

تصحیح ضرایب قابلیت هضم پروتئین در جوجه‌های گوشتی با اندازه‌گیری میزان اسید اوریک کود، با روش‌های اسپکتروفتومتری 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 آراین تغذیه شده با خوراک‌های آزمایشی حاوی مقادیر مختلف متیونین، با دو روش اسپکتروفتومتری 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 جریان فاز متحرک یک میلی‌متر در دقیقه تنظیم گردید. در روش اسپکتروفتومتری فرابنفش، جذب نوری در ۲۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. از داده‌های حاصل از روش اسپکتروفتومتری 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، اسپکتروفتومتری، 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

مواد و روش‌ها

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 منتقل شد، به گونه‌ای که میانگین وزن هر جوجه در تمامی قفس‌ها تقریباً مشابه بود.

تعداد چهار خوراک آزمایشی (تیمار) بررسی گردید. تیمار اول، جیره پایه بدون مکمل متیونین بود. این جیره از نظر متیونین کمبود داشت، ولی نیاز سیستم را تأمین می‌نمود (کمبود اسیدهای آمینه گوگرددار 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 گوگرددار جیره پایه تأمین گردید. جیره آخر نیاز اسیدهای آمینه گوگرددار 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) خوراک‌های آزمایشی را دریافت نمودند. در سه روز آخر دوره آزمایش، کل خوراک مصرفی و کل کود حاصل مربوط به هر قفس اندازه‌گیری شد. نمونه‌های کود پس از خشک شدن در آون (۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت)، برای تجزیه نیتروژن، اسید اوریک و اسیدهای آمینه در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

برای اندازه‌گیری غلظت اسید اوریک در کود جوجه‌های گوشتی، روش‌های پیشنهادی توسط مارکوارت (۹) و مارکوارت و همکاران (۱۰) با اندکی تغییر جزئی به کار گرفته شد. تغییرات مذکور در روش اسپکتروفتومتری، استفاده از اسید پرکلریک ۶/۲۵ درصد به جای ۵ درصد و سانتی‌فوژ 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 فرآورده 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 پراکندگی در پژوهش‌های گوناگون ناشی از بی‌دقتی در روش‌های اندازه‌گیری است (۱۵).

روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری اسید اوریک در کود پرندگان پیشنهاد شده است. از آن جمله می‌توان به روش‌های ثقل‌سنجی (۵)، رنگ‌سنجی (۱)، و اسپکتروفتومتری (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 مدفوع پیچیده است. عموماً فرض می‌شود که تمامی اسید اوریک موجود در کود از ادرار منشأ می‌گیرد. از این رو، نیازی به جداسازی ادرار از مدفوع 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 به منظور اندازه‌گیری غلظت اسید اوریک در کود جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با مقادیر مختلف متیونین، توسط دو روش اسپکتروفتومتری فرابنفش و کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد، و کاربرد مقادیر حاصل برای تصحیح ضرایب قابلیت هضم پروتئین انجام گرفت.

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

مواد غذایی	%
ذرت (۷/۷٪ پروتئین) ^۱	۵۷/۱۵
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

- هر کیلوگرم مکمل حاوی: ویتامین A ۴۴۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین D ۷۲۰۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین E ۱۴۴۰۰ میلی‌گرم، ویتامین K ۲۰۰۰ میلی‌گرم، تیامین ۶۱۲ میلی‌گرم، ریوفلاوین ۳۰۰۰ میلی‌گرم، اسید پانتوتنیک ۴۸۹۶ میلی‌گرم، نیاسین ۱۲۱۶۰ میلی‌گرم، پیریدوکسین ۶۱۲ میلی‌گرم، کوبالامین ۶۴۰ میلی‌گرم، بیوتین ۲۰۰۰ میلی‌گرم و کولین کلراید ۴۴۰ گرم می‌باشد.
- هر کیلوگرم مکمل حاوی: منگنز ۶۴/۵ گرم، روی ۳۳/۸ گرم، آهن ۱۰۰ گرم، مس ۸ گرم، ید ۶۴۰ میلی‌گرم، کبالت ۱۹۰ میلی‌گرم و سلنیم ۸ گرم است.

برای تهیه استاندارد به روش اسپکتروفتومتری، 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. بیش 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 گلایسین و اسید پرکلریک از شرکت Fisher Scientific تهیه گردید. در روش HPLC، از یک سیستم فاز معکوس با ستون Nova Pack ۲۵۰×۴/۶mm استفاده شد. این سیستم مجهز به یک ستون محافظ بود و سرعت جریان متحرک (آب مقطر غیر یونیزه) یک میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید.

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 ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. با رقیق نمودن این محلول، محلولی با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه، و میزان ۲۰ میکرولیتر از این محلول به ستون تزریق گردید. جذب نوری در ۲۸۵ نانومتر اندازه گیری و سطح زیر منحنی تعیین شد (شکل ۲).

برای آماده سازی نمونه ها مقدار ۵۰ میلی گرم از نمونه کود کاملاً آسیاب شده وزن گردید، و به یک فلاسک ۱۲۵ میلی لیتری منتقل شد. سپس ۵۰ میلی لیتر بافر گلاسیسین ۰/۱ مولار با pH=۹/۳ به آن افزوده شد. محلول حاصل به مدت یک ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. عصاره به دست آمده در ۱۳۵۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ، و سپس بخش محلول فوقانی جدا، و تا هنگام تجزیه در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد.

میزان نیتروژن نمونه های غذا و کود به روش کلدال اندازه گیری شد (۳). ترکیب اسیدهای آمینه نمونه ها به کمک کروماتوگرافی تعویض یونی تعیین گردید (۲). روش اکسیداسیون با اسید پرفرمیک، برای تعیین میزان متیونین و سیستئین جیره ها به کار رفت (۱۳). قابلیت هضم ظاهری پروتئین به سه روش زیر محاسبه گردید:

روش اول:

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

روش دوم:

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

روش سوم:

میانگین قابلیت هضم مجموع اسیدهای آمینه = قابلیت هضم پروتئین تجزیه آماری داده ها در سه مرحله انجام گرفت. در مرحله اول مقدار اسید اوریک نمونه های کود جوجه های تغذیه شده با مقادیر مختلف متیونین، که به روش اسپکتروفتومتری

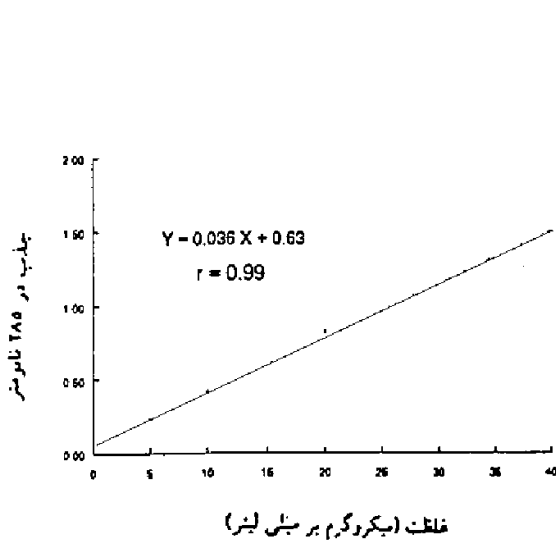
اندازه گیری شد، در یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار توسط نرم افزار SAS (۱۶) تجزیه گردید، و میانگین ها به کمک آزمون چند دامنه ای دانکن مقایسه شد (جدول ۲). از آن جا که مقدار اسید اوریک نمونه های کود با روش HPLC نیز اندازه گیری شد، در مرحله دوم، داده های مربوط به مقدار اسید اوریک نمونه های کود جوجه های تغذیه شده با مقادیر مختلف متیونین حاصل از دو روش مذکور، با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در چارچوب فاکتوریل ۴×۲ تجزیه گردید. در مرحله سوم، از داده های مربوط به مقدار اسید اوریک کود، اندازه گیری شده به روش اسپکتروفتومتری، به عنوان روشی برای تصحیح قابلیت هضم پروتئین خوراک های آزمایشی استفاده شد. این روش با روش معمولی (بدون تصحیح برای نیتروژن اسید اوریک) و روش حاصل از اندازه گیری اسیدهای آمینه مقایسه گردید. داده های مربوط به قابلیت هضم پروتئین به دست آمده توسط سه روش مذکور، در یک طرح کاملاً تصادفی در چارچوب فاکتوریل ۴×۳، با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS (۱۶) تجزیه آماری شد.

نتایج و بحث

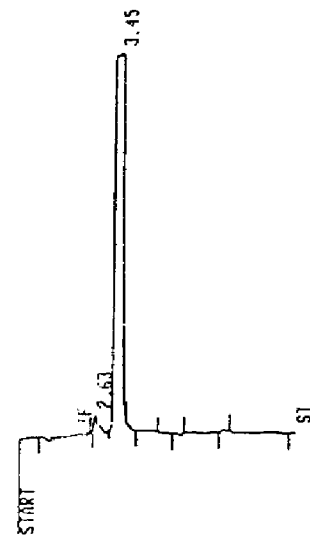
در روش اسپکتروفتومتری حداکثر جذب اسید اوریک در ۲۸۵ نانومتر به دست آمد. منحنی استاندارد اسید اوریک در شکل ۱ نشان داده شده است. همان طور که دیده می شود، یک رابطه خطی بین غلظت اسید اوریک و جذب آن در ۲۸۵ نانومتر وجود دارد.

کروماتوگرام استاندارد اسید اوریک در شکل ۲ نشان داده شده است. چنان که در شکل دیده می شود، اسید اوریک دارای تنها یک نقطه فراز در ۲۸۵ نانومتر است، و زمان خروج (Elution time) آن ۳/۴۵ دقیقه می باشد.

غلظت اسید اوریک نمونه های کود جوجه های گوشتی تغذیه شده با مقادیر مختلف متیونین توسط روش اسپکتروفتومتری در جدول ۲ نشان داده شده است. بیان نتایج اسید اوریک به صورت غلظت این ماده در کود (میلی گرم در



شکل ۲. منحنی استاندارد اسید اوریک



شکل ۱. کروماتوگرام استاندارد اسید اوریک

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

سهم نیتروژن اسید اوریک از کل نیتروژن دفعی	اسید اوریک دفعی (گرم به ازای هر کیلوگرم وزن متابولیکی بدن در روز)	اسید اوریک دفعی (گرم در روز)	اسید اوریک دفعی (میلی‌گرم در هر گرم مدفوع)	خوراک آزمایشی
۵۶/۵	۳/۵	۱/۱۶	۱۱۴	خوراک پایه
۵۱/۵	۳/۲۲	۱	۱۰۲/۶	خوراک پایه + ۰.۵۰٪ متیونین
۵۳/۱	۳/۲	۱	۱۰۴/۴	خوراک پایه + ۰.۷۵٪ متیونین
۵۱/۶	۲/۷۸	۰/۹۶	۹۴/۱	خوراک پایه + ۱.۰۰٪ متیونین
۱/۴	۰/۰۲	۰/۰۴	۷/۵۲	خطای استاندارد
*	**	**	**	سطح احتمال

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

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

روش ^۳ III	روش ^۲ II	روش ^۱ I	
۷۷/۶	۷۸/۹	۵۱/۴۱ ^c	جیره پایه
۷۶/۸	۷۷/۱	۵۲/۹ ^{bc}	جیره پایه + ۰.۵۰٪ متیونین
۷۸	۷۸/۴	۵۳/۹ ^{ab}	جیره پایه + ۰.۷۵٪ متیونین
۷۷/۴	۷۸/۳	۵۵/۱ ^a	جیره پایه + ۱.۰۰٪ متیونین
۱/۳۴	۱/۷۲	۴/۴۵	خطای استاندارد

۱. قابلیت هضم پروتئین بدون تصحیح بر اساس نیتروژن اسید اوریک
۲. قابلیت هضم پروتئین پس از تصحیح بر اساس نیتروژن اسید اوریک
۳. 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 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 کاتابولیسم اسیدهای آمینه شده و نیتروژن آمینی حاصل به شکل اسید اوریک از بدن دفع می‌شود. این نتایج با نتایج پژوهش‌های دیگر هم‌خوانی 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 پراکندگی در تعیین قابلیت هضم پروتئین در پرندگان است، زیرا این ترکیب عمدتاً از ادراک منشأ می‌گیرد. از این رو، تصحیح بر اساس پروتئین اسید اوریک باعث حذف این پراکندگی 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 چندانی 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 (یوریاژ) در بدن پرندگان وجود ندارد، این ماده بیشتر بدون تجزیه دفع می‌شود. بنابراین، میزان دفع اسید اوریک، نشان دهنده میزان تولید آن در بدن پرنده می‌باشد (۲۱). میزان مصرف خوراک، خود تابعی از وزن بدن است. از این رو، برای حذف هر گونه پراکندگی، 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 اسپکتروفتومتری 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. Med.* 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. Buttery 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.