



Effect of non-protein nitrogen source in high-protein diet and feeding frequency on growth performance, rumen fermentation parameters, and the activity of microbial enzymes in fattening lambs

S. Varezardi¹, A. Azizi^{2*}, A. Kiani², A. Fadayifar³, A. Sharifi⁴

1. Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
4. Assistant Professor, Animal Science Research Department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ahvaz, Iran

(Received: 26-04-2023 – Revised: 31-10-2023 – Accepted: 04-11-2023)

Introduction: The lack of animal feed resources and the increase in animal feed costs relative to the total production costs have created challenges in supplying society with animal protein. Therefore, correctly estimating the nutritional value of feed, especially protein sources, can be an important step in meeting the needs of livestock and reducing production costs. Protein is the most important and expensive nutrient used in ruminant diets. Using non-protein nitrogen (NPN) sources such as urea or its products can be considered a cheap alternative source in animal feeding. Iran is one of the most important urea-producing countries in the world; therefore, using urea or its slow-release products as a feed additive in animal nutrition can be beneficial. In the past years, various sources of slow-release urea have been produced and used in animal feeding. Biuret (heated urea) is one of the slow-release urea compounds, and its production cost is lower than other slow-release urea sources. Compared to urea, it has less solubility in water and is converted to ammonia in the rumen at a much slower rate. It is also less toxic than urea and has a lower negative effect on feed palatability, so it can be used to a greater extent than urea in the diet of ruminants. Biuret is very safe and it can be included in the diet of animals in an amount of 20 times higher than the toxic dose of urea. Biuret usually contains 248.5% crude protein (39.8% nitrogen content), which is a little less than urea. On the other hand, increasing the daily feeding frequency is one of the management methods that may improve the productive performance of livestock, as well as the quantity and quality of the carcass. Increasing the feed frequency may improve nitrogen retention and reduce body fat. It is believed that increasing the frequency of daily feeding will keep the feed fresh, reduce the amount of feed waste, and improve livestock performance. Therefore, this study aimed to investigate the effect of NPN source, in high-protein diets, and feeding frequency on growth performance, rumen parameters, and the activity of rumen microbial enzymes of fattening lambs.

Materials and methods: Twenty-eight male Lori-Bakhtiari fattening lambs (age: four to five months; live weight: 36.1±3 kg) were assessed for 60 days using a 2×2 factorial experiment in a completely randomized design with four treatments and seven replications. The experimental high-protein diets (16% of DM) contained urea or biuret, which were given to the lambs in the form of a total mixed ration two or three times a day. The lambs were kept in 1×1.5 m² individual stalls. Nutrient intake, growth performance, and ruminal parameters [on day 45 of the experiment at fasting (before morning feeding), three, and six h after feeding] including pH, ammonia and volatile fatty acid concentrations, and microbial enzyme activity were measured.

* Corresponding author: azizi.ay@lu.ac.ir



Results and discussion: Results showed that intakes of dry matter, organic matter, crude protein, neutral detergent fiber and ether extract, final weight, and total weight gain were not affected by NPN type or feeding frequency ($P<0.05$). Compared to urea, lambs consuming biuret had higher average daily gain and better feed conversion ratio ($P<0.05$). The ruminal pH was not affected by the NPN source, feeding frequency, and their interaction ($P<0.05$). Rumen ammonia nitrogen concentration at three and six hours after morning feeding was significantly higher in lambs fed the diet containing urea than in biuret ($P<0.05$). The effect of NPN source, feeding frequency, and their interaction was not significant at 0 and six h after feeding on the ruminal concentration of total volatile fatty acids (VFA), acetate, propionate, butyrate, valerate, iso-valerate, and acetate to propionate ratio ($P<0.05$). However, feeding a diet containing biuret and given three times a day increased total VFA and acetate concentration at three hours post-feeding ($P<0.05$). The ruminal activity of carboxymethyl cellulase at 0, three, and six hours after feeding increased in animals fed biuret-containing diet compared to urea ($P<0.05$). However, rumen protease activity significantly increased in lambs fed a urea-containing diet than biuret-containing diet ($P<0.05$). Feeding three times a day increased the activity of carboxymethyl cellulase at three hours post-feeding ($P<0.05$). Filter paper degrading activity at three and six hours after feeding in lambs fed biuret was significantly higher than those fed urea ($P<0.05$). The activity of microcrystalline cellulase and α -amylase was not affected by the NPN source, feeding frequency, and their interaction ($P<0.05$).

Conclusions: Using biuret compared to the urea, in high-protein diets, and feeding diets three times a day, compared to two times a day, improved rumen fermentation parameters and performance of fattening lambs.

Keywords: Fattening lamb, Feeding frequency, Rumen fermentation parameters, Enzyme activity, Non-protein nitrogen

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Research Vice Chancellor of Lorestan University for providing the necessary facilities to conduct this research.

How to cite this article:

Varezardi, S., Azizi, A., Kiani, A., Fadayifar, A., & Sharifi, A. (2023). Effect of non-protein nitrogen source in high-protein diet and feeding frequency on growth performance, rumen fermentation parameters, and the activity of microbial enzymes in fattening lambs. *Animal Production Research*, 12(4), 63-78. doi: 10.22124/AR.2023.24395.1764



اثر منبع نیتروژن غیر پروتئینی در جیره حاوی پروتئین زیاد و تعداد نوبت خوراک-دهی بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های تخمیر و فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه در بره‌های پروراری

سمیرا وره‌زردی^۱، ایوب عزیزی^{۲*}، علی کیانی^۲، امیر فدایی فر^۳، افروز شریفی^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

۴- استادیار، بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۶ - تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۸/۰۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳)

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر نوع منبع نیتروژن غیر پروتئینی (NPN) در جیره حاوی پروتئین زیاد و تعداد نوبت خوراک‌دهی بر عملکرد رشد، تخمیر و فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه بود. از ۲۸ رأس بره نر پروراری لری-بختیاری با دامنه سنی چهار تا پنج ماهه و میانگین وزن زنده $36/1 \pm 3$ کیلوگرم در قالب آزمایش فاکتوریل 2×2 بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار آزمایشی و هفت تکرار استفاده شد. جیره‌های آزمایشی حاوی اوره یا بیورت (اوره حرارت داده شده) بودند که هر کدام به تعداد دو یا سه وعده در روز تغذیه شدند. نتایج نشان داد که هیچ یک از صفات تحت تأثیر آثار متقابل نوع منبع NPN و تعداد نوبت خوراک‌دهی قرار نگرفتند ($P > 0/05$). بره‌های مصرف‌کننده بیورت در مقایسه با اوره، میانگین افزایش وزن روزانه بیشتر و ضریب تبدیل خوراک مطلوب‌تری داشتند ($P < 0/05$). غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه در سه و شش ساعت پس از خوراک‌دهی و فعالیت آنزیم‌های پروتئازی شکمبه در همه زمان‌های مورد بررسی برای جیره‌های حاوی بیورت نسبت به اوره کاهش یافت ($P < 0/05$). در زمان سه ساعت پس از خوراک‌دهی، تغذیه با بیورت در مقایسه با اوره و نیز دفعات خوراک‌دهی سه بار در مقایسه با دو بار در روز سبب افزایش غلظت استات، کل اسیدهای چرب فرار و فعالیت کربوکسی متیل سلولاز شکمبه شد ($P < 0/05$). در کل، استفاده از بیورت به‌عنوان یک منبع اوره آهسته‌رهش در جیره حاوی پروتئین زیاد، نسبت به اوره و با تغذیه سه بار در روز سبب بهبود عملکرد رشد و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه بره‌های پروراری شد.

واژه‌های کلیدی: بره پروراری، تعداد وعده خوراک‌دهی، فراسنجه‌های شکمبه، فعالیت آنزیمی، نیتروژن غیر پروتئینی

* نویسنده مسئول: azizi.ay@lu.ac.ir

مقدمه

اوره به قیمت نسبی آن‌ها و اثری که بر رشد میکروبی و عملکرد دام می‌گذارند، بستگی دارد. نشان داده شده است که با افزایش سطح ترکیبات NPN در جیره، تولید نیتروژن میکروبی افزایش می‌یابد (Ghanbari *et al.*, 2019). بیورت (اوره حرارت دیده) یکی از ترکیبات آهسته‌رهش اوره است و هزینه تولید آن نسبت به سایر منابع اوره آهسته‌رهش، کمتر است. بیورت قابلیت حل شدن کمتری در آب دارد و در مقایسه با اوره با سرعت بسیار کمتری در شکمبه تبدیل به آمونیاک می‌شود. همچنین، در مقایسه با اوره، نسبتاً غیر سمی است و مانند اوره، تأثیر منفی بر خوش‌خوراکی جیره ندارد. بیورت را می‌توان به میزان بیشتری در مقایسه با اوره در جیره نشخوارکنندگان استفاده نمود (Currier *et al.*, 2004). بیورت در مقایسه با اوره بسیار بی‌خطر است و می‌توان به میزان ۲۰ برابر بیشتر از دوز سمی اوره، آن را در جیره دام‌های گوشتی گنجانده (Currier *et al.*, 2004). بیورت معمولاً حاوی ۲۴۸/۵ درصد پروتئین خام (با محتوای نیتروژن برابر با ۳۹/۸ درصد) بوده که مقداری از اوره کمتر است (Currier *et al.*, 2004). الگوی آزدسازی آمونیاک بیورت نزدیک به الگوی پروتئین‌های گیاهی است (Currier *et al.*, 2004). (Saro *et al.*, 2019). تأثیر گنجانده دو سطح مختلف اوره آهسته‌رهش را به‌جای کنجاله سویا در جیره‌های با درصد پروتئین بالا (۱۵۶ و ۱۶۳ گرم در کیلوگرم ماده خشک) در بره پرواری مورد بررسی قرار دادند و دریافته‌اند که جایگزینی نسبی کنجاله سویا با اوره، تأثیری بر سرعت رشد بره‌ها نداشت، هرچند، کاربرد اوره آهسته‌رهش، هزینه‌های تغذیه را کاهش داده و هیچ‌گونه عوارض جانبی روی خوراک مصرفی، تخمیر شکمبه و کیفیت لاشه نداشت. در پژوهش دیگری، اثر تزریق مستقیم اوره یا بیورت (به میزان ۹۰ درصد پروتئین قابل تجزیه در شکمبه) در مقایسه با جیره شاهد در گوساله‌های تغذیه شده با علوفه کم کیفیت بررسی شد و نتایج نشان داد که استفاده از اوره یا بیورت به‌طور مؤثری سبب بهبود فرآیندهای هضم و تخمیر شکمبه شده و بیورت اثر مطلوب-تری نسبت به اوره از خود نشان داد (Currier *et al.*, 2004). اخیراً در مطالعه‌ای، جایگزینی اوره آهسته‌رهش (۱۰۰ گرم+ ۴۰۰ گرم سیلاژ ذرت) به‌جای کنجاله سویا (۵۰۰ گرم) در جیره گاوهای شیری سبب افزایش قابل توجه تولید شیر (۷/۳۶ درصد) و افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار استات و ایزووالرات شکمبه شده است (Jiang *et al.*, 2023).

کمبود منابع خوراک دام از یک طرف و افزایش سهم هزینه‌های خوراک دام نسبت به کل هزینه تولید از طرف دیگر، چالش‌هایی را در راستای تأمین پروتئین حیوانی مورد نیاز جامعه ایجاد کرده است. لذا برآورد صحیح ارزش تغذیه‌ای مواد خوراکی به‌ویژه منابع پروتئینی می‌تواند گام مهمی در راستای تأمین احتیاجات دام و کاهش هزینه‌های تولید به‌شمار آید (Ghorbani *et al.*, 2016). پروتئین مهمترین و گرانترین ماده مغذی مورد استفاده در جیره نشخوارکنندگان است (Cherdthong and Wanapat, 2010). بنابراین، تولیدکنندگان گوشت و شیر به دنبال یک منبع جایگزین ارزان قیمت پروتئین هستند تا ضمن حفظ سلامت دام، قیمت تمام شده جیره نیز کاهش یابد. کنجاله سویا به مدت طولانی به‌عنوان منبع عمده پروتئین خام برای نشخوارکنندگان مورد استفاده قرار گرفته است، با این حال، با افزایش قیمت آن، هزینه تولیدات دامی افزایش یافته است (Calupa, 2007). بنابراین، استفاده از منابع نیتروژن غیر پروتئینی (NPN) مانند اوره یا فرآورده‌های آن به‌عنوان یک منبع جایگزین ارزان قیمت در تغذیه دام می‌تواند مورد نظر قرار گیرد (Mousavi *et al.*, 2019). در ایران، ظرفیت نسبتاً زیادی جهت تولید اوره و امکان ساخت ترکیبات نیتروژن‌دار آهسته‌رهش از اوره وجود دارد، در حالی که متأسفانه استفاده از NPN در تغذیه دام به شایستگی مورد توجه قرار نگرفته است و واردات این ترکیبات از خارج کشور نیز انجام می‌پذیرد (Talebian *et al.*, 2016). ایران یکی از مهمترین کشورهای تولید کننده اوره در دنیا است و استفاده از پتانسیل‌های اوره و یا ترکیبات آهسته‌رهش حاصله از آن به‌عنوان یک افزودنی خوراکی در تغذیه دام، جای کار بسیاری دارد. فناوری تولید اوره آهسته‌رهش با آزدسازی کنترل شده نیتروژن در شکمبه اطمینان می‌دهد که باکتری‌های شکمبه به‌صورت مداوم و تدریجی به منبع نیتروژن دسترسی خواهند داشت (Zahmatkesh and Jahani, 2022; Moghadam, 2018; Jinjia *et al.*, 2022). کاهش نرخ تجزیه شکمبه‌ای اوره، یکی از راهبردهای بهبود مصرف آن در نشخوارکنندگان بوده و فرآورده‌های متعدد اوره آهسته‌رهش برای این منظور توسعه یافته‌اند (Talebian *et al.*, 2016). میزان مقبولیت منابع آهسته‌رهش

مواد و روش‌ها

دام‌ها و تیمارهای آزمایشی: این پژوهش در ایستگاه دامپروری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. از ۲۸ رأس بره نر پروراری نژاد لری-بختیاری با دامنه سنی چهار تا پنج ماهه و میانگین وزن زنده $3 \pm 36/1$ کیلوگرم به مدت ۶۰ روز استفاده شد. برای این منظور از آزمایش فاکتوریل 2×2 در قالب طرح کاملاً تصادفی (چهار تیمار آزمایشی و هفت تکرار در هر تیمار) استفاده شد. جیره‌های آزمایشی (با محتوای پروتئین زیاد برابر با ۱۶ درصد) حاوی اوره یا بیورت بودند که هرکدام به صورت جیره کامل مخلوط (TMR) به میزان دو یا سه بار در روز در اختیار بره‌ها قرار گرفت. قبل از شروع دوره اصلی آزمایش، دو هفته به عنوان دوره عادت‌پذیری دام‌ها به جایگاه‌های انفرادی و جیره‌های آزمایشی در نظر گرفته شد. در دوره عادت‌پذیری، بره‌ها علیه بیماری آنترتوکسمی واکسینه شده و میزان ۲۰ میلی‌لیتر شربت ضد انگل کلوزانتل پنج درصد به ازای هر ۱۰ کیلوگرم وزن بدن و شربت ضد انگل نیکلوزوماید (۱۰ میلی‌لیتر به ازای هر بره) به دام‌ها خوراندند شد. فرآیند تولید بیورت از اوره به این صورت است که در دمای بالاتر از نقطه ذوب اوره، یک مولکول اوره به آمونیاک و اسید سیانیک تجزیه می‌شود. اسید سیانیک که از تجزیه اوره تولید می‌شود، سپس با اوره دیگر واکنش داده و بیورت تشکیل می‌دهد. به طور کلی، دو مولکول اوره به یک مولکول بیورت و یک مولکول آمونیاک تبدیل می‌شود. در مطالعه حاضر، فرآیند تولید بیورت از اوره در آزمایشگاه به مدت سه ساعت در دمای ۱۴۵ درجه سلسیوس و بدون استفاده از کاتالیزور انجام شد (Park et al., 2009). در طول فرآیند تولید بیورت، دمای داخل دیگ حاوی اوره همواره با دماسنج کنترل شد. پس از اتمام کار، اجازه داده شد تا محصول تولیدی خنک شود. سپس، بیورت تولید شده با فرمول شیمیایی $\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2$ که کریستالی و بی رنگ است، برداشت شده و جهت استفاده در تغذیه دام‌ها نگهداری شد. قابل ذکر است که در آزمایش حاضر، استاندارد وجود نداشت که صحت انجام واکنش‌های شیمیایی تولید بیورت با آن سنجیده شود و این امر از محدودیت‌های پژوهش حاضر است. جیره‌های آزمایشی که بر اساس جداول احتیاجات غذایی نشخوارکنندگان کوچک (NRC, 2007)، اما با محتوای

از سوی دیگر، افزایش تعداد نوبت خوراک‌دهی روزانه یکی از روش‌های مدیریتی بوده که ممکن است سبب بهبود عملکرد دام‌ها از جمله تولید شیر و رشد، و همچنین کمیت و کیفیت لاشه شود. افزایش دفعات خوراک‌دهی ممکن است موجب بهبود بازده بیوانرژتیک بدن، ابقاء نیتروژن و کاهش ذخیره چربی بدن و چربی لاشه شود (Sutton et al., 1985; Shabi et al., 1999). معمولاً نشخوارکنندگان یک یا عمدتاً دو بار در روز تغذیه می‌شوند، اما اعتقاد بر این است که افزایش دفعات خوراک‌دهی روزانه باعث تازه نگه داشتن خوراک، کاهش میزان پسماند، کاهش ناراحتی‌های گوارشی و بهبود عملکرد دام می‌شود. افزایش دفعات خوراک‌دهی، اشتهای بره‌ها را تقویت نموده و سبب بهبود عملکرد رشد آن‌ها می‌شود (Mohammed et al., 2018). تغذیه نشخوارکنندگان در فواصل زمانی کمتر در روز (افزایش دفعات خوراک‌دهی روزانه) ممکن است به دلیل همزمانی بهتر بین آزادسازی مداوم انرژی و نیتروژن، شرایط ثابتی را برای هضم و سوخت و ساز خوراک در شکمبه ایجاد نماید و در نتیجه، سبب افزایش بازده تولید پروتئین میکروبی شود.

با توجه به آن که یکی از اهداف در تغذیه دام، کاربرد مقادیر قابل ملاحظه‌ای از منابع نیتروژن غیر پروتئینی در جیره است، بنابراین، دفعات خوراک‌دهی می‌تواند مهم باشد، زیرا می‌توان چنین منابعی را در تعداد وعده بیشتری طی روز به دام تغذیه نمود، و ضمن کاهش احتمال مسمومیت آمونیاکی، موجب بهبود بازده مصرف آن در شکمبه شد. مطالعات بسیاری در زمینه استفاده از انواع منبع NPN یا مقایسه سطوح مختلف آن‌ها در تغذیه نشخوارکنندگان صورت گرفته است (Olafadehan et al., 2014; Wang et al., 2014; Ntiranyibagira et al., 2015; Gustavo et al., 2015; Rozanski et al., 2017; Xu et al., 2019). در حالی که در ارتباط با استفاده از بیورت و سطوح مختلف خوراک‌دهی، مطالعات صورت گرفته محدود است. بنابراین، هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثر نوع منبع NPN (اوره یا بیورت) در جیره حاوی پروتئین زیاد و تعداد نوبت خوراک‌دهی (دو یا سه بار در روز) بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های تخمیر و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی شکمبه بره‌های پروراری لری-بختیاری بود.

اولیه به‌دست آمد. میزان افزایش وزن روزانه هر بره نیز از تقسیم کل افزایش وزن به تعداد روز پرورش (۶۰ روز) تعیین شد. ضریب تبدیل غذایی (FCR) از تقسیم کل ماده خشک مصرفی هر بره (بر اساس کیلوگرم) به کل افزایش وزن (بر حسب کیلوگرم) طی دوره پرورار به‌دست آمد. بر اساس تفریق میزان پسماند روزانه هر دام از کل ماده خشک ریخته شده در آخور، میزان مصرف ماده خشک هر بره تعیین شد. همچنین، بر اساس درصد مواد مغذی موجود در هر جیره غذایی و پسماند خوراک، میزان مصرف مواد مغذی محاسبه شد.

نمونه‌گیری از مایع شکمبه: جهت تعیین فراسنجه‌های شکمبه شامل pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار، در روز ۴۵ آزمایش و در سه نوبت شامل ناشتا (قبل از خوراک‌دهی)، سه و شش ساعت پس از خوراک‌دهی وعده صبح، مایع شکمبه با لوله مری از تمامی دام‌ها به‌دست آمد. میزان ۱۰ تا ۲۰ میلی‌لیتر اولیه جهت کاهش آثار منفی بزاق بر pH دور ریخته شد. ابتدا pH محتویات شکمبه بلافاصله با دستگاه pH متر سیار (مدل 744؛ شرکت Metrohm سوئیس) اندازه‌گیری شد. سپس، محتویات شکمبه از چهار لایه پارچه متقال عبور داده شد و به ازای

پروتئین زیاد تنظیم شدند شامل: (۱) جیره حاوی اوره با تغذیه دو بار در روز، (۲) جیره حاوی اوره با تغذیه سه بار در روز، (۳) جیره حاوی بیورت با تغذیه دو بار در روز، و (۴) جیره حاوی بیورت با تغذیه سه بار در روز بودند.

نداشتن جیره شاهد منفی (فاقد اوره یا بیورت) و شاهد مثبت (یک منبع بیورت تجاری) از جمله محدودیت‌های پژوهش حاضر هستند. اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ آرایه شده است. دام‌های مورد آزمایش روزانه به میزانی تغذیه شدند که حداقل پنج درصد پسمانده در آخور بماند. هر روز صبح قبل از خوراک‌دهی وعده صبح، پسمانده خوراک هر بره جمع‌آوری شد و سپس، خوراک تازه در آخور قرار گرفت. خوراک مصرفی و پسمانده‌های خوراک هر بره در کل دوره آزمایش ثبت شد. در تیمارهای با دو نوبت خوراک‌دهی در روز، خوراک روزانه در ساعات ۰۸:۰۰ و ۱۶:۰۰ در اختیار دام‌ها قرار گرفته شد، و در تیمارهای با سه وعده خوراک‌دهی، جیره‌های آزمایشی در سه زمان ۰۸:۰۰، ۱۵:۰۰ و ۲۰:۰۰ در آخور قرار داده شد. در روز آخر آزمایش، پس از ۱۶ ساعت گرسنگی، دام‌ها توزین شدند و صفات مربوط به عملکرد محاسبه شدند. میزان کل افزایش وزن هر بره با تفریق وزن نهایی از وزن

جدول ۱- اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی حاوی منابع مختلف نیتروژن غیر پروتئینی (بر حسب درصد ماده خشک جیره)

Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets containing different non-protein nitrogen sources (based on % of dietary DM)

Ingredients	Experimental diets	
	Containing urea	Containing biuret
Alfalfa hay (dried)	25.0	25.0
Wheat straw	5.0	5.0
Barley grain, ground	30.0	30.0
Corn grain, ground	22.5	22.35
Soybean meal	6.0	6.0
Wheat bran	7.0	7.0
Premix ¹	3.5	3.5
Urea	1.0	-
Biuret	-	1.15
Chemical composition		
Dry matter	91.0	91.0
Organic matter	92.1	92.1
Crude protein	16.0	16.0
Neutral detergent fiber (NDF)	30.0	29.9
Ether extract	2.68	2.67
Ca	0.86	0.86
P	0.37	0.37
ME (Mcal/kg DM)	2.62	2.62

1. The mineral and vitamin premix contained (1 kg premix): 25000 IU vitamin A, 5000 IU vitamin D₃, 1000 IU vitamin E, 1250 mg Mn, 375 mg Cu, 25 mg Se, 140000 mg Ca, 2500 mg P, 20 mg Co, 25mg Iodine, 25000 mg Mg, 25000 mg Na (NaCl), 25000 mg Na (NaHCO₃), 1000 mg Antioxidant.

هر ۱/۲ میلی لیتر مایع شکمبه، ۰/۳ میلی لیتر متافسفریک اسید ۲۵ درصد به آن اضافه شد. نمونه‌ها جهت تجزیه اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (Chrompack cp, 9002) به فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا روز تجزیه انتقال داده شدند. از اسید ۲-تیل بوتیریک به عنوان استاندارد داخلی جهت تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شد. قبل از تزریق به دستگاه، پس از یخ‌گشایی نمونه‌ها در دمای اتاق، آنها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰×g و در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. سپس، بخش مایع شفاف رویی (سوپرناتانت) به داخل ویال‌های مخصوص کروماتوگرافی انتقال داده شد. برای هر نمونه، میزان ۰/۲ میکرولیتر به وسیله سرنگ همیلتون به داخل دستگاه تزریق شد. ستون دستگاه (Carboxen TM 1000, 45/60) دارای طول ۱۲۲ سانتی‌متر و قطر ۱/۸ میلی‌متر بود. جریان گازهای نیتروژن، هیدروژن و هوا به داخل ستون به ترتیب ۳۰، ۳۰ و ۳۲۰ میلی لیتر در دقیقه بود (Nooriyan Soroor *et al.*, 2013). همچنین، برای تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه، ابتدا مقدار پنج میلی لیتر دیگر مایع شکمبه با پنج میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال کاملاً مخلوط شده و سریعاً به فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه بر اساس روش فنل-هیپوکلریت تعیین شد (Broderick and Kang, 1980).

فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی و آلفا آمیلاز موجود در مایع شکمبه تخمین زده شد (Agarwal, 2000). روش کار به این صورت بود که نمونه‌های مایع شکمبه به مدت ۲۰ دقیقه و با دور ۵۰۰۰×g سانتریفیوژ شدند و بقایای پلت جمع‌آوری شد. سپس، بقایا با تتراکلرید کربن و آنزیم لیزوزیم (سیگما آلدریج، CAS Number 12650-88-3) فرآیند شدند و مخلوط آنزیم‌های مایع شکمبه در بافر فسفات در سانتریفیوژ با دور ۲۷۰۰۰×g در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه به دست آمد. برای تخمین فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، مخلوط واکنش شامل یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۵ میلی لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ میلی لیتر کربوکسی متیل سلولز یک درصد (سیگما آلدریج CAS Number 9004-32-4) بود که در دمای ۳۹ درجه

سلسیوس به مدت یک ساعت انکوبه شد. مخلوط واکنش برای آنزیم میکروکریستالین سلولاز که شامل یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، یک میلی لیتر شیرابه شکمبه و یک میلی لیتر میکروکریستالین سلولز یک درصد (به عنوان سوپسترا) بود در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفت. به منظور محاسبه فعالیت کاغذ صافی، مخلوط واکنش شامل یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، یک میلی لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ گرم کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (به عنوان سوپسترا)، در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت انکوبه شد. به منظور محاسبه فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز، مخلوط واکنش شامل یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، نیم میلی لیتر شیرابه شکمبه و نیم میلی لیتر محلول نشاسته یک درصد بود که در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. در همه آزمون‌های مذکور، واکنش با افزودن سه میلی لیتر محلول اسید دی‌نیترو سالیسیلیک متوقف شد. گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت هر یک از آنزیم‌های مورد آزمون، تخمین زده شد (Miller, 1959). فعالیت‌های آنزیمی بر اساس این فرض که یک واحد آنزیمی توانایی تولید یک میکرومول گلوکز در هر دقیقه در هر میلی لیتر مایع شکمبه را در شرایط مخلوط واکنش دارد محاسبه شد. برای تعیین فعالیت پروتئازی شکمبه، مخلوط واکنش شامل یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر با ۶/۸)، ۰/۲۵ میلی لیتر مایع شکمبه صاف شده و ۰/۲۵ میلی لیتر کاربن (۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر) بود که در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت انکوبه شد. سپس، مخلوط واکنش با افزودن تری کلرو استیک اسید (۲۰۰ میلی لیتر در لیتر) متوقف شده و پروتئین بر اساس روش مربوطه تعیین شد (Lowry *et al.*, 1951).

تجزیه شیمیایی نمونه‌ها: میزان ماده خشک نمونه‌های جیره و پسماند خوراک در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت تعیین شد (AOAC, 1990). خاکستر خام در کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس تعیین شد و میزان ماده آلی از اختلاف بین وزن ماده خشک نمونه اولیه با وزن خاکستر محاسبه شد (AOAC, 1990). پروتئین خام نمونه‌ها با تعیین میزان نیتروژن آن‌ها به وسیله دستگاه کلدال اندازه‌گیری شد (AOAC, 1990). الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی

نتایج و بحث

عملکرد رشد و مصرف خوراک: نتایج مربوط به عملکرد رشد و مصرف مواد مغذی بره‌های پرواری در جدول ۲ ارائه شده است. صفات عملکرد رشد و مصرف خوراک تحت تأثیر اثر متقابل نوع منبع NPN و تعداد وعده خوراک‌دهی قرار نگرفت ($P > 0.05$). بره‌های تغذیه شده با جیره حاوی بیورت، میانگین افزایش وزن روزانه بیشتر و ضریب تبدیل غذایی کمتری نسبت به گروه تغذیه شده با اوره داشتند ($P < 0.05$). هرچند، صفات مذکور تحت تأثیر تعداد دفعات خوراک‌دهی و اثر متقابل تعداد دفعات خوراک‌دهی و منبع NPN قرار نگرفت ($P > 0.05$).

میانگین وزن نهایی، کل افزایش وزن، مصرف ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و چربی خام تحت تأثیر منبع NPN و دفعات خوراک‌دهی قرار نگرفت ($P > 0.05$). بهبود میانگین افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل غذایی در جیره حاوی بیورت نسبت به اوره احتمالاً به دلیل همزمانی بین آزادسازی آمونیاک و انرژی سهل‌الهضم جیره برای میکروبیوم‌های شکمبه بوده است که منجر به بهبود شرایط تخمیر و تولید توده میکروبی بیشتری در شکمبه شده است (Azizi-Shotorkhoft *et al.*, 2018).

(ADF) نمونه‌ها بدون استفاده از آلفا امیلاز مقاوم به حرارت به ترتیب بر اساس روش‌های (1990) AOAC و Van Soest (1991) *et al.* محاسبه شد.

تجزیه آماری: در مطالعه حاضر از آزمایش فاکتوریل 2×2 بر پایه طرح کاملاً تصادفی جهت تجزیه داده‌ها استفاده شد. تجزیه واریانس داده‌های عملکرد، فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی شکمبه با استفاده از رویه GLM و با نرم‌افزار آماری (2005) SAS بر اساس مدل آماری زیر انجام شد:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{ijk}$$

که در آن، Y_{ijk} ، صفت مورد نظر، μ ، میانگین کل، A_i ، اثر ثابت A منبع NPN، B_j ، اثر ثابت B نوبت خوراک‌دهی، AB_{ij} ، اثر متقابل بین منبع NPN و تعداد نوبت خوراک‌دهی و e_{ijk} ، اثر خطای آزمایشی بود. تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مصرف خوراک به صورت داده‌های تکرار شده در زمان صورت گرفت. وزن اولیه دام‌ها به عنوان متغیر همبسته در نظر گرفته شد و به دلیل آن که معنی‌دار نبود، از مدل حذف شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام شد.

جدول ۲- اثر نوع منبع نیتروژن غیر پروتئینی (NPN) و تعداد نوبت خوراک‌دهی بر عملکرد رشد و مصرف مواد مغذی بره‌های پرواری

Table 2. Effect of non-protein nitrogen source (NPN) and feeding frequency on the growth performance and nutrient intake of fattening lambs

NPN source	Urea		Bioret		SEM	P-value		
	Twice a day	Three times a day	Twice a day	Three times a day		NPN source	Feeding frequency	NPN source × Feeding frequency
Growth performance								
Initial body weight (kg)	35.8	36.3	36.5	35.3	1.47	0.93	0.79	0.52
Final body weight (kg)	50.5	50.4	50.4	51.3	2.09	0.83	0.88	0.82
Total weight gain (kg)	15.3	16.1	16.1	16.9	1.46	0.39	0.37	0.97
Average daily gain (g)	255	268	278	285	22.9	0.04	0.27	0.56
Feed conversion ratio	7.84	7.68	7.23	6.98	0.863	0.04	0.23	0.76
Nutrient intake (g/d)								
Dry matter	1932	1937	1945	2001	77.1	0.59	0.68	0.73
Organic matter	1777	1782	1790	1842	67.1	0.58	0.67	0.73
Crude protein	309	310	311	320	11.7	0.57	0.68	0.72
Neutral detergent fiber	573	575	578	594	21.6	0.55	0.63	0.71
Ether extract	51.9	51.7	51.9	53.4	1.941	0.54	0.59	0.70

عملکرد رشد، مخالف و نتایج مربوط به مصرف خوراک، موافق با نتایج تحقیق حاضر است. هرچند، در آزمایشی با افزایش تعداد دفعات خوراک‌دهی، اثر قابل توجهی روی وزن بدن گوساله پرواری مشاهده نشد (Tohidi *et al.*, 2010). در مطالعات قبلی، بهبود در عملکرد رشد با افزایش تعداد دفعات خوراک‌دهی روزانه عمدتاً در نشخوارکنندگان با افزایش مصرف ماده خشک توجیه شده است. نکته قابل توجه در تحقیق حاضر این است که آثار مثبت دفعات خوراک‌دهی (سه بار در روز) یا منبع NPN (تغذیه با بیورت) روی صفات عملکردی بره‌ها بدون تأثیر بر مصرف خوراک رخ داده است که دلیل این امر را می‌توان از راه بهبود سوخت و ساز و همکنش‌افزایی مطلوب بین مواد مغذی حین تغذیه با بیورت و نیز با دفعات خوراک‌دهی سه بار در روز توجیه کرد.

فراسنجه‌های تخمیر شکمبه: همان‌طوری که در جدول ۳ نشان داده شده است در همه زمان‌های مورد بررسی، هیچ‌یک از صفات مربوط به تخمیر شکمبه تحت تأثیر اثر متقابل نوع منبع NPN و تعداد دفعات خوراک‌دهی قرار نگرفت ($P > 0.05$). pH شکمبه بره‌ها در زمان‌های صفر، سه و شش ساعت پس از خوراک‌دهی تحت تأثیر آثار اصلی نوع منبع NPN و تعداد دفعات خوراک‌دهی قرار نگرفت ($P > 0.05$). در مطالعه حاضر، pH شکمبه دام‌ها در محدوده طبیعی ۶/۵ تا ۷/۵ قرار گرفت (Van Soest, 1982). مطابق با این نتایج، در پژوهشی مشخص شد که pH مایع شکمبه بزها تحت تأثیر جیره‌های حاوی ترکیبات اوره قرار نگرفت (Cherdthong *et al.*, 2011; Jawandel Kurabaslu *et al.*, 2013). همچنین، اخیراً در مطالعه‌ای با جایگزینی اوره آهسته‌رشد به جای کنجاله سویا در جیره گاوهای شیری، pH شکمبه تحت تأثیر قرار نگرفت (Jiang *et al.*, 2023). غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه در زمان قبل از خوراک‌دهی تحت تأثیر نوع منبع NPN و تعداد وعده خوراک‌دهی قرار نگرفت ($P > 0.05$)، اما در سه و شش ساعت پس از خوراک‌دهی، در دام‌های تغذیه شده با جیره حاوی بیورت نسبت به اوره به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). مطابق با این نتایج، برخی از مطالعات، کاهش غلظت آمونیاک شکمبه را هنگام تغذیه با اوره آهسته‌رشد در مقایسه با اوره گزارش کردند (Taylor-Edwards *et al.*, 2009; Cherdthong *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2011).

از مزایای استفاده از منابع NPN آهسته‌رشد در جیره می‌توان مواردی مانند افزایش زمان حضور نیتروژن در شکمبه برای افزایش بهره‌وری میکروبی، افزایش بازده و ساخت پروتئین میکروبی، کاهش قیمت جیره، افزایش هضم الیاف، افزایش جذب نیتروژن در شکمبه، کاهش اتلاف نیتروژن آمونیاکی، کاهش خطر ابتلا به مسمومیت و بهبود خوش-خوراکی جیره را نام برد (Kertz, 2010). مطالعات محدودی در ارتباط با اثر استفاده از بیورت در نشخوارکنندگان انجام شده است. مطابق با نتایج تحقیق حاضر، در پژوهشی، مکمل کردن جیره گوساله گوشتی با بیورت سبب بهبود هضم و تخمیر و افزایش تولید پروتئین میکروبی در مقایسه با تیمار شاهد یا تیمار مکمل شده با اوره شد (Currier *et al.*, 2004). تحقیقات دیگری نیز نشان داده‌اند که استفاده از اوره آهسته‌رشد در جیره نشخوارکنندگان بدون تأثیر بر مصرف خوراک سبب بهبود ضریب تبدیل خوراک شده است (Golombeski *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2015). اخیراً در پژوهشی، افزودن اوره آهسته‌رشد (جیره پایه به‌علاوه ۱۰۰ گرم اوره آهسته‌رشد و ۴۰۰ گرم سیلاژ ذرت) به‌جای کنجاله سویا (جیره پایه به‌علاوه ۵۰۰ گرم کنجاله سویا) در جیره گاو شیری سبب افزایش تولید شیر (۷/۳۶ درصد) شد (Jiang *et al.*, 2023). منابع اوره آهسته‌رشد ممکن است بدون تأثیر بر مصرف خوراک، بازده تولیدی نشخوارکنندگان را از راه بهبود در سوخت و ساز شکمبه‌ای نیتروژن افزایش دهند، به‌طوری که در مطالعه‌ای مشخص شد با مکمل کردن جیره گاوهای شیری با اوره آهسته‌رشد، مصرف ماده خشک کاهش یافت، اما تولید شیر و بازده تولید بهبود یافت (Neal *et al.*, 2014). برخلاف نتایج تحقیق حاضر، (Mashayekhi *et al.*, 2019) نشان داد که ماده خشک مصرفی، افزایش وزن روزانه، ضریب تبدیل خوراک و وزن نهایی پروار و خصوصیات کمی و کیفی لاشه تحت تأثیر کاربرد اوره آهسته‌رشد به‌جای اوره معمولی قرار نگرفت. همچنین، استفاده از اوره در جیره گوساله پرواری منجر به بهبود عملکرد رشد نسبت به اوره آهسته‌رشد شد (Taylor-Edwards *et al.*, 2009). در پژوهشی، اثر دفعات مختلف خوراک‌دهی یک تا چهار بار در روز بر عملکرد رشد و مصرف خوراک بره‌های پرواری مورد بررسی قرار گرفت (Saldanha *et al.*, 2021). نتایج مطالعه مذکور نشان داد که عملکرد رشد و مصرف مواد مغذی تحت تأثیر تعداد دفعات خوراک‌دهی قرار نگرفت که نتایج

جدول ۳- اثر نوع منبع نیتروژن غیر پروتئینی (NPN) و تعداد نوبت خوراک‌دهی بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه بره‌های پرواری

Table 3. Effect of NPN source and feeding frequency on rumen fermentation parameters of fattening lambs

NPN source	Urea		Bioret		SEM	P-value		
	Twice a day	Three times a day	Twice a day	Three times a day		NPN source	Feeding frequency	NPN source × Feeding frequency
Before morning feeding								
pH	7.4	7.22	7.18	7.42	0.188	0.67	0.79	0.44
Ammonia-N (mg/dl)	16.7	16.2	16.1	15.9	0.551	0.42	0.47	0.73
Total VFA (mmol/L)	92.3	93.4	94.4	96.1	2.41	0.34	0.59	0.88
Acetate (mmol/L)	58.9	59.8	59.6	60.8	2.08	0.69	0.63	0.94
Propionate (mmol/L)	19.2	18.9	19.4	20.9	0.768	0.18	0.47	0.35
Butyrate (mmol/L)	10.5	10.7	11.4	11.3	0.849	0.38	0.97	0.84
Valerate (mmol/L)	1.43	1.48	1.39	1.45	0.084	0.67	0.55	0.86
Iso-valerate (mmol/L)	1.16	1.11	1.12	1.22	0.050	0.52	0.59	0.25
Acetate:propionate	3.07	3.19	3.08	2.92	0.136	0.32	0.90	0.33
Three hours after morning feeding								
pH	6.42	6.45	6.65	6.81	0.143	0.13	0.26	0.42
Ammonia-N (mg/dL)	18.7	18.1	16.9	16.4	0.686	0.03	0.43	0.92
Total VFA (mmol/L)	97.1	103	102	108	2.35	0.04	0.02	0.96
Acetate (mmol/L)	61.9	64.1	63.9	68.1	2.03	0.04	0.04	0.62
Propionate (mmol/L)	20.7	20.6	21.1	22.1	1.42	0.52	0.72	0.71
Butyrate (mmol/L)	11.2	11.7	12.1	12.3	1.06	0.48	0.79	0.87
Valerate (mmol/L)	1.46	1.55	1.46	1.58	0.104	0.88	0.34	0.90
Iso-valerate (mmol/L)	1.26	1.16	1.16	1.29	0.061	0.78	0.75	0.14
Acetate:propionate	3.05	3.15	3.08	3.09	0.218	0.60	0.82	0.71
Six hours after morning feeding								
pH	6.88	7.05	6.95	7.10	0.153	0.70	0.32	0.93
Ammonia-N (mg/dL)	18.1	17.7	16.7	16.2	0.550	0.02	0.42	0.83
Total VFA (mmol/L)	98.1	98.5	99.6	102	3.46	0.51	0.72	0.82
Acetate (mmol/L)	62.6	63.3	63.1	64.3	2.63	0.74	0.72	0.82
Propionate (mmol/L)	20.4	20.4	20.8	21.9	1.16	0.44	0.66	0.65
Butyrate (mmol/L)	11.2	11.1	11.9	11.8	0.918	0.49	0.85	0.88
Valerate (mmol/L)	1.51	1.48	1.58	1.50	0.076	0.55	0.47	0.71
Iso-valerate (mmol/L)	1.16	1.11	1.09	1.17	0.056	0.94	0.66	0.27
Acetate:propionate	3.09	3.15	3.07	2.94	0.213	0.61	0.86	0.67

اپتیزن بود (Talebian Masoudi *et al.*, 2016)، که نتایج پژوهش حاضر را تأیید می‌کند. هرچند، مکمل کردن جیره گاوهای شیری با اوره آهسته‌رهش در مقایسه با کنجاله سویا تأثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه

همچنین، نتایج مطالعه‌ای نشان داد که غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه دام‌های تغذیه شده با اوره در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری، بیشتر از دام‌های تغذیه شده با جیره حاوی منابع آهسته‌رهش ایزوبوتیرال‌دئید منو اوره و

آهسته‌رهش نسبت به دوره معمولی، کمتر بود که این مخالف با نتایج تحقیق حاضر است. بسیاری از مطالعات قبلی نشان داده‌اند که استفاده از مکمل دوره آهسته‌رهش در مقایسه با دوره معمولی تأثیری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار و نسبت مولی آن‌ها ندارد (Golombeski *et al.*, 2006; Taylor Edwards *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2010; Gardinal *et al.*, 2017). در مطالعه دیگری نیز غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه تحت تأثیر جیره‌های حاوی دوره آهسته‌رهش (اوره کلسیمی) و دوره معمولی قرار نگرفت، اما نسبت پروپیونات، تحت تأثیر دوره آهسته‌رهش افزایش یافت (Chegeni *et al.*, 2013). غلظت کل اسیدهای چرب فرار و استات شکمبه در زمان سه ساعت پس از خوراک‌دهی در دام‌های دو بار تغذیه شده در روز در مقایسه با سه بار افزایش یافت ($P < 0.05$). هرچند، در سایر زمان‌های مورد بررسی، هیچ یک از فراسنجه‌های شکمبه‌ای تحت تأثیر قرار نگرفت ($P > 0.05$). این افزایش به وسیله آثار مثبت افزایش تعداد وعده خوراک‌دهی روزانه بر مصرف ماده خشک صورت نگرفت، زیرا در مطالعه حاضر، مصرف خوراک تحت تأثیر دفعات خوراک‌دهی قرار نگرفت (جدول ۲). دلیل این بهبود احتمالاً آثار مثبت افزایش دفعات خوراک‌دهی بر ثبات pH شکمبه بوده است زیرا نشان داده شده است که افزایش دفعات خوراک‌دهی روزانه سبب جلوگیری از کاهش pH شکمبه می‌شود و از راه پایداری pH شکمبه و کاهش نوسانات آن، سبب بهبود تخمیر شکمبه شده است (Soto *et al.*, 2000). در آزمایشی، افزایش تعداد وعده خوراک‌دهی روزانه از دو به شش بار در گاوهای شیری سبب افزایش pH شکمبه شد (French *et al.*, 1990). این در حالی است که افزایش دفعات خوراک‌دهی روزانه در نشخوارکنندگان ممکن است از راه کاهش مقدار مصرف NDF در هر وعده غذایی، سبب کاهش میزان نشخوار و ظرفیت بافری شکمبه شود و به دنبال آن، pH شکمبه کاهش یابد (Rodrigo *et al.*, 2021).

فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی شکمبه: همان‌طوری که در جدول ۴ نشان داده شده است هیچ یک از صفات مربوط به فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه در تمامی زمان‌های مورد بررسی تحت تأثیر اثر متقابل نوع منبع NPN و تعداد دفعات خوراک‌دهی قرار نگرفت ($P > 0.05$). فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز در زمان صفر، سه و شش ساعت پس از خوراک‌دهی در بره‌های

نداشت (Jiang *et al.*, 2023). کاهش غلظت آمونیاک مایع شکمبه نشان‌دهنده استفاده از این منبع نیتروژنه جهت تولید پروتئین میکروبی است (Chamberlain *et al.*, 1993)، که احتمالاً در تحقیق حاضر نیز با تغذیه بیورت اتفاق افتاده است. کاهش غلظت آمونیاک مایع شکمبه با تغذیه دوره آهسته‌رهش نسبت به دوره احتمالاً به دلیل کاهش فعالیت پروتئازی شکمبه باشد (Azizi *et al.*, 2019). مطالعات دیگری نشان داده‌اند که تغذیه دوره کند تجزیه سبب کاهش غلظت آمونیاک مایع شکمبه در مقایسه با دوره شده است (Taylor-Edwards *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2011). هرچند، در گزارشی، میزان آمونیاک مایع شکمبه گاوهای تغذیه شده با دوره پوشش‌دار کاهش یافت که احتمالاً به دلیل تغییر در جمعیت گونه‌های میکروبی شکمبه بوده است که منجر به تغییر در الگوی اسیدهای چرب مایع شکمبه شده است (Russell *et al.*, 2009). در مطالعات گذشته، همبستگی مثبتی بین غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH شکمبه گزارش شده است، به این صورت که افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی خود سبب افزایش pH شکمبه می‌شود (Cherdthong and Wanapat, 2010). به هر حال، در مطالعه حاضر، این همبستگی مشاهده نشد. غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه، استات، پروپیونات، بوتیرات، والرات، ایزوالرات و نسبت استات به پروپیونات مایع در زمان صفر و شش ساعت پس از خوراک‌دهی تحت تأثیر نوع منبع NPN و تعداد وعده خوراک‌دهی قرار نگرفت ($P > 0.05$), اما در زمان سه ساعت پس از خوراک‌دهی، غلظت کل اسیدهای چرب فرار و استات تحت تأثیر منبع NPN و تعداد وعده خوراک‌دهی قرار گرفت ($P < 0.05$), به طوری که جیره حاوی بیورت در مقایسه با جیره حاوی اوره و نیز سه بار خوراک‌دهی در روز در مقایسه با دو بار در روز سبب افزایش صفات مذکور شد. مطابق با نتایج حاضر، در پژوهشی، مکمل کردن جیره گاوهای شیری با اوره آهسته‌رهش در مقایسه با کنجاله سویا سبب افزایش غلظت استات شکمبه شد (Jiang *et al.*, 2023). همچنین، Mashayekhi *et al.* (2019) نشان دادند که غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه در جیره‌های حاوی اوره آهسته‌رهش نسبت به جیره شاهد و نیز نسبت به جیره حاوی اوره معمولی افزایش یافت. هرچند، در مطالعه آن‌ها، غلظت استات در جیره‌های حاوی منابع NPN نسبت به جیره شاهد و در جیره حاوی اوره

گوسفند سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های الیافولایتیک شکمبه و افزایش تولید پروتئین میکروبی شد (Azizi-Shotorkhoh et al., 2012).

تجزیه بیش از حد پروتئین جیره یک فرآیند ناکارآمد است، زیرا باعث تجزیه اسیدهای آمینه به آمونیاک و سایر محصولات نیتروژنه در شکمبه می‌شود. نشان داده شده است که حدود ۷۰ درصد پروتئین جیره‌ای به وسیله فعالیت مخلوط پروتئازها و پپتیدازهای میکروبی شکمبه تجزیه می‌شود (Selinger et al., 1996). در مطالعه حاضر، کاهش فعالیت پروتئازی میکروب‌های شکمبه در بره‌های تغذیه شده با بیورت در مقایسه با اوره در همه زمان‌های نمونه‌گیری (جدول ۴) ممکن است نشان‌دهنده مقاومت بیورت به تجزیه میکروبی در شکمبه بوده باشد که با تجزیه کندتر، احتمالاً سبب افزایش دسترسی باکتری‌ها به آمونیاک به‌عنوان مهم‌ترین منبع نیتروژنه برای رشد شده است و از این راه، میکروب‌های شکمبه، فعالیت پروتئازی خود را روی سایر منابع پروتئینی شکمبه کاهش داده‌اند. افزایش غلظت کل اسیدهای چرب فرار و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه (جدول ۳) می‌تواند تأیید کننده آثار مثبت تغذیه بیورت در مقایسه با اوره باشد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که آثار متقابل بین نوع منبع نیتروژن غیر پروتئینه و تعداد وعده خوراک‌دهی روزانه تأثیری بر صفات مورد بررسی نداشت. استفاده از بیورت به‌عنوان یک منبع اوره آهسته‌رشد نسبت به اوره تجاری در جیره حاوی پروتئین زیاد سبب بهبود عملکرد رشد، فراسنجه‌های تخمیر و فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک شکمبه بره‌های پرواری شد. کاربرد سطوح بیشتر بیورت و تعیین سطح بهینه آن در جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروتئین نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام پژوهش حاضر، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تغذیه شده با بیورت به‌طور معنی‌داری بیشتر از بره‌های مصرف‌کننده اوره بود ($P < 0.05$). آنزیم مذکور در زمان قبل و شش ساعت پس از خوراک‌دهی تحت تأثیر تعداد وعده خوراک‌دهی قرار نگرفت ($P > 0.05$), اما در سه ساعت پس از خوراک‌دهی، تغذیه سه بار در روز باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آن در مقایسه با تغذیه دو بار در روز شد ($P < 0.05$). فعالیت تجزیه کاغذ صافی در زمان صفر تحت تأثیر نوع منبع NPN و تعداد دفعات خوراک‌دهی قرار نگرفت، اما در سه و شش ساعت پس از خوراک‌دهی در بره‌های تغذیه شده با بیورت به‌طور معنی‌داری بیشتر از بره‌های مصرف‌کننده اوره بود ($P < 0.05$). اثر منبع NPN بر فعالیت تجزیه کاغذ صافی در سه و شش ساعت پس از خوراک‌دهی معنی‌دار بود ($P < 0.05$), اما تعداد وعده خوراک‌دهی، تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم مذکور نداشت ($P > 0.05$). فعالیت آنزیم‌های میکروکریستالین سلولاز و آلفا آمیلاز در زمان صفر، سه و شش ساعت پس از خوراک‌دهی تحت تأثیر نوع منبع NPN و تعداد وعده خوراک‌دهی قرار نگرفت ($P > 0.05$). فعالیت آنزیم پروتئازی شکمبه در زمان صفر، سه و شش ساعت پس از خوراک‌دهی در بره‌های تغذیه شده با اوره به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه تغذیه شده با بیورت بود ($P < 0.05$). هرچند، در همه زمان‌های مورد بررسی، فعالیت این آنزیم تحت تأثیر تعداد وعده خوراک‌دهی قرار نگرفت ($P > 0.05$). فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه، انعکاس کیفی از میکروب‌های دخیل در هضم و تخمیر مواد خوراکی است (Raghuvansi et al., 2007; Kamra et al., 2010). در ارتباط با اثر نوع منبع NPN بر فعالیت آنزیم‌های میکروبی شکمبه، مطالعات اندکی صورت گرفته است. در مطالعه حاضر، بهبود فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده الیاف شامل کربوکسی متیل سلولاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی با تغذیه بیورت در مقایسه با اوره احتمالاً به خاطر نرخ تجزیه کندتر بیورت بوده است که در طول زمان همواره آمونیاک را به‌عنوان یک منبع مهم نیتروژنه در اختیار باکتری‌های الیافولایتیک شکمبه قرار می‌دهد. موافق با این نتایج، در یک مطالعه، همزمانی بین آزادسازی نیتروژن کود مرعی به‌عنوان یک منبع NPN (عمدتاً شامل اسید اوریک) با منابع سهل‌الهضم انرژی در جیره غذایی

جدول ۴- اثر نوع منبع نیتروژن غیر پروتئینی (NPN) و تعداد نوبت خوراک‌دهی بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی شکمبه (واحد در ساعت در میلی‌لیتر مایع شکمبه) بره‌های پرواری

Table 4. Effect of NPN source and feeding frequency on activity of rumen microbial hydrolytic enzymes (units per hour per mL of rumen fluid) of fattening lambs

NPN source	Urea		Bioret		SEM	P-value		
	Twice a day	Three times a day	Twice a day	Three times a day		NPN source	Feeding frequency	NPN × source Feeding frequency
Before morning feeding								
Carboxymethylcellulase	41.1	43.3	45.2	49.7	1.54	0.01	0.09	0.54
Microcrystalline cellulase	10.9	10.6	10.9	11.1	0.551	0.79	0.82	0.62
Filter paper degrading activity	32.7	33.9	34.1	34.4	2.09	0.66	0.73	0.82
Alpha amylase	61.1	61.6	61.9	61.8	1.73	0.77	0.88	0.82
Protease (μg/mL/h)	112	110	108	106	1.86	0.04	0.40	0.77
Three hours after morning feeding								
Carboxymethylcellulase	45.2	47.1	49.1	56.3	1.34	0.01	0.02	0.16
Microcrystalline cellulase	12.9	13.1	13.2	13.5	1.01	0.74	0.76	0.97
Filter paper degrading activity	34.5	36.2	38.9	42.3	1.97	0.03	0.31	0.52
Alpha amylase	67.9	68.8	71.3	73.2	2.43	0.13	0.56	0.82
Protease (μg/mL/h)	120	117	111	109	2.53	0.01	0.34	0.92
Six hours after morning feeding								
Carboxymethylcellulase	44.2	45.8	46.9	48.8	0.745	0.01	0.19	0.15
Microcrystalline cellulase	12.3	12.1	12.7	12.5	0.860	0.74	0.76	0.93
Filter paper degrading activity	33.9	34.5	36.9	37.3	1.40	0.03	0.30	0.52
Alpha amylase	65.9	66.8	68.8	69.1	1.90	0.13	0.56	0.72
Protease (μg/mL/h)	116	115	111	107	2.59	0.02	0.34	0.92

فهرست منابع

- Agarwal, N. (2000). Estimation of fiber degrading enzyme (Ed). Feed microbiology. Izatnagar (India), CAS Animal Nutrition. Pp. 278-291.
- Association of Official Analytical (AOAC.) (1990). Official Methods of Analysis, Edited by Kenneth Helrich, 15th edition. USA.
- Azizi, A., Sharifi, A., & Fazaeli, H. (2019). Effect of one produced slow-release urea component on gas production, fermentation, nutrient disappearance and activity of microbial enzymes using rumen liquor of sheep. *Animal Science Journal*, 122, 279-290. doi: 10.22092/asj.2018.121403.1675 [In Persian]
- Azizi-Shotorkhoft, A., Rouzbehan, Y., & Fazaeli, H. (2012). The influence of the different carbohydrate sources on utilization efficiency of processed broiler litter in sheep. *Livestock Science*, 148, 249-254. doi: 10.1016/j.livsci.2012.06.014
- Azizi-Shotorkhoft, A., Sharifi, A., Azarfar, A., & Kiani, A. (2018). 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(1), 50-54. doi: 10.1080/09712119.2016.1258363
- Bao, L., Huang, Q., Chang, L., Zhou, J., & Lu, H. (2011). Screening and characterization of a cellulase with endocellulase and exocellulase activity from Yak rumen metagenome. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 73, 104-110. doi: 10.1016/j.molcatb.2011.08.006
- Broderick, G., & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, 63, 64-75. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8

- Calupa, W. (2007). Precision feeding of nitrogen to lactating dairy cows: a role for optigen II. In: Nutritional biotechnology in the feed industries: In: Proceedings of Alltech S 23rd Annual Symposium. The new energy crisis: food, feed or fuel? Alltech UK. Pp. 221-226.
- Chamberlain, D. G., Robertson, S., & Choung, J. J. (1993). Sugars versus starch as ruminal fermentation and the supply of microbial protein to the small intestine supplements to grass silage: effects on estimated from the urinary excretion of purine derivatives in sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63, 189-194. doi: 10.1002/jsfa.2740630204
- Chegeni, A., Li, Y. L. K., Deng, D. C., Jiang, G., & Diao, Q. Y. (2013). Effect of dietary polymer-coated urea and sodium bentonite on digestibility, rumen fermentation, and microbial protein yield in sheep fed high levels of corn stalk. *Livestock Science*, 157, 141-150. doi: 10.1016/j.livsci.2013.07.001
- Cherdthong, A., & Wanapat, M. (2010). Development of urea products as rumen slow-release feed for ruminant production: a review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(8), 2232-2241.
- Cherdthong, A., Wanapat, M., & Wachirapakorn, C. (2011). Effects of urea-calcium mixture in concentrate containing high cassava chip on feed intake, rumen fermentation and performance of lactating dairy cows fed on rice straw. *Livestock Science*, 136, 76-84. doi: 10.1016/j.livsci.2010.08.002
- Currier, T. A., Bohnert, D. W., Falck, S. J., Schauer, C. S., & Bartle, S. J. (2004). Daily and alternate-day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: II. Effects on site of digestion and microbial efficiency in steers. *Journal of Animal Science*, 82(5), 1518-1527. doi:10.2527/2004.8251518x
- French, N., & Kennelly, J. J. (1990). Effects of feeding frequency on ruminal parameters, plasma insulin, milk yield, and milk composition in holstein cows. *Journal Dairy Science*, 73, 1857-1863. doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)78866-2
- Gardinal, R., Calomeni, G. D., Cônsolo, N. R. B., Takiya, C. S., Freitas, J. E., Gandra, J. R., Vendramini, T. H. A., Souza, H. N., & Renno, F. P. (2017). Influence of polymer-coated slow-release urea on total tract apparent digestibility, ruminal fermentation and performance of Nellore steers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30, 34-41. doi: 10.5713/ajas.16.0058
- Ghanbari, E., Seifdavati, J., Yalchi, T., Seyed Sharifi, R., & Abdi BinMar, H. (2019). The effect of replacement of slow-releas non-protein nitrogen source (Nitrosa) by urea on microbial protein synthesis in sheep. In: Proceedings of the 2th International Conference and the 6th National Conference on Organic and Conventional Agriculture, Aug 2019, Ardabil, Iran [In Persian]
- Ghorbani, B., Taymoori-yanesari, A., & Jafari-Sayyadi, A. (2016). Effects of replacement of sesame meal with soy bean meal on intake, digestibility, rumen characteristics, chewing activity, performance, and carcass composition of lambs. *Journal of Ruminant Research*, 4(2), 145-170. doi: 10.22069/ejrr.2016.3233 [In Persian]
- Golombeski, G. L., Kalscheur, K., Hippen, A., & Schingoethe, D. (2006). Slow-release urea and highly fermentable sugars in diets fed to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(11), 4395-403. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72486-9
- Gustavo, D. C., Rodrigo, G., Beatriz, C. V., José Esler, F. J., Thiago, H. A. V., Caio, S. T., Heraldo Namorato, D. S., & Francisco, P. R. (2015). Effects of polymer-coated slow-release urea on performance, ruminal fermentation, and blood metabolites in dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 44(9), 327-334. doi: 10.1590/S1806-92902015000900004
- Jawandel Kurabaslu, A., Tahmasebi, R., & Dayani, A. (2013). The effect of using sulphurous urea on digestibility, blood parameters and rumen fermentation in goats. *Journal of Iranian Animal Science Research*, 5(2), 164-172. doi: 10.22067/ijasr.v5i2.28297 [In Persian]
- Jiang, M., Zhang, X., Wang, K., Datsomor, O., Li, X., Lin, M., Feng, C., Zhao, G., & Zhan, K. (2023). Effect of slow-release urea partial replacement of soybean meal on lactation performance, heat shock signal molecules, and rumen fermentation in heat-stressed mid-lactation dairy cows. *Animal*, 13(17), 2771. doi: 10.3390/ani13172771
- Jinjia, Z., Ao, R., Jinzhen, J., Weijun, S., Lingyuan, Y., Chuanshe, Z., & Zhiliang, T. (2022). Effects of non-protein nitrogen sources on *in vitro* rumen fermentation characteristics and microbial diversity. *Animal Science*, 3, 891898. doi: 10.3389/anim.2022.891898
- Kamra, D. N., Agarwal, N., & McAllister, T. A. (2010). Screening for compounds enhancing fiber degradation. In: Vercoe, P. E., Makkar, H. P. S., & Schlink, A. C., editors. In: *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies, Chapter 6. Dordrecht (the Netherlands): IAEA; Pp. 87-107.
- Kertz, A. F. (2010). Review: urea feeding to dairy cattle: a historical perspective and review. *The Professional Animal Scientist*, 26(3), 257-272. doi: 10.15232/S1080-7446(15)30593-3
- Keskin, M., Gül, S., Sahin, A., Kaya, S., Duru, M., Görgülü, Ö., & Biçer, S. (2007). Effects of feed refreshing frequency on growth and carcass characteristics of Awassi lambs. *South African Journal of Animal Science*, 37(4), 248-255. doi: 10.4314/sajas.v37i4.4097

- Keskin, M., Şahin, A., Biçer, O., & Gül, S. (2004). Comparison of the behaviour of Awassi lambs in cafeteria feeding system with single diet feeding system. *Applied Animal Behaviour Science*, 85, 57-64. doi: 10.1016/j.applanim.2003.09.002
- Khan, M. I., Ahmed, S., Rahman, A., Ahmad, F., Khaliq, A., Nisar, A., Qadir, Z., Umar, S., Ullah, S., & Azam, B. E. (2015). Comparative efficacy of urea and slow-release non-protein nitrogen on performance of Nili-Ravi buffalo calves. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(4), 1097-1102. doi: 0030-9923/2015/0004-1097
- 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. doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6
- Mashayekhi, M., Sari, M., Erfani-Majd, N., & Rezaei, M. (2019). Effects of dietary slow release urea and molasses on growth performance, digestibility, ruminal fermentation and carcass traits of fattening lamb. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 11(3), 273-291. doi: 10.22067/ijasr.v11i3.70840 [In Persian]
- Miller, J. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426-429. doi: 10.1021/ac60147a030
- Mohammed, M. M., Saleh, H. H., & Mahmood A. B. (2018). Effect of feeding frequency on some growth performance, some carcass characteristics and chemical meat composition. JZS Special Issue, 2nd International Conference of Agricultural Sciences.
- Mousavi, S. A. K., Teimori Yansari, A., Dirandeh, E., & Irajian, G. H. (2019). Effects of different levels of replacement of slow-release urea with soybean meal on feed intake, blood parameters and performance of holstein lactating cows in early lactation. *Journal of Veterinary Research*, 74(4), 438-448. doi: 10.22059/jvr.2017.234213.2634 [In Persian]
- National Research council (NRC). (2007). Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington (DC, USA): National Academy of Sciences.
- Neal, K., Eun, J. S., Young, A., Mjoun, K., & Hall, J. (2014). Feeding protein supplements in alfalfa hay-based lactation diets improves nutrient utilization, lactational performance, and feed efficiency of dairy cows. *Journal Dairy Science*, 97(12), 7716-7728. doi: 10.3168/jds.2014-8033
- Nooriyan Soroor, E., Rouzbehan, Y., & Alipour, D. (2013). Effect of *Echium amoenum* extract on the growth rate and fermentation parameters of Mehraban lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 184, 49-57. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2013.06.002
- Ntiranyibagira, E., Niteen, V. P., Shekbar, R. B., Lateef, A., Xu, K., & Liu, H. (2015). Effect of different levels of urea supplementation on nutrient intake and growth performance in growing camels fed roughage based complete pellet diets. *Animal Nutrition*, 1, 356-361. doi: 10.1016/j.aninu.2015.12.004
- Olafadehan, O. A., Adewumi, M. K., & Fakolade, P. O. (2014). Effect of replacement of soybean meal with urea or urea supplemented with sulphur on the performance of lambs. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 1(4), 180-185. doi: 10.3390/ani9110974
- Park, D. R., Kim, H., Jung, J. C., Shin, M. S., Han, S. J., & Song, I. K. (2009). Catalytic conversion of urea to biuret: A catalyst screening study. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26, 990-993.
- Raghuvansi, S. K. S., Prasad, R., Tripathi, M. K., Mishra, A. S., Chaturvedi, O. H., Misra, A. K., Saraswat, B. L., & Jakhmola, R. C. (2007). Effect of complete feed blocks or grazing and supplementation of lambs on performance, nutrient utilisation, rumen fermentation and rumen microbial enzymes. *Animal*, 1, 221-226. doi: 10.1017/S1751731107284058
- Ribeiro, E., Mizubuti, I., Silva, L. D. D. F., Paiva, F., Sousa, C., & Castro, F. (2011). Desempenho, comportamento ingestivo e características de carcaça de cordeiros confinados submetidos a diferentes frequências de alimentação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 892-898.
- Saldanha, R. B., dos Stantos, A. C. P., Alba, H. D. R., Rodrigues, C. S., Pina, D. D. S., Cirne, L. G. A., Santos, S. A., Pires, A. J. V., Silva, R. R., Tosto, M. S. L., Bento, S. C., Grimaldi, A. B., Backer, C. A., & Carvalho, G. P. (2021). Effect of feeding frequency on intake, digestibility, ingestive, behavior, performance, carcass characteristics and meat quality of male feedlot lambs. *Agriculture*, 11(8), 776. doi: 10.3390/agriculture11080776
- Rozanski, S., Vivian, D. R., Kowalski, L. H., Prado, O. R., Fernandes, S. R., de Souza, J. C., & de Freitas, J. A. (2017). Carcass and meat traits, and non-carcass components of lambs fed ration containing increasing levels of urea. *Ciências Agrárias, Londrina*, 38(3), 1587-1604. doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n3p1577
- Russell, J. B., Muck, R. E., & Weimer, P. J. (2009). Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *FEMS Microbiology and Ecology*, 67, 183-197. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00633.x
- Saro, C., Mateo, J., Andres, S., Mateos, I., Ranilla, M. J., Lopez, S., Martin, A., & Giranldez, J. (2019). Replacing soybean meal with urea in diets for heavy fattening lambs: Effects on growth, metabolic profile and meat quality. *Animal*, 9(11), 974. doi: 10.3390/ani9110974
- Selinger, L. B., Forsberg, C. W., & Cheng, K. J. (1996). The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*, 2, 263-284. doi: 10.1006/anae.1996.0036

- Shabi, Z., Bruckental, I., Zamwell, S., Tagari, H., & Arieli, A. (1999). Effects of the synchronization of the degradation of dietary crude protein and organic matter and feeding frequency on ruminal fermentation, nutrient digestibility and milk yield and composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82, 1252-1260. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75773-X
- Soto-Navarro, S. A., Krehbiel, C. R., Duff, G. C., Galyean, M. L., Brown, M. S., & Steiner, R. L. (2000). Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limit-fed steers. *Journal of Animal Science*, 78, 2215-2222. doi: 10.2527/2000.7882215x
- Sutton, J. D., Broster, W. H., Napper, D. J., & Siviter, J. W. (1985). Feeding frequency for lactating cows: effects on digestion, milk production and energy utilization. *British Journal of Nutrition*, 53, 117-130. doi: 10.1079/bjn19850016
- Talebian Masoudi, A. R., Moeini, M. M., Souri, M., Mansouri, H., & Abdoli Senejani M. (2016). Survey of effect of slow-release non-protein nitrogen components, isobutyraldehyde mono urea and optigen on ruminal parameters and nutrient digestibility in sheep. *Journal of Ruminant Research*, 4(2), 23-43. doi: 10.22069/ejrr.2016.3226 [In Persian]
- Taylor-Edwards, C. C., Hibbard, G., Kitts, S. E., McLeod, K. R., Axe, D. E., Vanzant, E. S., Kristensen, N. B., & Harmon, D. L. (2009). Effects of slow-release urea on ruminal digesta characteristics and growth performance in beef steers. *Journal of Animal Science*, 87, 200-208. doi: 10.2527/jas.2008-0912
- Tohidi, A., Zali, A., Khosh Sokhan, A., & Zhandi, M. (2010). Effect of feeding frequency on carcass quality and plasma concentration of leptin and insulin hormones in fattening calves. *Journal of Veterinary Research*, 65(3), 203-209. [In Persian]
- Van Soest, P. J. (1982). *Nutritional ecology of the ruminant*. Corvallis, OR, USA: Cornell University Press, Pp. 253-280.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & 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. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- Van-Keulen, J., & Young, B. A. (1977). Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science*, 44, 282-289. doi: 10.2527/jas1977.442282x
- Wang, B., Cheng-Gang, J., Shou-kun, J., Li-Wen, W., Jian, D., Bing-wen, S., Yan, T., Nai-Feng, Z., & Qi-Yu, D. (2014). Effects of different levels of urea in diets on haematological indices, serological parameters parameters and tissue lesions in mutton sheep. *Acta Veterinariae Zootechnica Sinica*, 45(9), 1449-1456. doi: 10.11843/j.issn.0366-6964.2014.09.010
- Xin, H. S., Schaefer, D. M., Liu, Q. P., Axe, D. E., & Meng, Q. X. (2010). Effects of polyurethane coated urea supplement on in vitro ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating performance of Holstein dairy cows fed a steam-flaked corn-based diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 23, 491-500. doi: 10.1079/bjn19850016
- Xu, Y., Li, Z., Moraes, L. E., Shen, J., Yu, Z., & Zhu, W. (2019). Effects of incremental urea supplementation on rumen fermentation, nutrient digestion, plasma metabolites, and growth performance in fattening lambs. *Animal*, 9(9), 652. doi: 10.3390/ani9090652
- Zahmatkesh, D., & Jahani-Moghadam, M. (2018). Partial replacement of soybean meal with slow releasing non protein nitrogen source in dairy cows: performance and economic implications. *Animal Science Journal*, 117, 203-214. doi: 10.22092/asj.2017.109965.1426 [In Persian]