نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۲، بهار ۱۳۹۸
ص‌ص: ۲۷۹~۲۹۰

اثر یک ترکیب اوره آهسته رهش تولید شده بر تولید گاز، تخمیر، گوارش‌پذیری مواد مغذی و فعالیت آنزیم‌های میکروبی با استفاده از شیرابه شکمبه گوسفند

- **ایوب عزیزی** (نویسنده مسئول)
استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
- **افروز شریفی**
استادیار بخش تحقیقات علومی دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز ، ایران
- **حسن فضائلی**
استاد مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،کرج، ایران

تاریخ دریافت : فروردین ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش : خرداد ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۰۶۳۵۸۵۰۴
Email: azizi.ay@lu.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.121403.1675

چکیده

در پژوهش حاضر یک ترکیب آهسته رهش اوره تولید شد و اثرات آن روی فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر، ناپدید شدن مواد مغذی و فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه گوسفند در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید. از چهار تیمار آزمایشی شامل جیره شاهد (کنترل)، و مکمل نمودن جیره شاهد با اوره، اوره آهسته رهش و اُپتیژن استفاده گردید. نتایج نشان داد که در عمده زمان‌های انکوباسیون، بیشترین میزان غلظت آمونیاک شکمبه در جیره غذایی مکمل شده با اوره و کمترین میزان در جیره شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵). هرچند، در همه زمان‌های انکوباسیون اختلاف قابل توجهی بین تیمار مکمل شده با اوره آهسته رهش و اُپتیژن وجود نداشت (P>۰/۰۵). پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون، جیره‌های آزمایشی تأثیری بر کل گاز تولیدی، ضرایب b و c و pH شکمبه نداشتند (P>۰/۰۵). بیشترین میزان ناپدید شدن ماده خشک و ماده آلی، تخمین انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر، سنتز پروتئین میکروبی و فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز در جیره شاهد و کمترین میزان آنها در جیره مکمل شده با اوره به دست آمد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت تجزیه کاغذ صافی با تغذیه جیره حاوی اوره آهسته رهش و کمترین میزان آن در جیره حاوی اوره مشاهده گردید (P<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت پروتئازی شکمبه در جیره مکمل شده با اوره بوده، و کمترین میزان آن در جیره شاهد به دست آمد (P<۰/۰۵). در کل، استفاده از مکمل اوره آهسته رهش در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با اوره سبب بهبود گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی، سنتز پروتئین میکروبی و فعالیت عمده آنزیم‌های فیبرولایتیک شکمبه گردید.

واژه‌های کلیدی: اوره آهسته رهش، نشخوارکنندگان، تولید گاز، تخمیر، فعالیت آنزیمی شکمبه

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 122 pp: 279-290

Effect of one produced slow-release urea component on gas production, fermentation, nutrient disappearance and activity of microbial enzymes using rumen liquor of sheep

By: Azizi[1]*, A., Sharifi[1], A., Fazaeli[2], H.
1 -Animal Science Group, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
2- Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Animal Science Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

Received: April 2018 **Accepted: June 2018**

In the present study one slow-release urea component was produced, and its effects was assessed on in vitro gas production, fermentation parameters, nutrients disappearance and enzyme activity. Four experimental treatments used were 1) control treatment, and supplementing control treatment with 2) urea, 3) slow-released urea and 4) optigen. Results showed that in most examined incubation times highest and lowest ammonia-N concentration was observed in treatment supplemented with urea and control treatment, respectively (P<0.05). However, in all incubation times there was no differences between slow-release urea and optigen treatments (P>0.05). After 96 h incubation, dietary treatments had no effect on total gas production, b and c coefficient and pH of rumen (P>0.05). Highest and lowest in vitro dry matter and organic matter disappearance, estimation of metabolisable energy, short chain fatty acids, microbial protein synthesis and activity of carboxy methyl cellulase were observed in control and urea-treated group (P>0.05). Highest filter paper degrading activity was observed for diet supplemented with slow-release urea, while urea-treated group resulted in lowest activity (P<0.05). Highest rumen protease activity was observed in diet treated with urea, while its lowest amount was related to control treatment (P<0.05). Totally, utilization of slow-release urea compared to urea improved rumen dry matter and organic matter digestion, microbial protein production and most of rumen fibrolytic enzymes activity in vitro.

.

Key words: Slow-release urea, Ruminants, Gas production, Fermentation, Rumen enzyme activity.

مقدمه

کمبود جهانی خوراک دام به خصوص در کشورهای در حال توسعه طی ۵۰ سال اخیر افزایش هزینه تولیدات دامی را به دنبال داشته است، به طوری که در این کشورها حدود ۷۵-۷۰ درصد کل هزینه‌های تولید مربوط به خوراک است، در حالی که این رقم در کشورهای توسعه یافته حدود ۶۰-۵۰ درصد هزینه‌های تولید را شامل می‌شود. بنابراین، استفاده و بهره‌برداری بهینه از پسماندها و تولیدات جانبی محصولات کشاورزی به عنوان خوراک در تغذیه نشخوارکنندگان جهت کاهش هزینه خوراک و بهبود سودآوری صنعت دامپروری بسیار حائز اهمیت است (Negesse و همکاران ۲۰۰۷؛ Rogers و Poore، ۱۹۹۴). با توجه به این که پروتئین یکی از گران قیمت ترین مواد مغذی جیره غذایی حیوانات است و بخش زیادی از آن در کشور ایران وارداتی است، لذا استفاده صحیح از منابع ارزان نیتروژنه ممکن است تا حد زیادی قیمت تمام شده جیره‌های غذایی را متوازن نماید. مطلوب کردن بازده استفاده از پروتئین خام جیره غذایی بستگی به انتخاب پروتئین‌های تکمیل کننده خوراک و مکمل‌های نیتروژن غیر پروتئینی (NPN)[1] دارد. این مکمل‌ها نیتروژن مورد نیاز میکروارگانیسم‌های شکمبه را برای بیشترین مقدار سنتز پروتئین

[1]- Non-protein Nitrogen

میکروبی تأمین می‌کنند (نیکخواه و امانلو، ۱۳۸۱). سنتز پروتئین میکروبی در نشخوارکنندگان از اهمیت ویژه برخوردار است، زیرا پروتئین میکروبی سنتز شده در شکمبه تقریباً ۵۰ درصد اسیدهای آمینه ضروری دام را تأمین می‌کند (Stern و همکاران، ۲۰۰۶). انرژی حاصل از تخمیر مواد آلی و نیتروژن حاصل از تجزیه منابع پروتئینی و NPN، رشد میکروبی شکمبه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Karsly، ۲۰۰۲). دستگاه گوارش نشخوارکنندگان به آنها اجازه استفاده از منابع NPN جهت سنتز پروتئین میکروبی را می‌دهد. این منابع NPN در نشخوارکنندگان در فاز مایع شکمبه به آمونیاک هیدرولیز شده و آمونیاک تولیدی سرانجام توسط فعالیت آنزیمهای میکروبی به پروتئین تبدیل می‌شود. سایر میکروبها کربوهیدارتهای قابل دسترس را به اسید چرب و کتواسید تبدیل می‌کنند. سپس، آمونیاک و کتواسیدها تبدیل به اسید آمینه شده که در نهایت پروتئین میکروبی تولید می‌گردد. همزمانی بین آزادسازی نیتروژن از منابع NPN و کربوهیدرات سهل‌الهضم تأثیر زیادی روی محصول پروتئین میکروبی دارد (Azizi-Shotorkhoft و همکاران، ۲۰۱۶). بر اساس مستندات Azizi-Shotorkhoft و همکاران (۲۰۱۲)، در صورت عدم همزمانی بین منابع نیتروژن قابل تجزیه در شکمبه با کربوهیدارتهای سهل الهضم، علاوه بر کاهش سنتز پروتئین میکروبی میزان هضم فیبر نیز کاهش خواهد یافت. با اینکه NPN پروتئین نیست، اما به عنوان منبع پروتئینی مد نظر است، زیرا آن سرانجام تبدیل به پروتئین می‌شود. یکی از این منابع NPN اوره است. اوره خالص دارای ۴۶۶ گرم نیتروژن در هر کیلوگرم بوده که معادل با ۲۹۱۳ گرم پروتئین برای هر کیلوگرم می‌باشد (Sewel، ۲۰۰۷). استفاده از اوره در جیره غذایی نشخوارکنندگان به معنی مصرف پروتئین قابل تجزیه می‌باشد (نیکخواه و امانلو، ۱۳۸۱). اوره نسبت به سایر منابع NPN کاربرد بیشتری دارد و اگر به طور صحیح به کار رود می‌تواند جزء مؤثری در جیره نشخوارکنندگان باشد (Sewel، ۲۰۰۷).

به هر حال، مصرف اوره دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد. از جمله این که آن فاقد مواد معدنی مورد نیاز نشخوارکنندگان بوده، برخلاف پروتئین مصرفی قابل تجزیه فاقد بنیان‌های کربنی منشعب برای سنتز اسیدهای آمینه میکروبی ضروری است، فاقد ارزش انرژی‌زایی برای میکروب‌ها و دام است، حلالیت اوره در آب بسیار زیاد است و سریعاً در شکمبه به آمونیاک تبدیل می‌شود و اگر بیش از حد مورد نیاز مصرف شود، سبب مسمومیت و نهایتاً مرگ حیوان می‌شود (Reinhardt و همکاران، ۲۰۰۶). وجود اوره در جیره نشخوارکنندگان ضروری نیست اما به عنوان جایگزین بخشی از پروتئین جیره استفاده می‌شود، به ویژه در زمانی که مکمل‌های پروتئینی مثل کنجاله سویا هزینه بالایی داشته باشند (Stanton و Whiter، ۲۰۰۷).

مهمترین مشکل کاربرد اوره در جیره نشخوارکنندگان مسمومیت آمونیاکی است. زمانی که اوره در شکمبه به آمونیاک هیدرولیز می‌شود، آن ممکن است از دیواره شکمبه جذب جریان خون شود. سپس آن در کبد تبدیل به اوره شده که یا از طریق ادرار دفع می‌شود و یا اینکه مجدداً وارد دستگاه گوارش می‌شود. هرچند، چنان چه جذب آمونیاک بیشتر از ظرفیت کبد جهت تبدیل آن به اوره باشد، آمونیاک در خون نشخوارکنندگان تجمع نموده و سبب مسمومیت آمونیاکی می‌شود. علائم این بیماری شامل لرزش، مشکلات تنفسی و اسپاسم بوده که در نهایت سبب مرگ دام می‌شود. مسمومیت آمونیاکی به طور معمول در زمان کوتاهی پس از مصرف خوراک اتفاق افتاده و نرخ آزادشدن آمونیاک در شکمبه در طی چند ساعت اول پس از مصرف جیره‌های حاوی منابع NPN مانند اوره یک فاکتور اساسی است. به منظور جلوگیری از بروز مسمویت آمونیاکی حین مصرف اوره در جیره نشخوارکنندگان، مصرف اوره به عنوان یک مکمل پروتئینی ارزان قیمت به ۱ درصد از ماده خشک جیره محدود شده است. در کشور ایران اوره با درصدهای مختلف نیتروژن به وفور تولید شده و به عنوان کود شیمیایی جهت حاصلخیزی زمینهای زراعی و کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با کند نمودن روند آزاد سازی نیتروژن اوره توسط پوشش دار نمودن یا با استفاده از باند نمودن گروه کربونیل آن با مواد شیمیایی، می‌توان از محتوای نیتروژنی آن حداکثر استفاده را جهت سنتز پروتئین میکروبی در

شکمبه برد و نیز با افزایش میزان استفاده از از آن در جیره، ضمن کاهش قابل توجه هزینه تمام شده جیره، بر مسئله مسمومیت آمونیاکی دام‌ها نیز فائق آمد.

در حیوانات نشخوارکننده می‌توان از مکمل‌های معدنی جهت تأمین گوگرد مورد نیاز حیوان بهره برد (Laiman، ۲۰۰۴). استفاده از گوگرد در تغذیه نشخوارکنندگان نشان دهنده یک رابطه همزیستی بین میکروارگانیسم‌های شکمبه و حیوان است. از آنجایی که افزایش سطح آمونیاک در شکمبه موجب می‌شود که پروتئین‌های گوگرددار در شکمبه تجزیه نشود و از شکمبه عبور نماید، بنابراین گوگرد موجود در آن‌ها مورد استفاده میکروب‌ها قرار نگرفته که در این صورت میکروب‌ها با کمبود گوگرد مواجه شده، در نتیجه سنتز پروتئین‌های گوگرددار کاهش می‌یابد. از طرفی زمانی که سهم پروتئین‌های عبوری به ویژه نوع گوگرددار آن‌ها بالا باشد، بنابراین لازم است در چنین مواردی تأمین گوگرد مورد نیاز میکروارگانیسم‌های شکمبه مورد توجه قرار گیرد. (ARC، ۱۹۸۰). بنابراین، هدف از انجام مطالعه حاضر، اثر یک منبع اوره آهسته رهش تولید شده با تغییر در ساختار شیمیایی آن بر آزمون تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر، گوارش‌پذیری مواد مغذی و فعالیت آنزیم‌های میکروبی با استفاده از شیرابه شکمبه گوسفند در شرایط آزمایشگاهی بود. همچنین، در مکمل تولیدی احتیاجات گوگرد میکروب‌های شکمبه مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

دام‌ها و جیره‌های آزمایشی

آزمایش‌ها با استفاده از ۲ رأس گوسفند نر نژاد لری مجهز به فیستولای شکمبه‌ای با میانگین وزن ۵/۲±۵۵ کیلوگرم به عنوان دهنده مایع شکمبه صورت گرفت. مطالعات آزمایشگاهی روی یک جیره پر کنسانتره فرضی بره پرواری حاوی نسبت ۲۵ به ۷۵ علوفه به کنسانتره به عنوان جیره پایه (جدول ۱) که بر اساس جداول احتیاجات غذایی NRC (۲۰۰۷) تنظیم گردیده بود صورت گرفت که با منابع مختلف نیتروژنه مکمل شده بود. از ۴ جیره آزمایشی جهت انکوباسیون آزمایشگاهی شامل ۱) جیره شاهد (فاقد اوره؛ جدول ۱)، و مکمل نمودن جیره شاهد با ۲) ۱۳ گرم اوره، ۳) ۱۸ گرم اوره آهسته رهش و ۴) ۱۵ گرم اُپتیژن در کیلوگرم ماده خشک جیره بود. علت استفاده از مقادیر مختلف منابع نیتروژنه در جیره‌های غذایی محتوای به دلیل اختلاف در محتوای نیتروژن آنها بود. اوره، اوره آهسته رهش و اُپتیژن استفاده شده به ترتیب میزان ۳/۷۴، ۳/۷۱ و ۳/۸۴ درصد از کل نیتروژن جیره غذایی مربوطه را شامل می‌شدند. اُپتیژن یک نوع اوره آهسته رهش وارداتی است که به عنوان یک تیمار استفاده گردید تا با اوره آهسته رهش تولید شده در مطالعه حاضر مقایسه گردد. نحوه تولید مکمل اوره آهسته رهش مورد استفاده در این آزمایش به این صورت بود که ابتدا میران مورد نظر از اوره با نمک‌های کلیسمی محلول تحت شرایط دمایی خاصی وارد واکنش گردید. پس از خشک نمودن محصول حاصله، ترکیبی با ساختار شیمیایی $CaC_6H_{19}N_9Cl_3O_8$ به دست آمد که محتوی ۳۳ درصد نیتروژن بود (Holladay، ۱۹۹۵). سپس با افزودن گوگرد، مکمل نهایی استفاده شده حاوی نسبت ۱۵ به ۱ گوگرد به نیتروژن بود.

جدول ۱- اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی (گرم در کیلوگرم ماده خشک یا واحد ذکر شده) جیره‌های آزمایشی بره پرواری حاوی اوره، اوره آهسته رهش و اُپتیژن جهت انکوباسیون آزمایشگاهی

	جیره‌های آزمایشی			
	شاهد	اوره	اوره آهسته رهش	اُپتیژن
یونجه	۲۰۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰
کاه گندم	۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
ذرت آسیاب شده	۲۱۰	۳۴۰	۳۵۰	۳۴۴
جو بلغور شده	۲۰۰	۲۵۷	۲۴۰	۲۵۰
کنجاله سویا	۶۰	۱۰	۱۰	۱۰
سبوس گندم	۲۵۰	۹۹	۱۰۰	۱۰۰
اوره	۰	۱۳	۰	۰
اوره آهسته رهش	۰	۰	۱۸	۰
اُپتیژن	۰	۰	۰	۱۵
مکمل مواد معدنی-ویتامینه	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
نمک	۶/۰	۶/۰	۶/۰	۶/۰
جوش شیرین	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
دی کلسیم فسفات	۴/۰	۴/۰	۴/۰	۴/۰
ماده خشک	۹۱۸	۹۱۹	۹۱۸	۹۱۹
ماده آلی	۹۲۰	۹۲۵	۹۲۵	۹۲۶
پروتئین خام	۱۳۹	۱۴۱	۱۴۱	۱۴۲
فیبر نامحلول در شوینده خنثی	۳۲۶	۳۱۱	۳۰۹	۳۱۰
فیبر نامحلول در شوینده اسیدی	۱۶۳	۱۵۶	۱۵۶	۱۵۶
انرژی قابل متابولیسم (Mcal/kg DM)	۲/۵۴	۲/۵۲	۲/۵۲	۲/۵۳

آزمون تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر

جهت انجام آزمون تولید گاز توسط مخلوط میکروبی شکمبه، شیرابه شکمبه از گوسفندان فیستولاگذاری شده که به مدت دو هفته با جیره غذایی حاوی ۶۰ درصد علوفه و ۴۰ درصد کنسانتره عادت‌دهی شده بودند، قبل از خوراک‌دهی وعده صبح توسط پمپ خلاء جمع‌آوری گردید. شیرابه شکمبه بلافاصله توسط چهار لایه پارچه متقال صاف گردید و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه تغذیه دام تکمیلی دانشگاه لرستان سه سری آزمون تولید گاز به طور همزمان انجام شد. در سری اول، ابتدا میزان ۲۵۰ میلی‌گرم نمونه خوراک آسیاب شده با اندازه ذرات ۱ میلی‌متر (Wiley mill, Swedesboro, NJ, USA) به داخل هر ویال برای تعیین فراسنجه‌های آزمون تولید گاز قرار داده شد (۵ تکرار به ازای هر تیمار). سپس، هر ویال که از قبل دمای آن با قرار دادن در بن‌ماری به ۳۹ درجه‌سانتی‌گراد رسیده بود، با ۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه و ۲۵ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی تلقیح گردید (Marten و Barnes، ۱۹۸۰). جهت حصول اطمینان از شرایط بی‌هوازی، گاز دی اکسید کربن به شیرابه شکمبه صاف شده و همچنین بزاق مصنوعی قبل از تزریق به داخل ویال‌ها نیز تزریق گردید. میزان ۳ ویال نیز به عنوان

بلانک (حاوی فقط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی) در نظر گرفته شد. سپس درب ویال‌ها بسته شد و در بن‌ماری با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان گاز تولیدی در ویال‌ها توسط دستگاه فشارسنج در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فراسنجه‌های تولید گاز، میزان ۴ ویال به ازای هر تیمار در نظر گرفته شد و آزمایش در سه دوره (ران) صورت گرفت. برای تعیین فراسنجه‌های تولید گاز از معادله ($P = b(1 - e^{-ct})$) استفاده گردید (Ørskov و McDonald، ۱۹۷۹). در معادله مذکور b گاز تولیدی از بخش تخمیرپذیر (میلی‌لیتر)، c نرخ تولید گاز در ساعت، t زمان انکوباسیون بر حسب ساعت و P میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر می‌باشد.

سری دوم آزمون تولید گاز نیز با ۴ ویال به ازای هر تیمار در سه دوره، به منظور تعیین قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک، pH، سنتز پروتئین میکروبی و فعالیت آنزیمی شکمبه طراحی شد. پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون، ابتدا میزان گاز تولیدی هر ویال ثبت گردید. سپس درب ویال‌ها باز شد و pH آن‌ها به وسیله دستگاه pH متر (مدل 744؛ شرکت Metrohm سوئیس) اندازه‌گیری شد. محتوای هر ویال با ۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بقایای هر ویال جمع‌آوری و خشک گردید. میزان قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک از اختلاف وزن سوبسترای اولیه و وزن بقایا پس از انکوباسیون محاسبه شد. میزان قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده آلی و انرژی قابل متابولیسم به ترتیب بر اساس معادلات زیر تخمین زده شد (Menke و Steingass، ۱۹۸۸):

$$IVOMD\ (g/kg\ OM) = 148.8 + 8.89\ GAS + 4.50\ CP + 6.51\ XA$$

$$ME\ (MJ/kg\ DM) = 2.20 + 0.136\ GAS + 0.057\ CP + 0.0029\ CP^2$$

که در این معادلات IVOMD میزان قابلیت هضم ماده آلی؛ ME انرژی قابل متابولیسم؛ CP میزان پروتئین خام به صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک؛ XA خاکستر به صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک و GAS میزان گاز خالص تولیدی برای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون می‌باشد.

تولید پروتئین میکروبی (MPS) به صورت زیر محاسبه گردید (Blümmel و همکاران، ۱۹۹۷):

$$MPS\ (mg/g\ DM) = mg\ TDS - (ml\ gas \times 2.2\ mg/ml)$$

که در آن TDS سوبسترای هضم شده‌ی حقیقی و ۲/۲ عامل استوکیومتری بر حسب میلی‌گرم کربن، هیدروژن و اکسیژن مورد نیاز برای سنتز اسیدهای چرب کوتاه زنجیر است.

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادله Getachew و همکاران (۲۰۰۲) به صورت زیر محاسبه شد:

$$SCFA\ (mmol/200\ mg\ DM) = 0.0222GP - 0.0042$$

که در این معادله SCFA اسیدهای چرب فرار تولیدی و GP حجم گاز تولیدی در زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون می‌باشد.

سری سوم آزمون تولید گاز با ۴ تکرار به ازای هر تیمار آزمایشی و به منظور تعیین نیتروژن آمونیاکی صورت گرفت. آماده‌سازی نمونه‌ها مانند مراحل قبل انجام گردیده و انکوباسیون به مدت ۶ ساعت صورت گرفت. غلظت نیتروژن آمونیاکی در زمان‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت اول انکوباسیون تعیین گردید. برای این منظور، نمونه‌های سوپرناتانت (۲/۵ میلی‌لیتر) سریعاً با ۰/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. غلظت آمونیاک نمونه‌ها بر اساس روش برودریک و کانگ (۱۹۸۰) تعیین گردید.

فعالیت آنزیمی شکمبه

استخراج آنزیم‌های میکروبی

فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی و پروتئازموجود در بخش میکروبی چسبیده به ذرات خوراکی (پلت‌های جمع‌آوری شده) بر اساس روش Agarwal (۲۰۰۰) تخمین زده شد. آنزیم‌های مترشحه از میکروب‌های شکمبه در سه بخش مختلف شکمبه شامل خارج سلولی، داخل سلولی و آنزیم‌های مربوط به میکروب‌های چسبیده به ذرات خوراکی هستند. در مطالعات آزمایشگاهی به دلیل این که مایع شکمبه با بافر رقیق می‌شود، معمولاً تعیین فعالیت آنزیمی در بخش‌های خارج و داخل سلولی به دلیل غلظت کم آنزیم انجام نمی‌شود و بیشتر تعیین فعالیت آنزیمی میکروب‌های چسبیده به ذرات خوراکی مد نظر است. به منظور استخراج آنزیم‌های موجود در بخش جامد شکمبه، پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون آزمایشگاهی نمونه‌ها، بقایای هرو یال جمع‌آوری شده و با میزان مورد نظر از بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸) مخلوط گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۴ درصد لیزوزیم (شرکت سیگما) و ۲ میلی‌لیتر تتراکلرید کربن به آن افزوده شد. فرآیند با لیزوزیم به وسیله بن‌ماری التراسونیک حاوی آب یخ با نرخ پالس ۳۰ ثانیه و قدرت ۰/۵ صورت گرفت. سوسپانسیون در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت انکوبه گردید و جهت متوقف نمودن واکنش در یخ قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون با دور ۲۷۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه، سوپرناتانت حاصل به عنوان منبع آنزیمی برای بخش جامد شکمبه مورد استفاده قرار گرفت.

تخمین فعالیت آنزیمی

برای تخمین فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۵ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ میلی‌لیتر کربوکسی متیل سلولز ۱ درصد (به عنوان سوبسترا) بود که در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. مخلوط واکنش برای آنزیم میکروکریستالین سلولاز که شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ۱ میلی‌لیتر میکروکریستالین سلولز ۱ درصد (به عنوان سوبسترا) بود در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت. به منظور محاسبه فعالیت کاغذ صافی، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۱ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ گرم کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (به عنوان سوبسترا)، در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید. در همه آزمون‌های مذکور، واکنش با افزودن ۳ میلی‌لیتر محلول دی‌نیتروسالیسیلیک اسید متوقف گردید. گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت هر یک از آنزیم‌های مورد آزمون بر اساس روش Miller (۱۹۵۹) تخمین زده شد. فعالیت‌های آنزیمی بر اساس این فرض که یک واحد آنزیمی توانایی تولید ۱ میکرومول گلوکز در هر ساعت در هر میلی‌لیتر را تحت شرایط مخلوط واکنش دارد محاسبه گردید. برای تخمین فعالیت پروتئازهای شیرابه شکمبه (میکروگرم پروتئین هیدرولیز شده در ساعت)، مخلوط واکنش شامل ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۲۵ میلی‌لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۲۵ میلی‌لیتر محلول کازئین (۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. پس از متوقف نمودن واکنش با افزودن تری کلرو استیک اسید (۲۰۰ میلی‌لیتر در لیتر)، پروتئین طبق روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) تخمین زده شد.

تجزیه شیمیایی نمونه‌ها

ترکیب شیمیایی نمونه‌های آزمایشی بر اساس روش‌های استاندارد AOAC (۱۹۹۰) تعیین گردید. محتوای ماده خشک با خشک کردن در آون، خاکستر خام با سوزاندن نمونه در کوره الکتریکی و پروتئین خام با روش کجلدال تعیین گردید (AOAC، ۱۹۹۰). فیبر نامحلول در شوینده خنثی توسط روش VanSoest و همکاران (۱۹۹۱) و فیبر نامحلول در شوینده اسیدی توسط روش AOAC (۱۹۹۰) تعیین شد.

تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تولید گاز، تخمیر و گوارش‌پذیری نمونه‌ها، با استفاده از رویه مختلط و توسط نرم‌افزار SAS (۲۰۰۱) با استفاده از مدل آماری زیر صورت گرفت:

$$Y_{ijk}= \mu + T_i + R_j + e_{ijk}$$

در این مدل Y_{ijk}، μ، T_i، R_j و e_{ijk} به ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر تیمار آزمایشی iام، اثر دوره آزمایش jام و اثر خطای آزمایشی بود. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

غلظت آمونیاک شیرابه شکمبه در زمان‌های مختلف انکوباسیون جیره‌های آزمایشی در جدول ۲ نشان داده شده است. در زمان‌های ، ۱، ۲ و ۴ ساعت پس از انکوباسیون، بیشترین میزان غلظت آمونیاک شکمبه در جیره غذایی مکمل شده با اوره و کمترین میزان در جیره شاهد مشاهده گردید ($P<0/05$). هرچند، در زمان ۶ انکوباسیون غلظت آمونیاک شکمبه تحت تأثیر نوع منبع نیتروژنه قرار نگرفت. نکته جالب توجه اینکه در همه زمان‌های انکوباسیون اختلاف قابل توجهی بین تیمار مکمل شده با اوره آهسته رهش و اُپتیژن وجود نداشت ($P>0/05$).

جدول ۲- غلظت آمونیاک (میلی‌گرم در دسی لیتر) جیره‌های آزمایشی بره پرواری حاوی اوره، اوره آهسته رهش و اُپتیژن در زمان‌های (ساعت پس از انکوباسیون) مختلف انکوباسیون

	جیره‌های آزمایشی				SEM	P-value
	شاهد	اوره	اوره آهسته رهش	اُپتیژن		
۰	۴/۹۱^{b}	۶/۳۱^{a}	۵/۳۰^{b}	۵/۲۲^{b}	۰/۱۳۵	۰/۰۱
۰/۵	۷/۲۷^{c}	۹/۸۴^{a}	۸/۲۶^{b}	۸/۲۲^{b}	۰/۰۹۶	۰/۰۲
۱	۱۳/۱^{b}	۱۶/۲^{a}	۱۳/۹^{b}	۱۳/۸^{b}	۰/۲۸۷	<۰/۰۱
۲	۱۱/۹^{b}	۱۳/۹^{a}	۱۲/۳^{b}	۱۲/۱^{b}	۰/۲۶۵	<۰/۰۱
۴	۸/۸۳^{c}	۱۱/۴^{a}	۱۰/۶^{b}	۱۰/۴^{b}	۰/۲۱۵	۰/۰۱
۶	۷/۷۰	۷/۵۴	۷/۵۷	۷/۹۳	۰/۲۹۲	۰/۴۵

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

پس از انکوباسیون ۹۶ ساعته (جدول ۳)، جیره‌های آزمایشی تأثیری بر کل گاز تولیدی، پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر (b)، نرخ تولید گاز (c) و pH نداشت ($P>0/05$). بیشترین میزان ناپدید شدن ماده خشک و ماده آلی، تخمین انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر و سنتز پروتئین میکروبی در جیره شاهد و کمترین میزان آنها در جیره مکمل شده با اوره به دست آمد ($P<0/05$). هرچند، از نظر آماری در عمده پارامترهای مذکور اختلافی بین جیره شاهد با جیره مکمل شده با اوره آهسته رهش یا اُپتیژن وجود نداشت ($P>0/05$).

جدول ۳- فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر جیره‌های آزمایشی بره پرواری حاوی اوره، اوره آهسته رهش و اُپتیژن

	جیره‌های آزمایشی				SEM	P-value
	شاهد	اوره	اوره آهسته رهش	اُپتیژن		
کل گاز تولیدی (ml)	۸۷/۵	۷۹/۴	۸۲/۹	۸۳/۶	۲/۸۷	۰/۳۳
B	۸۹/۳	۸۱/۳	۸۴/۲	۸۵/۱	۲/۹۱	۰/۳۵
C	۰/۰۶۷	۰/۰۵۹	۰/۰۶۶	۰/۰۶۵	۰/۰۰۳	۰/۲۰
ناپدید شدن ماده خشک (درصد)	$۶۶/۵^{a}$	$۶۱/۸^{b}$	$۶۴/۲^{a}$	$۶۵/۱^{a}$	۰/۷۱۱	۰/۰۱
ناپدید شدن ماده آلی (درصد)	$۶۸/۱^{a}$	$۶۳/۱^{c}$	$۶۵/۲^{b}$	$۶۶/۳^{ab}$	۰/۵۹۱	۰/۰۲
انرژی قابل متابولیسم (MJ/kg DM)	$۲/۶۵^{a}$	$۲/۴۷^{b}$	$۲/۵۶^{ab}$	$۲/۵۵^{ab}$	۰/۰۳۵	۰/۰۵
pH	۶/۱۲	۶/۱۵	۶/۱۰	۶/۱۸	۰/۰۸۵	۰/۵۶
اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر (mmol/g DM)	$۳/۶۱^{a}$	$۳/۳۲^{b}$	$۳/۴۷^{ab}$	$۳/۴۵^{ab}$	۰/۰۵۲	۰/۰۳
سنتز پروتئین میکروبی (mg/ g DM)	۲۲۰^{a}	۱۷۷^{b}	۲۰۵^{a}	۲۰۷^{a}	۷/۴۲	۰/۰۲

b: پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر)؛ c: نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)؛ SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

بر اساس نتایج جدول ۴ که فعالیت آنزیمهای مهم شکمبه‌ای با تغذیه جیره‌های آزمایشی با منابع مختلف نیتروژن را نشان می‌دهد، بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز به ترتیب در جیره شاهد و جیره حاوی اوره مشاهده گردید (P<۰/۰۵). فعالیت آنزیم میکروکریستالین سلولاز (آویسلاز) تحت تأثیر نوع منبع نیتروژن قرار نگرفت (P>۰/۰۵). هرچند، بیشترین میزان فعالیت تجزیه کاغذ صافی به عنوان شاخصی از تجزیه فیبر در شکمبه با تغذیه جیره حاوی اوره آهسته رهش و کمترین میزان آن در جیره حاوی اوره مشاهده گردید (P<۰/۰۵). فعالیت پروتئازی شکمبه به عنوان شاخص تجزیه پروتئین در شکمبه در جیره حاوی اوره بیشترین میزان و در جیره شاهد کمترین میزان بود (P<۰/۰۵). هرچند آن بین جیره شاهد با جیره حاوی اوره آهسته رهش یا اُپتیژن قابل مقایسه بوده و اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

باید عنوان نمود که اوره آهسته رهش تولید شده با توجه به ساختار شیمیایی آن حاوی ۳۳ درصد نیتروژن می‌باشد. این در حالی است که اوره حاوی ۴۶ درصد و اُپتیژن حاوی ۴۱ درصد نیتروژن است. نتایج پژوهش حاضر اثرات مثبت مکمل نمودن جیره غذایی با اوره آهسته رهش را در مقایسه با اوره نشان داد. بهبود سنتز پروتئین میکروبی در جیره اوره آهسته رهش نسبت به اوره احتمالاً به دلیل متعادل نمودن تجزیه نیتروژن و استفاده حداکثری از آن توسط میکروبهای شکمبه جهت سنتز پروتئین میکروبی بوده است. زیرا نشان داده شده است که همزمانی بین انرژی سهل الهضم و نیتروژن تجزیه پذیر در شکمبه تأثیر مهمی در سنتز پروتئین میکروبی و جلوگیری از هدر روی نیتروژن به صورت آمونیاک می‌شود (Azizi-Shotorkhoft و همکاران، ۲۰۱۲؛ Azizi-Shotorkhoft و همکاران، ۲۰۱۶).

جدول ٤- فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه بره پرواری با انکوباسیون جیره‌های آزمایشی حاوی اوره، اوره آهسته رهش و اُپتیژن

	جیره‌های آزمایشی				SEM	P-value
	شاهد	اوره	اوره آهسته رهش	اُپتیژن		
کربوکسی متیل سلولاز	۷۶/۱^{a}	۴۴/۳^{b}	۵۹/۱^{ab}	۵۸/۱^{ab}	۶/۴۸	۰/۰۴
میکروکریستالین سلولاز	۴۲/۱	۲۸/۶	۳۷/۴	۳۷/۸	۴/۳۱	۰/۲۴
فعالیت تجزیه کاغذ صافی	۲۵/۵^{ab}	۱۸/۵^{b}	۲۹/۱^{a}	۲۸/۴^{a}	۲/۴۵	۰/۰۶
پروتئاز	۲۵۹^{b}	۳۴۴^{a}	۲۸۷^{b}	۲۷۶^{b}	۹/۳۰	<۰/۰۱

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

علت تعیین غلظت آمونیاک طی ۶ ساعت اول این بود که منابع نیتروژن غیر پروتئینی به محض تغذیه در شکمبه در آب حل شده و تبدیل به آمونیاک می‌شوند. کاهش غلظت آمونیاک شکمبه با تغذیه اوره آهسته رهش نسبت به اوره احتمالاً به دلیل کاهش فعالیت پروتئازی شکمبه بوده است (جدول ۴) و مطابق با نتایج مربوط به فعالیت پروتئاز است. می‌توان از غلظت آمونیاک شکمبه به عنوان شاخصی جهت سنتز پروتئین میکروبی استفاده نمود. کاهش غلظت آمونیاک شکمبه نشان دهنده استفاده از آن جهت سنتز میکروبی می باشد (Chamberlain و همکاران، ۱۹۹۳) که در مطالعه حاضر با تغذیه اوره آهسته رهش در مقایسه با اوره نیز اتفاق افتاده است. بهبود شرایط هضم مواد مغذی و تخمیر در شکمبه (جدول ۳) با تغذیه جیره آزمایشی حاوی اوره آهسته رهش در مقایسه با اوره احتمالاً به دلیل متعادل شدن دسترسی به مواد مغذی، افزایش جمعیت میکروبی و به تبع افزایش فعالیت میکروبی شکمبه جهت هضم فیبر بوده که در جدول ۴ نیز نشان داده شده است. مطابق با این یافته‌ها، نشان داده شده است که همزمانی بین انرژی و نیتروژن در شکمبه به واسطه افزایش جمعیت میکروبی سبب افزایش هضم فیبر می‌شود (Azizi-Shotorkhoft و همکاران، ۲۰۱۲).

مشابه مکمل اوره آهسته رهش تولیدی در مطالعه حاضر، در کشور ما اخیراً طالبیان مسعودی و همکاران (۱۳۹۵) نیز یک ترکیب اوره آهسته رهش را تحت عنوان ایزوبوتیرآلدهید مونواوره تولید نموده و در جیره غذایی گوسفند مورد بررسی قرار دادند. آنها نشان دادند که مکمل حاصله قابلیت جایگزینی با اوره را داشته و استفاده از آن در جیره نشخوارکنندگان می‌تواند شرایط ایمنتری را به لحاظ بکارگیری نیتروژن غیر پروتئینی فراهم نماید. با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، مکمل اوره آهسته رهش تولیدی را می‌توان در صورت نیاز به میزان بیشتر و به شکل مطمئن‌تری در مقایسه با سایر منابع NPN به ویژه اوره در جیره نشخوارکنندگان مورد استفاده قرار داد.

نتیجه‌گیری

نتایج یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از مکمل تغذیه‌ای اوره آهسته رهش تولید شده در جیره غذایی بره پرواری در مقایسه با اوره سبب بهبود هضم و تخمیر مواد مغذی، متعادل نمودن سنتز پروتئین میکروبی و فعالیت آنزیمی و کاهش فعالیت پروتئازی شکمبه در شرایط آزمایشگاهی گردید. همچنین، مکمل مورد بررسی قابل مقایسه با نمونه‌های وارداتی آن مانند اُپتیژن بود. بررسی اثرات اوره آهسته رهش تولید شده در شرایط دام زنده، به ویژه روی گاوهای شیرده یا بره‌های پرواری جهت تأیید یافته‌های حاضر توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم می‌داند از زحمات دانشگاه لرستان و پارک علم و فناوری استان لرستان جهت کمک‌های ارزنده در راستای انجام تحقیق حاضر تشکر و قدردانی به عمل آید.

منابع

طالبیان مسعودی، ع.، معینی، م.م.، سوری، م.، منصوری، ه. و عبدلی سنجابی، م. (۱۳۹۵). بررسی کاربرد ترکیبات نیتروژن غیر پروتئینی آهسته رهش ایزوبوتیرآلدهید منو اوره و اُپتیژن بر فراسنجه‌های شکمبه ای و گوارش پذیری مواد مغذی در گوسفند. نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان، ۴: ۲۳-۴۴.

نیکخواه، ع. و امانلو، ح. (۱۳۸۱). احتیاجات غذایی گاوهای شیری (ترجمه)، انتشارات دانشگاه زنجان.

Agarwal, N., Shekar, C., Kumar, R., Chaudhary, L. C. and Kamra, D. N. (2009). Effect of peppermint (*Menthapiperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology*. 148: 321-327.

AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists,Arlington, VA.

ARC. (1980). "The nutritional requirement of ruminant livestock" CAB. International, Wallingford U.K.

Azizi-Shotorkhoft, A., Rouzbehan, Y. and Fazaeli, H. (2012). The influence of the different carbohydrate sources on utilization efficiency of processed broiler litter in sheep. *Livestock Science*. 148: 249–254.

Azizi-Shotorkhoft, A., Sharifi, A., Azarfar, A. and Kiani, A. (2016). Effects of different carbohydrate sources on activity of rumen microbial enzymes and nitrogen retention in sheep fed diet containing recycled poultry bedding. *Journal of Applied Animal Research*. 46: 50-54.

Blümmel, M., Steingss, H. and Becker, K. (1997). The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and N^{15} incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*. 77: 911–921.

Broderick, G. and Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*. 54: 1176–1183.

Chamberlain, D. G., Robertson, S. and Choung, J. J. (1993). Sugars versus starch as supplements to grass silage: effects on ruminal fermentation and the supply of microbial protein to the small intestine, estimated from the urinary excretion of purine derivatives in sheep. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 63:189–194.

Getachew, G., Makkar, H. P. S. and Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *Journal of Agricultural Science*. 139: 341–352.

Holladay, W. (1995). Slow release non-protein nitrogen source for ruminant. Patent number US5733590.

Karsly, M. A. (2002). Effects of source and concentration of nitrogen and carbohydrate on ruminal microbial protein synthesis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*. 26: 201-207.

Laiman, D. (2004). Vitamin and mineral nutrition of grazing cattle. Oklahama cooperative extension service. Division of agriculture resources and natural resources. Oklahoma state university.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Pholin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 262–275.

Marten, G. C. and Barnes, R. F. (1980). Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzymes systems. P 61-71. In Pidgen, W. J., C. C. Balch, and M. Graham, (ed.) Standardization of Analytical Methodology for Feeds. International Development Research Center, Ottawa.

Menke, K. H. and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28: 7–55.

Miller, J. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analitical Chemistry*. 31: 426–428.

Negesse, T., Patra, A. K., Dawson, L. J., Tolera, A., Merkel, R. C., Sahlu, T. (2007). Performance of Spanish and Boer × Spanish doelings consuming diets with different levels of broiler litter, *Small Ruminant Research*. 69: 187-197.

NRC. (2007). National Research Council: Nutrient Requirements of Small Ruminants, Sheep, Goats, Cervide and New York Camelids. National Academy of Science, Washington, D. C.

Ørskov, E.R. and McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*: 92: 499–503.

Reinhardt, C., Johnson, S., DeRouchey, J., Blasi, D., Hollis, L., Hale, R and Marston, T. (2006). Question and answer on beef cattle nutrition. Kansas state university agriculture experiment station and cooperative extension service.

Rogers, G. M. and Poore, M. H. (1994). Alternative feeds for reducing beef cow feed costs. *Veterinary Medicine*. 89:1073–1084.

SAS. (2001). User's Guide. Version 9. SAS Institute, Cary, NC.

Sewel, B. H. (2007). Urea supplements for beef cattle. University of Missouri extension. Department of animal science.

Stanton, T. L. and Whiter, J. (2007). Urea and NPN for cattle and sheep. Colorado state university extention. http//www.ext.colostate.edu/pubs/livestk/01608.htm.

Stern, M. D., Bach, A. and Calsamingia, S. (2006). New concepts in protein nutrition of ruminants. 21st Annual Southwest Nutrition and Management Conference.

Van Soest, P. J., Robertson, J. B. and Lewis, A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583–3597.