متیونین، قابلیت هضم را پروتئین افزایش یافت. مقایسات مستقل تفاوت معنی‌داری را بین روش اول با روش دوم، که مقادیر قابلیت هضم پروتئین بر اساس میزان پروتئین اسید اوریک تصحیح گردید، نشان داد ($P < 0.01$). همان طور که در جدول ۳ مشخص است، مقادیر قابلیت هضم پروتئین که با استفاده از روش دوم به دست آمد، بیش از مقادیر حاصل از روش اول است ($P < 0.01$).

در توجیه این نتایج می‌توان گفت جوجه‌هایی که با کمبود متیونین رو به رو هستند، سهم بیشتری از نیتروژن را به شکل اسید اوریک دفع می‌کنند (جدول ۲). این بدین خاطر است که کمبود متیونین منجر به افزایش کatabolism اسیدهای آمینه شده و نیتروژن آمینی حاصل به شکل اسید اوریک از بدن دفع می‌شود. این نتایج با نتایج پژوهش‌های دیگر هم خوانی دارد (۶، ۸ و ۱۹). بنابراین، در صورت تصحیح نشدن نیتروژن اسید اوریک، مقادیر قابلیت هضم پروتئین کمتر از حد برآورد می‌شود. مقادیر قابلیت هضم پروتئین بدون تصحیح برای پروتئین اسید اوریک گمراه کننده است. در حقیقت، اسید اوریک یک منبع پراکنده‌گی در تعیین قابلیت هضم پروتئین در پرندگان است، زیرا این ترکیب عمدتاً از ادرار منشأ می‌گیرد. از این رو، تصحیح بر اساس پروتئین اسید اوریک باعث حذف این پراکنده‌گی شده، مقادیر قابلیت هضم پروتئین واقعی‌تر و مطمئن‌تر می‌گردد.

مقادیر قابلیت هضم پروتئین پس از تصحیح بر اساس نیتروژن اسید اوریک نزدیک و قابل مقایسه با مقادیر حاصل از اندازه‌گیری اسیدهای آمینه بود (جدول ۳).

از آن جا که اندازه‌گیری اسیدهای آمینه پرهزینه و زمان‌بر می‌باشد، اندازه‌گیری اسید اوریک می‌تواند روشی مناسب و سریع برای برآورد تعیین قابلیت هضم پروتئین و ارزش‌یابی منابع پروتئینی باشد.

هر گرم و یا به صورت درصد)، اهمیت چنانی ندارد، زیرا میزان دفع اسید اوریک تحت تأثیر مصرف خوراک پرنده قرار می‌گیرد. از آن جا که انتظار می‌رفت جوجه‌های تغذیه شده با جیره پایه، که به لحاظ اسیدهای آمینه متعادل نیست، خوراک کمتری نسبت به جیره شاهد مصرف کنند، مقدار اسید اوریک به صورت میزان دفع روزانه آن (گرم در روز) نیز آورده شده است (جدول ۲).

اسید اوریک، فراورده نهایی سوخت و ساز اسیدهای آمینه در پرندگان است، و چون آنزیم تجزیه کننده آن (یوریاز) در بدن پرندگان وجود ندارد، این ماده بیشتر بدون تجزیه دفع می‌شود. بنابراین، میزان دفع اسید اوریک، نشان دهنده میزان تولید آن در بدن پرندگان می‌باشد (۲۱). میزان مصرف خوراک، خود تابعی از وزن بدن است. از این رو، برای حذف هر گونه پراکنده‌گی، داده‌های مربوط به میزان دفع اسید اوریک بر حسب وزن متابولیکی بدن نیز تصحیح گردید (گرم اسید اوریک دفعی به ازای هر کیلوگرم وزن متابولیکی بدن در روز) (۶). پس از انجام چنین تصحیحی، دیده می‌شود که میزان دفع اسید اوریک در گروه دریافت کننده جیره پایه به طور معنی‌داری ($P < 0.01$) بیشتر از گروه شاهد است (۳/۵ در برابر ۲/۷۸ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن متابولیکی بدن در روز) (جدول ۲).

جدول ۲ نشان می‌دهد که روش اندازه‌گیری تأثیر معنی‌داری بر مقدار اسید اوریک کود نداشته است. ضریب همبستگی بین دو روش ۰/۹۷۶ بود. هم‌چنین، اثر متقابل تیمار و روش آزمایش معنی‌دار نبود.

از داده‌های مربوط به غلظت اسید اوریک کود، که به روش اسپکتروفوتومتری تعیین گردید، به عنوان روشی برای تصحیح قابلیت هضم پروتئین استفاده شد. این روش با روش تصحیح نشده و روش حاصل از اندازه‌گیری اسیدهای آمینه مقایسه گردید. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که روش تصحیح قابلیت هضم پروتئین تأثیر کاملاً معنی‌داری بر مقادیر قابلیت هضم پروتئین خوراک‌های آزمایشی داشت. میانگین قابلیت هضم پروتئین خوراک‌های آزمایشی، برای سه روش مختلف

منابع مورد استفاده

1. Alumot, E. and R. Bielorai. 1980. Colorimetric determination of uric acid in poultry excreta and in mixed feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 62: 1350-1352.
2. Andrews, R. P. and N. A. Baldar. 1985. Amino acid analysis of feed constituents. *Sci. Tools* 32: 44-48.
3. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
4. Carias, D., A. M. Cioccia and P. Hevia. 1998. Effect of food intake on protein quality measured in chicks by traditional or biochemical methods. *J. Sci. Food Agric.* 78: 479-489.
5. Castrovilli, C. R. and M. Rigoni. 1980. A method for uric acid determination in poultry digestibility trials. *Poult. Sci.* 59: 662-663.
6. Figares, S. R., S. Aoyagi, Y. Han, C. M. Parsons and D. H. Baker. 1994. Limiting order of amino acids in corn and soybean meal for growth of chick. *Poult. Sci.* 73: 1887-1896.
7. Krogdahl, A. and B. Dalsgard. 1981. Estimation of nitrogen digestibility in poultry: content and distribution of major urinary nitrogen compounds in excreta. *Poult. Sci.* 60: 2480-2485.
8. Mansoori, B. and T. Acamovic. 1998. Real dry matter and nitrogen digestibility: further correction of true dry matter and nitrogen digestibility of proteins in tube-fed birds, using uric acid-corrected nitrogen values. *Br. Poult. Sci.* S35 (Suppl. 1).
9. Marquardt, R. R. 1983. A simple spectrophotometric method for the direct determination of uric acid in avian excreta. *Poult. Sci.* 62: 2106-2108.
10. Marquardt, R. R., A. T. Ward and L. D. Campbell. 1983. A rapid high-performance chromatographic method for the quantitation of uric acid in excreta and tissue samples. *Poult. Sci.* 62: 2099-2105.
11. McNabb, F. M. A. and R. A. McNabb. 1975. Proportions of ammonia, urea, urate and total nitrogen in avian single urine sample. *Poult. Sci.* 54: 1498-1505.
12. Mile, R. D. and W. R. Featherston. 1974. Uric acid excretion as an indicator of amino acid requirement of chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 145: 686-689.
13. Moore, S. and W. H. Stein. 1963. On the determination of sulfur amino acids. *Methods in Enzymol.* 6: 819-825.
14. National Research Council. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. Ninth Rev. Ed., National Academy of Science, Washington D.C.
15. Rotter, B. A., A. Frolich, R. G. Rotter and R. R. Marquardt. 1989. Research note: estimation of apparent protein digestibility using uric acid-corrected nitrogen values in poultry excreta. *Poult. Sci.* 68: 327-329.
16. SAS. 1988. Statistics. User's Guide, Version 6 ed., SAS Institute, Inc., Cary, NC.
17. Sigma Technical Bulletin. 1980. The ultraviolet determination of uric acid in serum or urine at 290 nm. Sigma Tech. Bullet. No. 292-UV, Sigma Chem. Co., St Louis, MO.
18. Sigma Technical Bulletin. 1981. The enzymatic-colorimetric determination of uric acid in serum or urine at 650-750 nm. Sigma Tech. Bullet. No. 680, Sigma Chem. Co., St Louis, MO.
19. Solberg, J., P. J. Butterly and K. N. Boorman. 1971. Effect of moderate methionine deficiency on food, protein and energy utilization in the chick. *Br. Poult. Sci.* 12: 297-304.
20. Vit, P., A. M. Cioccia, O. Brieto and P. Hevia. 1993. Hepatic purine enzymes and uric acid excretion as indicators of protein quality in chickens fed graded L-lysine diets. *J. Sci. Food Agric.* 62: 369-374.
21. Wright, P. A. 1995. Nitrogen excretion: three end-products, many physiological roles (Review). *J. Exp. Biol.* 198: 273-281.