

***In vitro* investigation of the effects of supplementing dairy cow diet with lysine, methionine and their calcium analogs on digestibility, microbial enzymes activities and ruminal fermentation parameters**

Neda Rashidi¹, Amir Fadayifar^{2*}, Ayob Azizi², Ali Kiani³

¹ M.Sc., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran, Email: Fadayifar.amir@gmail.com

² Assistant Professor, and ³Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Article Info

Article type:

Research Full Paper

Article history:

Received:

Revised:

Accepted:

Keywords:

Dairy cow
Lysine hydrochloride
Protected amino acid
Rumen
Methionine

ABSTRACT

Introduction: Today, balancing the diet based on amino acids instead of protein is quickly becoming a standard method in dairy cattle nutrition. Feeding high levels of dietary protein and protein breakdown in the rumen increases ammonia concentration, which reduce the efficiency of nitrogen utilization for milk production. Therefore, by balancing the diets of dairy cows to provide limited amino acids, it is possible to improve the production response to low-protein diets without increasing urinary nitrogen excretion. Based on existing research, methionine and lysine amino acids are two limited amino acids in diet of dairy cows, which is mostly due to their low concentration in the diet compared to their concentration in milk and microbial protein. Balancing the amino acids methionine and lysine causes different responses in amount of dry matter intake, milk production and the amount and percentage of milk protein in diet of dairy cows with low levels of crude protein, so that providing these amino acids without excreting more than Nitrogen limit to the environment improves milk production. Also reported that the addition of unprotected methionine increased organic matter digestibility in diets based on corn silage. However, it has been reported that the addition of methionine in the form of DL-methionine or the hydroxybutanoic acid analog of methionine in diets with adequate sulfur concentration has no effect on *in vitro* rumen fermentation. Ruminal microorganisms are able to use amino acids that have free carboxyl and amine groups, calcium analog of lysine and methionine has been proposed as a chemical method to protect lysine and methionine from degradation in the rumen.

Material and methods: The present study was conducted in the supplementary animal nutrition laboratory and animal husbandry station at Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University. Two cows equipped with rumen fistula were used to prepare rumen fluid. In order to investigate the use of lysine and methionine supplements and their calcium analogues on *in vitro* parameters of gas production, fermentation and rumen enzyme activity. A completely randomized experiment was conducted with 7 treatments, 12 repetitions and in 3 separate period of time with the following treatments including 1) control diet, 2) control diet + 0.30% lysine (lysine hydrochloride), 3) control diet + 0.30% lysine (lysine analog), 4) control diet + 0.30% methionine (DL methionine), 5) control diet + 0.30% methionine (methionine analog), 6) control diet + 0.30% methionine (methionine analog) + 0.30% lysine (lysine analog) and 7) control diet + 0.3% It was methionine (DL-methionine) + 0.3% lysine (lysine hydrochloride). A hypothetical ration of a dairy cow with an average production of 40 liters of milk per day was adjusted using NRC 2001 software and the effect of adding lysine and methionine and their calcium analogues to the ration was investigated. NIRS device was used to determine crude protein, crude fat, ash and insoluble fibers in neutral detergent of food ration. Calcium analogs of lysine and methionine were obtained from Ayandeh negar Zagros Company. All diets were incubated for 96 hours and gas production was recorded at 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours.

Results and discussion: The highest gas production in 16 hours after incubation was related to lysine hydrochloride treatment ($P<0.05$). Digestibility of organic matter, metabolizable energy and concentration of volatile fatty acids were higher in the lysine hydrochloride treatment compared to the control treatment ($P<0.05$). Ammonia concentration in the treatments receiving calcium analogue of lysine or methionine was similar to the control treatment, but adding lysine hydrochloride and DL-methionine to the control diet significantly increased the ammonia concentration ($P<0.05$). The activity of microbial enzymes was not affected by the treatments. A few research was reported on the effects of lysine and methionine and their protected form on *in vitro* gas production parameters. Regarding the use of calcium analogues of lysine and methionine amino acids compared to the control treatment, no difference was observed in cumulative gas production, which shows that calcium analogues of amino acids in the diet of dairy cows are less metabolized by rumen microorganisms compared to their free form. In contrast to the results of the present research, the addition of protected amino acids lysine and methionine to the diet of dairy cows increased the digestibility of organic matter. The reasons for the difference between the results of this research and the other studies may be related to the difference in the basic diet used, the *in vitro* test compared to the *in vivo* test, and the difference in the type of analog amino acid. There is not much information about the effects of lysine and methionine and their calcium analogues on the activity of rumen hydrolytic enzymes. Ruminant microorganisms need different sources of nitrogen in the rumen for their growth and activity. Structural carbohydrate-degrading bacteria usually use ammonia as a preferred nitrogen substrate, while starch and protein-degrading bacteria prefer small peptides and amino acids, and when these resources are lacking, they turn to ammonia.

Conclusion: In general, the results of the present study showed that the highest cumulative gas production was related to the unprotected form of lysine hydrochloride and the lowest gas production was related to the unprotected form of DL-methionine. The use of lysine and methionine and their calcium analogs had no effect on dry matter digestibility, microbial protein synthesis, rumen pH, and rumen hydrolytic enzyme activity. Digestibility of organic matter, concentration of short-chain volatile fatty acids and metabolizable energy were higher only in the treatment receiving lysine hydrochloride compared to the control treatment. Unprotected lysine and methionine increased ammonia nitrogen concentration, but their analogs had no effect on ammonia nitrogen. In general, the results of the present research showed that the calcium analogue of lysine and methionine undergo changes in rumen fermentation parameters less than their free form.

Cite this article: Rashidi, N., Fadayifar, A., Azizi, A., Kiani, A. (2025). *In vitro* investigation of the effects of supplementing dairy cow diet with lysine, methionine and their calcium analogs on digestibility, microbial enzymes activities and ruminal fermentation parameters. *Journal of Ruminant Research*, 13(2), .



© The Author(s)

DOI:

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources



دانشگاه گیلان و مرکز پژوهش‌های منطقه‌ای گیلان

پژوهش در نشخوارکنندگان

شاپا چاپی: ۲۳۴۵-۴۲۶۱
شاپا الکترونیکی: ۲۳۴۵-۴۲۵۳

استفاده از لیزین و متیونین محافظت نشده و آنالوگ‌های کلسیمی آن‌ها در جیره گاوهای شیری بر گوارش‌پذیری، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی

ندا رشیدی^۱، امیر فدایی فر^{۲*}، ایوب عزیزی^۲، علی کیانی^۳

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان خرم آباد، خرم‌آباد، ایران، رایانامه: fadayifar.amir@gmail.com

^۲ استادیار و ^۳ دانشیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان خرم آباد

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله کامل علمی - پژوهشی

سابقه و هدف: تغذیه سطوح بالای پروتئین جیره و تجزیه پروتئین در شکمبه غلظت آمونیاک را افزایش می‌دهد که باعث کاهش بازده استفاده از نیتروژن برای تولید شیر می‌گردد. تغذیه بیش از حد پروتئین باعث تجمع نیتروژن در محیط زیست می‌شود. آمونیاک ایجادشده در اثر دفع اوره از طریق ادرار دام‌ها می‌تواند روی کیفیت خاک و آب اثرگذار باشد. یکی از ترکیبات مضر برای لایه ازن آمونیاک است. بنابراین با متوازن کردن جیره‌های غذایی گاوهای شیرده جهت تأمین اسیدهای آمینه محدودکننده می‌توان پاسخ تولیدی به جیره‌های کم پروتئین را بدون افزایش دفع ادراری نیتروژن بهبود بخشید. اسیدهای آمینه محدودکننده متیونین و لیزین دارای اثرات مثبت بر دام‌ها هستند. هدف از انجام این پژوهش مطالعه تأثیر مکمل کردن جیره گاو شیری با لیزین، متیونین و آنالوگ کلسیمی آن‌ها بر فراسنجه‌های تولید گاز، فعالیت آنزیم‌های میکروبی و تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی بود.

تاریخ دریافت:

تاریخ ویرایش:

تاریخ پذیرش:

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی استفاده از مکمل لیزین و متیونین و آنالوگ کلسیمی آن‌ها بر روی فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و فعالیت آنزیمی شکمبه در شرایط برون‌تنی (مایع شکمبه از ۲ رأس گاو شیری بومی نژاد لری مجهز به فیستولای شکمبه‌ای با وزن 320 ± 33 کیلوگرم شکم زایش دوم تهیه شد) در قالب طرح کاملاً تصادفی آزمایشی با ۷ تیمار، ۱۲ تکرار و در ۳ دوره مجزا با تیمارهای زیر انجام شد: (۱) جیره شاهد، (۲) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد لیزین (لیزین هیدروکلراید)، (۳) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد لیزین (آنالوگ لیزین)، (۴) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد متیونین (دی‌ال متیونین)، (۵) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد متیونین (آنالوگ متیونین)، (۶) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد متیونین (آنالوگ متیونین) + ۰/۳۰ درصد لیزین (آنالوگ لیزین) و (۷) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد متیونین (دی‌ال متیونین) + ۰/۳۰ درصد لیزین (لیزین هیدروکلراید) بود. همه جیره‌ها ۹۶ ساعت انکوبه شدند و گاز تولیدی در ساعت ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ثبت شد.

واژه‌های کلیدی:

اسیدآمینه محافظت شده

شکمبه

گاو شیری

لیزین هیدروکلراید

متیونین

یافته‌ها: بیشترین گاز تولیدی در ۱۶ ساعت پس از انکوباسیون، مربوط به تیمار دریافت‌کننده لیزین هیدروکلراید و کمترین گاز تولیدی مربوط به تیمار دریافت‌کننده دی‌ال متیونین بود

($P < 0.05$). همچنین روند مشابهی در سایر زمان‌ها و کل گاز تولیدی مشاهده شد ($P < 0.05$). گاز تولیدی در تمامی زمان‌ها در تیمار دریافت‌کننده آنالوگ کلسیمی لیزین و تیمار دریافت‌کننده آنالوگ کلسیمی لیزین بعلاوه آنالوگ کلسیمی متیونین تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد. قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و غلظت اسیدهای چرب فرار در تیمار لیزین هیدروکلراید نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود ($P < 0.05$). غلظت آمونیاک در تیمارهای دریافت‌کننده آنالوگ کلسیمی لیزین یا متیونین مشابه با تیمار شاهد بود، اما اضافه کردن لیزین هیدروکلراید و دی‌ال متیونین به جیره شاهد به طور معنی‌داری غلظت آمونیاک را افزایش داد ($P < 0.05$). فعالیت آنزیم‌های میکروبی تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت.

نتیجه‌گیری: استفاده از آنالوگ کلسیمی لیزین و متیونین می‌تواند روشی امیدوارکننده برای بهبود محدودیت اسیدهای آمینه (لیزین و متیونین) در تغذیه گاو شیری بدون هر گونه اثر منفی بر تخمیر شکمبه‌ای باشد.

استناد: رشیدی، ندا؛ فدایی‌فر، امیر؛ عزیزی، ایوب؛ کیانی، علی. (۱۴۰۴). استفاده از لیزین و متیونین محافظت نشده و آنالوگ‌های کلسیمی آن‌ها در جیره گاوهای شیری بر گوارش‌پذیری، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی. پژوهش در نشخوارکنندگان، ۱۳(۲)،



© نویسندگان.

DOI:

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

امروزه جیره‌نویسی براساس اسیدهای آمینه به جای پروتئین سریع‌اً در حال تبدیل شدن به یک روش استاندارد در زمینه تغذیه دام‌های شیری پرتولید می‌باشد. تغذیه سطوح بالای پروتئین جیره و تجزیه پروتئین در شکمبه غلظت آمونیاک را افزایش می‌دهد که باعث کاهش بازده استفاده از نیتروژن برای تولید شیر می‌گردد. تغذیه بیش از حد پروتئین باعث تجمع نیتروژن در محیط زیست می‌شود، نشان داده شده که در ایالت متحده ۹۰ درصد انتشار آمونیاک حاصل از بخش کشاورزی است و ۹۰ درصد از این انتشار به‌طور عمده توسط مزارع دام تولید می‌شوند (Jokela و Meisinger، ۲۰۰۰). آمونیاک ایجاد شده در اثر دفع اوره از طریق ادرار دام‌ها می‌تواند روی کیفیت خاک و آب اثرگذار باشد. یکی از ترکیبات مضر برای لایه ازن آمونیاک است (Lüpping و Kaufmann، ۱۹۸۲). بنابراین با متوازن کردن جیره‌های غذایی گاوهای شیرده جهت تأمین اسیدهای آمینه محدودکننده می‌توان پاسخ تولیدی به جیره‌های کم پروتئین را بدون افزایش دفع ادراری نیتروژن بهبود بخشید (Leonardi و همکاران، ۲۰۰۳). براساس تحقیقات موجود اسیدهای آمینه متیونین و لیزین دو اسید آمینه محدودکننده در جیره گاوهای شیری هستند که بیشتر به دلیل غلظت پایین آن‌ها در جیره در مقایسه با غلظت آن‌ها در شیر و پروتئین میکروبی است (Bahrami-Yekdangi و همکاران، ۲۰۱۴). تبدیل ناکارآمد نیتروژن جیره‌ای به پروتئین موجود در محصولات دامی ممکن است ناشی از کمبود ساده در کل اسیدهای آمینه تأمین شده نباشد، بلکه ناشی از نقص در الگوی اسیدهای آمینه جذب شده باشد (Lobley و Milano، ۱۹۹۷). متعادل کردن اسیدهای آمینه قابل متابولیسم و در دسترس در روده کوچک، می‌تواند غلظت جیره‌ای پروتئین خام را کاهش دهد

(Noftsker و St-Pierre، ۲۰۰۳). متوازن کردن اسیدهای آمینه متیونین و لیزین باعث پاسخ‌های متفاوتی در مقدار ماده خشک مصرفی، تولید شیر و مقدار و درصد پروتئین شیر در جیره‌های گاوهای شیری با سطوح کم پروتئین خام می‌شود (Socha و همکاران، ۲۰۰۵)، به طوری که تأمین این اسیدهای آمینه بدون دفع بیش از حد نیتروژن به محیط زیست تولید شیر را بهبود می‌بخشد. در صورتیکه خیلی از تحقیقات بر روی مکمل‌سازی اسیدهای آمینه محافظت‌شده در برابر تجزیه شکمبه‌ای تمرکز کرده‌اند، اما برخی تحقیقات نشان داده‌اند که مکمل‌های غیرمحافظت‌شده متیونین و لیزین سبب ارتقاء تخمیر شکمبه‌ای شده‌است. استفاده از سطوح بالای متیونین غیرمحافظت‌شده در جیره هضم میکروبی متیونین، سیستمین، تیروزین و ایزولوسین بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد و جریان این اسیدهای آمینه به دئودنوم افزایش می‌یابد. همچنین گزارش کردند که افزودن متیونین غیرمحافظت‌شده سبب افزایش قابلیت هضم ماده‌آلی در جیره‌های بر پایه سیلاژ ذرت شد (Robert و همکاران، ۱۹۹۸). به‌هرحال گزارش شده است که افزودن متیونین به صورت دی‌ال متیونین یا آنالوگ هیدروکسی بوتانوئیک اسید متیونین در جیره‌هایی که غلظت گوگرد مناسب دارد تأثیری بر تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی ندارد (Koenig و همکاران، ۱۹۹۹). میکروارگانیسم‌های شکمبه قادرند از اسیدهای آمینه‌ای استفاده نمایند که گروه کربوکسیل و آمین آزاد داشته باشند، آنالوگ کلسیمی لیزین و متیونین به عنوان یک روش شیمیایی جهت محافظت لیزین و متیونین در برابر تجزیه شدن در شکمبه پیشنهاد شده است (Fadayifar و همکاران، ۲۰۱۷). با توجه به اهمیت موضوع و کمبود اطلاعات در خصوص اثرات استفاده از مکمل لیزین و متیونین و آنالوگ‌های کلسیمی آن‌ها

بر روی الگوی تخمیر شکمبه نشخوارکنندگان، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثرات استفاده از لیزین و متیونین و آنالوگ‌های کلسیمی آن‌ها بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر و فعالیت آنزیمی شکمبه در شرایط برون‌تنی است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه تغذیه دام تکمیلی و ایستگاه دامپروری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. مایع شکمبه از ۲ رأس گاو شیری بومی نژاد لری مجهز به فیستولای شکمبه‌ای با وزن 33 ± 32 کیلوگرم شکم زایش دوم تهیه شد. به منظور بررسی استفاده از مکمل لیزین و متیونین و آنالوگ کلسیمی آن‌ها بر روی فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر و فعالیت آنزیمی شکمبه در شرایط برون‌تنی در قالب طرح کاملاً تصادفی آزمایشی با ۷ تیمار، ۱۲ تکرار و در ۳ دوره مجزا با تیمارهای زیر انجام شد: (۱) جیره شاهد (حاوی ۰/۶۴ درصد ماده خشک لیزین و ۰/۲۴ درصد ماده خشک متیونین)، (۲) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد لیزین (به صورت لیزین هیدروکلراید) (حاوی ۰/۹۴ درصد ماده خشک لیزین و ۰/۲۴ درصد ماده خشک متیونین)، (۳) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد لیزین (به صورت آنالوگ کلسیمی لیزین) (حاوی ۰/۹۴ درصد ماده خشک لیزین و ۰/۲۴ درصد ماده خشک متیونین)، (۴) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد متیونین (به صورت دی‌ال متیونین) (حاوی ۰/۶۴ درصد ماده خشک لیزین و ۰/۵۴ درصد ماده خشک متیونین)، (۵) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد متیونین (به صورت آنالوگ کلسیمی متیونین) (حاوی ۰/۶۴ درصد ماده خشک لیزین و ۰/۵۴ درصد ماده خشک متیونین)، (۶) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد آنالوگ کلسیمی متیونین (حاوی لیزین (به صورت آنالوگ کلسیمی لیزین) (حاوی

۰/۹۴ درصد ماده خشک لیزین و ۰/۵۴ درصد ماده خشک متیونین) و (۷) جیره شاهد + ۰/۳۰ درصد متیونین (به صورت دی‌ال متیونین) + ۰/۳۰ لیزین (به صورت لیزین هیدروکلراید) (حاوی ۰/۹۴ درصد ماده خشک لیزین و ۰/۵۴ درصد ماده خشک متیونین). یک جیره فرضی گاو شیری با میانگین تولید ۴۰ لیتر شیر در روز، میانگین روزهای شیردهی ۱۱۰ روز، با ۳/۵ درصد چربی و ۳/۲ درصد پروتئین با استفاده از نرم‌افزار (NRC, 2001) تنظیم (جدول ۱) و اثر افزودن لیزین و متیونین و آنالوگ کلسیمی آن‌ها به جیره غذایی بررسی شد. جهت تعیین پروتئین خام، چربی خام، خاکستر و الیاف نامحلول در شوینده خشی جیره غذایی از دستگاه NIRS (Near infrared reflectance spectroscopy, مدل DA 7250، ساخت کشور سوئد) استفاده شد. آنالوگ‌های کلسیمی لیزین و متیونین از طریق شرکت آینده نگر زاگرس تهیه شد.

آزمون تولید گاز و تعیین فراسنجه‌های تخمیر: به منظور انجام آزمون تولید گاز، جیره‌های غذایی پس از خشک شدن در ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت و آسیاب نمودن تا اندازه یک میلی‌متر، به مقدار مورد نیاز (۲۵۰ میلی‌گرم) داخل ویال‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و مایع شکمبه از دو رأس گاو فیستوله شده که به مدت دو هفته با جیره پایه تغذیه شده بودند، گرفته شد. مایع شکمبه صاف شده با دو لایه پارچه پنبه و بزاق مصنوعی به ترتیب به نسبت ۱ به ۴ (جمعا ۲۵ میلی‌لیتر) به ویال‌ها افزوده شد (Marten و Barnes، ۱۹۸۰). برای هر تیمار آزمایشی میزان ۱۰ تکرار و در سه دوره مجزا (تکرار) در نظر گرفته شد. در هر دوره ۳ ویال نیز به عنوان بلانک جهت تصحیح گاز تولیدی قرار داده شد. سپس درب ویال‌ها توسط دستگاه پرس بسته شد و ویال‌ها درون بن‌ماری آب گرم با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. گاز تولیدی در زمان‌های

استفاده از لیزین و متیونین محافظت نشده و... / ندا رشیدی و همکاران

۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از
برای تعیین فراسنجه‌های تولید گاز در هر آزمایش، از
انکوباسیون توسط دستگاه دیجیتال فشارسنج ثبت شد.

$$P = b(1 - e^{-ct})$$

معادله [۱]

جدول ۱- ترکیب شیمیایی جیره غذایی گاو شیری جهت انکوباسیون آزمایشگاهی

Table 1- Chemical composition of dairy cow diet for laboratory incubation

درصد از ماده خشک	Item	اجزاء
12	Alfalfa	یونجه
20	Corn silage	سیلاژ ذرت
3	Wheat straw	کاه گندم
21	Corn	دانه ذرت
21	Barley	دانه جو
4.5	Wheat bran	سبوس گندم
15	Soybean meal	کنجاله سویا
3.5	Pre-mixed ¹	پیش مخلوط
100	Total	کل
The chemical composition		ترکیب شیمیایی
65	Dry matter (%)	% ماده خشک
16.38	Crude protein (% DM)	پروتئین خام (% ماده خشک)
11.9	Rumen degradable protein (% DM)	پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (% ماده خشک)
4.48	Rumen undegradable protein (% DM)	پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه (% ماده خشک)
1.72	Net Energy Lactation (Mcal/kg DM)	انرژی خالص شیردهی (مگا کالری ر کیلو گرم ماده خشک)
31.22	NDF (% DM)	الیاف محلول در شوینده خنثی (% ماده خشک)
2.75	EE (% DM)	عصاره اتری (% ماده خشک)
7.59	Ash (% DM)	خاکستر (% ماده خشک)
0.8	Calcium (% DM)	کلسیم (% ماده خشک)
0.4	Phosphorus (% DM)	فسفر (% ماده خشک)
0.24	Methionine (%DM)	متیونین (% ماده خشک)
0.64	Lysine (%DM)	لیزین (% ماده خشک)

¹ هر کیلوگرم پیش مخلوط حاوی: ۲۰۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۴۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D₃، ۱۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین E، ۵۰ میلی گرم بیوتین، ۱۰۰۰ میلی گرم منگنز، ۱۲۵۰ میلی گرم روی، ۲۵۰ میلی گرم مس، ۲۰۰ میلی گرم آهن، ۲۰ میلی گرم سلنیوم، ۱۳۵۰۰۰ میلی گرم کلسیم، ۴۰۰۰ میلی گرم فسفر، ۲۰ میلی گرم کبالت، ۲۵ میلی گرم ید، ۲۰۰۰۰ میلی گرم منیزیم، ۳۹۰۰۰ میلی گرم سدیم به عنوان نمک، ۸۲۰۰۰ میلی گرم سدیم به عنوان بی کرینات سدیم و ۱۰ میلی گرم آنتی اکسیدان سدیم.

¹ Each kilogram of pre-mixed contains: 200000 international units of vitamin A, 40000 international units of vitamin D₃, 1000 international units of vitamin E, 50 mg of biotin, 1000 mg of manganese, 1250 mg of zinc, 250 mg of copper, 200 mg Iron, 20 mg selenium, 135000 mg calcium, 4000 mg phosphorus, 20 mg cobalt, 25 mg iodine, 20000 mg magnesium, 39000 mg sodium as salt, 82000 mg Sodium as sodium bicarbonate and 1000 mg of antioxidants.

جیره‌های آزمایشی در زمان ۱۶ ساعت انکوباسیون
طبق معادلات زیر تخمین زده شد (Menke و
همکاران، ۱۹۷۹).

معادلات [۲]

$$ME \text{ (MJ/kg DM)} = 2.20 + 0.136 \text{ GAS} + 0.0057 \text{ CP (g/kg DM)}$$

در این معادله، b گاز تولیدی از بخش تخمیر پذیر
(میلی لیتر)، c نرخ تولید گاز در ساعت، t زمان
انکوباسیون بر حسب ساعت و P میزان گاز تولیدی
(میلی لیتر) در زمان مورد نظر است. در مرحله بعد
انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی

IVOMD (g/kg OM) = 148.8 + 8.89 GAS + 0.450 CP (g/kg DM) + 0.651 ash (g/kg DM) که در این معادلات، IVOMD قابلیت هضم ماده آلی، ME انرژی قابل متابولیسم، CP غلظت پروتئین خام به صورت گرم در کیلوگرم ماده خشک، ash خاکستر به صورت گرم در کیلوگرم ماده خشک و GAS حجم گاز خالص تولیدی برای ۲۰۰ میلی گرم سوپسترا پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون می باشد. سایر فراسنجه های تخمیر نیز در زمان ۱۶ ساعت انکوباسیون تعیین شد. برای تعیین سایر فراسنجه های تخمیر، ۱۶ ساعت پس از شروع انکوباسیون ۵ ویال از هر تیمار از روند انکوباسیون خارج شد و پس از ثبت گاز تولیدی در آن ها بلافاصله میزان pH هر ویال توسط pH متر سیار تعیین شد. سپس از داخل هر ویال نمونه گیری از مایع شکمبه برای تعیین غلظت آمونیاک به عمل آمد (Broderick و Kang، ۱۹۸۰). براساس بقایای مواد خوراکی هضم نشده هر ویال (دو ویال)، میزان ماده خشک ناپدید شده محاسبه گردید. در یک دوره مجزا (دوره چهارم)، جیره های آزمایشی به مدت ۲۴ ساعت جهت تعیین غلظت آمونیاک شکمبه انکوبه شدند. برای این منظور، پس از شروع انکوباسیون به مدت هر دو ساعت یک بار و تا زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون، نمونه گیری از مایع شکمبه داخل هر ویال انجام شد. میزان نیتروژن آمونیاکی با استفاده از معرف های فنول و هیپوکلریت و با روش (Broderick و Kang، ۱۹۸۰) اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم های میکروبی شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، فعالیت تجزیه کاغذ صافی و آلفا آمیلاز موجود در بخش میکروبی چسبیده به ذرات خوراکی (پلت های گردآوری شده) با روش (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۰) برآورد شد. روش کار به این صورت بود که پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون، در آغاز محتوای هر ویال سانتریفیوژ شده و بقایا گردآوری شد. پس از آن بقایا با کربن تتراکلرید و

آنزیم لیزوزیم فرآیند شدند و مخلوط آنزیم های مایع شکمبه در بافر فسفات در سانتریفیوژ با دور $27000 \times g$ در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه به دست آمد. برای برآورد فعالیت کربوکسی متیل سلولز، مخلوط واکنش شامل یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر ۶/۸)، ۰/۵ میلی لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ میلی لیتر کربوکسی متیل سلولز یک درصد (به عنوان بستره) بود که در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت نگهداری 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 بستره) بود که در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت نگهداری شد. 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 یک (به عنوان بستره)، در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت نگهداری شد. برای اندازه گیری فعالیت آلفا آمیلاز، مخلوط واکنش محتوی یک میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (با pH برابر ۶/۸)، ۰/۵ میلی لیتر شیرابه شکمبه و ۰/۵ میلی لیتر محلول نشاسته یک درصد (به عنوان بستره) در دمای ۳۹ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. در همه آزمون های یادشده، واکنش با افزودن سه میلی لیتر محلول دینیترو سالیسیلیک اسید متوقف شد. گلوکز آزاد شده در اثر فعالیت هر یک از آنزیم های مورد آزمون با روش (Miller، ۱۹۵۹)، برآورد شد. فعالیت های آنزیمی بر پایه این فرض که یک واحد آنزیمی توانایی تولید یک میکرومول گلوکز در هر ساعت در هر میلی لیتر را در شرایط مخلوط واکنش دارد محاسبه شد.

آنالیز داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تولید گاز، گوارش‌پذیری مواد مغذی، فراسنجه‌های تخمیر و فعالیت آنزیمی با استفاده از رویه MIXED و توسط نرم‌افزار SAS (2001) و با استفاده از مدل آماری زیر (معادله ۳) انجام شد:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + Run_j + e_{ijk} \quad [3] \text{ معادله}$$

در آن Y_{ijk} : رکورد مشاهده شده، μ : میانگین کل، T_i : اثر ثابت تیمار آزمایشی i ام، Run_j : اثر تصادفی دوره j ام و e_{ijk} : خطای آزمایشی بود. مقایسه چند دامنه‌ای میانگین حداقل مربعات با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار محافظت شده فیشر انجام شد. برای همه مقایسه‌ها معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

تولید گاز: براساس نتایج جدول ۲، بیشترین گاز تولیدی در ۱۶ ساعت پس از انکوباسیون، مربوط به تیمار دریافت‌کننده لیزین هیدروکلراید و کمترین گاز تولیدی مربوط به تیمار دریافت‌کننده دی‌ال متیونین بود ($P < 0.05$). همچنین روند مشابهی در سایر زمان‌ها و کل گاز تولیدی مشاهده شد ($P < 0.05$). گاز تولیدی در تمامی زمان‌ها در تیمار دریافت‌کننده آنالوگ کلسیمی لیزین بعلاوه آنالوگ کلسیمی متیونین تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد. تیمار آنالوگ کلسیمی متیونین فقط در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از

انکوباسیون مقدار گاز تولیدی کمتری نسبت به تیمار شاهد داشت ($P < 0.05$), اما در خصوص کل گاز تولیدی تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. افزودن لیزین هیدروکلراید و دی‌ال متیونین به طور همزمان در ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت، اما کل گاز تولیدی و همچنین گاز تولیدی در ساعت ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت ($P < 0.05$). پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر در تیمار دی‌ال متیونین و تیمار لیزین هیدروکلراید بعلاوه دی‌ال متیونین نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0.05$). بیشترین پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر مربوط به تیمار لیزین هیدروکلراید و تیمار شاهد بود و تفات معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نگردید. تیمار آنالوگ کلسیمی لیزین و تیمار آنالوگ کلسیمی متیونین و استفاده همزمان آن‌ها در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری از لحاظ پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر نداشتند. بیشترین سرعت تولید گاز مربوط به تیمار لیزین هیدروکلراید بود که با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. به‌طور معنی‌داری سرعت تولید گاز در تیمار دی‌ال متیونین نسبت به سایر تیمارها کمتر بود ($P < 0.05$). تیمار لیزین هیدروکلراید بعلاوه دی‌ال متیونین چه به صورت آنالوگ کلسیمی و چه به صورت غیرآنالوگ تفاوت آماری معنی‌داری با تیمار شاهد از لحاظ سرعت تولید گاز نداشتند.

جدول ۲- تأثیر لیزین هیدروکلراید، دی‌ال متیونین و آنالوگ کلسیمی آن‌ها بر فراسنجه‌های تولید گاز جیره‌های آزمایشگاهی توسط مخلوط میکروارگانیسم‌های شکمبه گاو شیری

Table 2. The effect of lysine hydrochloride, DL methionine and their calcium analogues on *in vitro* gas

پارامترهای تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی							
C ⁷	B ⁶	TGP ⁵	GP ⁴ ₇₂	GP ³ ₄₈	GP ² ₂₄	GP ¹ ₁₆	
0.070 ^{ab}	69.07 ^{ab}	71.45 ^{ab}	67.77 ^a	64.09 ^{ab}	56.71 ^{ab}	49.15 ^{bc}	شاهد
							Control
0.070 ^{ab}	70.10 ^a	72.47 ^a	68.65 ^a	64.44 ^a	58.56 ^a	51.28 ^a	لیزین هیدروکلراید
							Hydrochloride Lysine
0.073 ^a	66.67 ^{bc}	69.12 ^{bc}	65.75 ^{ab}	61.48 ^{bc}	55.37 ^{bcd}	50.15 ^{ab}	آنالوگ لیزین
							Lysine Calcium Analogue
0.06 ^c	65.40 ^c	68.04 ^c	63.89 ^b	59.49 ^c	53.57 ^d	47.66 ^c	دی‌ال متیونین
							DL Methionine
0.06 ^{bc}	66.45 ^{bc}	69.93 ^{abc}	64.76 ^b	60.06 ^c	54.18 ^{cd}	49.04 ^{bc}	آنالوگ متیونین
							Methionine Calcium Analogue
0.06 ^b	65.80 ^c	68.47 ^c	63.99 ^b	59.84 ^c	54.71 ^{bed}	48.90 ^{bc}	پارامترهای تولید گاز جیره‌های آزمایشگاهی با استفاده از مخلوط میکروارگانیسم‌های شکمبه گاوهای شیری
							DL Methionine + Lysine Hydrochloride
0.07 ^b	67.77 ^{abc}	70.75 ^{abc}	66.07 ^{bb}	61.70 ^{abc}	56.01 ^{bc}	50.08 ^{ab}	آنالوگ متیونین + آنالوگ لیزین
							Calcium Methionine Analog + Lysine Calcium Analog
0.001	0.868	0.433	0.915	0.893	0.638	0.491	SEM7
							P-value8
0.0038	0.0078	0.0151	0.0079	0.0024	0.0003	0.0015	treatment

پارامترهای تولید گاز جیره‌های آزمایشگاهی با استفاده از مخلوط میکروارگانیسم‌های شکمبه گاوهای شیری.
 ۱. تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی به مدت ۱۶ ساعت (میلی‌لیتر/۲۵۰ میلی گرم سوپسترا)؛ ۲. تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی برای ۲۴ ساعت (میلی لیتر/۲۵۰ میلی گرم سوپسترا)؛ ۳. تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی برای ۴۸ ساعت (میلی لیتر/۲۵۰ میلی گرم سوپسترا)؛ ۴. تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی برای ۷۲ ساعت (میلی لیتر/۲۵۰ میلی گرم سوپسترا)؛ ۵. کل تولید گاز برای ۹۶ ساعت (میلی لیتر/۲۵۰ میلی گرم سوپسترا)؛ ۶. تولید گاز از کسرهای نامحلول اما قابل تخمیر برای ۹۶ ساعت (میلی لیتر/۲۵۰ میلی گرم سوپسترا)؛ ۷. ثابت نرخ تولید گاز در طول انکوباسیون (%/h)؛ ۸. خطای استاندارد وسیله؛ ۹. میانگین‌ها در ستون با حروف بالا متفاوت است (P < 0.05).

production parameters of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of dairy cows

1. In vitro gas production (IVGP) for 16 h (mL/250 mg of substrate); 2. IVGP for 24 h (mL/250 mg of substrate); 3. IVGP for 48 h (mL/250 mg of substrate); 4. IVGP for 72 h (mL/250 mg of substrate); 5. Total gas production for 96 h (mL/250 mg of substrate); 6. Gas production from the insoluble but fermentable fractions for 96 h (mL/250 mg of substrate); 7. Rate constant of gas production during incubation (%/h); 8. Standard error of the means; 9. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

شرایط برون‌تنی با مایع شکمبه اخذشده از گوسفند با استفاده از دو سطح آنالوگ هیدروکسی متیونین و یک سطح دی‌ال متیونین با ماده‌های خوراکی مختلف (شامل یونجه، کاه گندم، ذرت، جو، کنجاله سویا و کنجاله تخم پنبه)، مقدار گاز تولیدی تجمعی در ساعت ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون برای تمامی ماده‌های خوراکی افزایش یافت (BaghbanzadehNobari, 2013). گاز تولیدشده در تکنیک تولید گاز، به‌طور مستقیم از تخمیر (گاز

تحقیقات زیادی در مورد اثرات لیزین و متیونین و فرم محافظت شده آن‌ها بر پارامترهای تولید گاز در شرایط برون‌تنی وجود ندارد. برخلاف نتایج پژوهش حاضر، در تحقیقی با شرایط برون‌تنی (شبیه سازی شکمبه بز) افزودن سطح کم (۰/۱۱ گرم در کیلوگرم ماده خشک) و زیاد (۰/۸۱ گرم در کیلوگرم ماده خشک) متیونین محافظت شده به جیره با ۱۴ درصد پروتئین خام حجم کل گاز تولیدی در طی ۲۴ ساعت تغییری مشاهده نشد (Abbasi و همکاران، ۲۰۱۹). در

دی اکسید کربن و متان) و به طور غیرمستقیم از بافرینگ دی اکسید کربن (دی اکسید کربن آزاد شده از بافر بیکربنات) می باشد (Ørskov و Blu، ۱۹۹۳). اندازه ذرات، میزان سوپسترا، اسیدیته مناسب، دمای مناسب و بافرینگ کافی از جمله عواملی است که می تواند بر افزایش تولید گاز و تخمیر مواد خوراکی توسط میکروارگانیسم ها تأثیرگذار باشد. با این وجود در آزمایش حاضر اثرات متفاوتی با افزودن دی ال متیونین و اسید آمینه لیزین هیدروکلراید به صورت جداگانه بر تولید گاز تجمعی مشاهده شد به طوریکه در تیمار دریافت کننده دی ال متیونین مقدار گاز تجمعی کمتری نسبت به تیمار شاهد در ساعت های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ داشت اما تیمار دریافت کننده لیزین هیدروکلراید مقدار گاز تجمعی در همین ساعات نسبت به تیمار شاهد تفاوتی نداشت. در خصوص استفاده از آنالوگ کلسیمی اسیدهای آمینه لیزین و متیونین نسبت به تیمار شاهد تفاوتی در تولید گاز تجمعی مشاهده نشد که این موضوع نشان می دهد که آنالوگ کلسیمی اسیدهای آمینه در جیره گاوهای شیری نسبت به فرم آزاد آنها کمتر مورد متابولیسم میکروارگانیسم های شکمبه قرار می گیرند.

فراسنجه های تخمیر: جدول ۳، نتایج مربوط به تأثیر استفاده از لیزین هیدروکلراید و دی ال متیونین و آنالوگ های کلسیمی آنها بر فراسنجه های تخمیر جیره های آزمایشگاهی توسط مخلوط میکروارگانیسم های شکمبه گاو شیری را نشان می دهد. قابلیت هضم ماده خشک، سنتز پروتئین میکروبی و pH تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و غلظت اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر در تیمار لیزین هیدروکلراید نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری بیشتر بود ($P < 0.05$). قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و غلظت اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر در تیمار آنالوگ کلسیمی لیزین،

تیمار آنالوگ کلسیمی متیونین و تیمار آنالوگ کلسیمی لیزین بعلاوه آنالوگ کلسیمی متیونین در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی داری نداشت. غلظت آمونیاک در تیمارهای دریافت کننده لیزین هیدروکلراید یا دی ال متیونین یا مخلوط آنها نسبت به تیمار شاهد به طور معنی داری بیشتر بود ($P < 0.05$). از طرفی غلظت آمونیاک در تیمارهای دریافت کننده فرم آنالوگ کلسیمی لیزین یا متیونین یا مخلوط آنها در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی داری نداشت.

موافق با نتایج پژوهش حاضر، در تحقیقی بر روی گاوهای شیری با افزودن هیدروکسی آنالوگ متیونین و دی ال متیونین به جیره، قابلیت هضم ماده خشک نسبت به تیمار شاهد تحت تأثیر قرار نگرفت (Noftsker و همکاران، ۲۰۰۵). در مطالعه دیگری Rostami و همکاران (۲۰۱۸) نیز گزارش کردند با افزودن ۶ گرم لیزین محافظت شده یا ۱۳ گرم متیونین محافظت شده به جیره گاو شیری فرموله شده با ۱۶/۵۰ درصد پروتئین خام به صورت جداگانه یا افزودن همزمان آنها به جیره غذایی در مقایسه با جیره فرموله شده با ۱۷/۸۰ درصد پروتئین خام، قابلیت هضم ماده خشک تحت تأثیر قرار نگرفت. با افزودن ۰/۲۹ درصد دی ال متیونین و ۲/۲۷ درصد لیزین هیدروکلراید به جیره غذایی گاوهای کانولا گذارنده، تفاوتی در قابلیت هضم ماده خشک در شکمبه و کل دستگاه گوارش مشاهده نکردند (Chung و همکاران، ۲۰۰۶). در مطالعه حاضر، تنها استفاده از لیزین هیدروکلراید توانست قابلیت هضم ماده آلی را نسبت به تیمار شاهد افزایش دهد، که مغایر با نتایج تحقیق (Chung و همکاران، ۲۰۰۶) بود که با افزودن ۰/۲۹ درصد دی ال متیونین و ۲/۲۷ درصد لیزین هیدروکلراید به جیره غذایی گاوهای کانولا گذارنده، تفاوتی در قابلیت هضم ماده آلی در شکمبه و کل دستگاه گوارش مشاهده نکردند.

جدول ۳- تأثیر لیزین هیدروکلراید، دی‌ال متیونین و آنالوگ کلسیمی آنها بر فراسنجه‌های تخمیر جیره‌های آزمایشگاهی توسط مخلوط میکروارگانیسم‌های شکمبه گاو شیری.

Table 3. The effect of lysine hydrochloride, DL methionine and their calcium analogues on *in vitro* fermentation parameters of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of dairy cows.

پارامترهای تخمیر							
NH ₃ -N ⁶	pH	MPS ⁵	SCFA ⁴	ME ³	OMD ²	DMD ¹	
15.3 ^b	6.07	252	4.34 ^{bc}	10.79 ^{bc}	59.7 ^{bc}	55.6	شاهد Control
16.8 ^a	6.1	254	4.53 ^a	11.09 ^a	61.7 ^a	54.4	لیزین هیدروکلراید Hydrochloride Lysine
14.9 ^b	6.06	252.9	4.43 ^{ab}	10.93 ^{ab}	60.6 ^{ab}	55	آنالوگ لیزین Lysine Calcium Analogue
16.3 ^a	6.04	252.85	4.21 ^c	10.58 ^c	58.4 ^c	55.2	دی‌ال متیونین DL Methionine
15.1 ^b	6.08	252.7	4.34 ^{bc}	10.78 ^{bc}	59.7 ^{bc}	53	آنالوگ متیونین Methionine Calcium Analogue
17.0 ^a	6.05	253.1	4.32 ^{bc}	10.76 ^{bc}	59.5 ^{bc}	52.3	دی‌ال متیونین + لیزین هیدروکلراید DL Methionine + Lysine Hydrochloride
14.9 ^b	6.11	252.28	4.43 ^{ab}	10.92 ^{ab}	60.6 ^{ab}	53	آنالوگ متیونین + آنالوگ لیزین Calcium Methionine Analog + Lysine Calcium Analog
0.212	0.0375	15.751	0.0441	0.069	0.4	1.56	SEM ⁷
<0.01	0.85	0.99	<0.01	<0.01	<0.01	0.67	P-value ⁸ Treatment

۱. ناپدید شدن ماده خشک (%). ۲. ناپدید شدن مواد آلی (%). ۳. تخمین انرژی قابل متابولیسم (مگاژول بر کیلوگرم ماده خشک)، ۴. اسیدهای چرب فرار با زنجیره کوتاه (میلی مول بر ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)، ۵. سنتز پروتئین میکروبی (میلی گرم بر گرم ماده خشک)، ۶. نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم بر لیتر)، ۷. خطای استاندارد میانگین خطا، ۸. میانگین در یک ستون با حروف بالا متفاوت است (p<0.05).

1. Disappearance of dry matter (%), 2. Disappearance of organic matter (%), 3. Estimation of metabolizable energy (MJ/kg DM), 4. Short-chain volatile fatty acids (mmol/200 mg DM), 5. Microbial protein synthesis (mg/g DM), 6. Ammonia nitrogen (mg/l), 7. Standard error of means mean error, 8. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

مقایسه با آزمایشات درون تنی و تفاوت در نوع آنالوگ اسیدآمینة استفاده شده باشد. در مقابل با نتایج تحقیق حاضر، در شرایط برون‌تنی با مایع شکمبه اخذ شده از گوسفند استفاده دو سطح از آنالوگ هیدروکسی متیونین و یک سطح دی‌ال متیونین با ماده‌های خوراکی مختلف، انرژی قابل متابولیسم نسبت به تیمار کنترل افزایش یافت (Baghbanzadeh Nobari, 2013). غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه با افزودن دی‌ال متیونین و لیزین هیدروکلراید به جیره غذایی بزغاله‌های پرواری تحت تأثیر قرار نگرفت (Ao و همکاران، ۲۰۱۹)؛ که این نتایج با نتایج تحقیق حاضر در خصوص لیزین هیدروکلراید همخوانی دارد اما خصوص دی‌ال متیونین همخوانی

قابلیت هضم ماده‌آلی با افزودن آنالوگ متیونین به جیره گاوهای هلشتاین کانولا گذاری شده تحت تأثیر قرار نگرفت (Noftsker و همکاران، ۲۰۰۵)، که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. اضافه کردن هیدروکسی آنالوگ متیونین به سیستم‌های تخمیر کشت مداوم، قابلیت هضم ماده آلی تحت تأثیر قرار نگرفت (Fowler و همکاران، ۲۰۱۰). در مقابل با نتایج تحقیق حاضر، افزودن اسیدهای آمینه محافظت‌شده لیزین و متیونین به جیره غذایی گاوهای شیری موجب افزایش قابلیت هضم ماده آلی شد (Lee و همکاران، ۲۰۱۲). ممکن است دلایل اختلاف نتایج تحقیق حاضر با سایر تحقیقات مربوط به تفاوت در جیره غذایی پایه مورد استفاده، آزمایش برون تنی در

تغییر نکرد (Noftsker و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین اثر معنی داری بر pH مایع شکمبه با تزریق سطوح مختلف متیونین و لیزین محافظت شده به شکمبه گاوهای شیری، گزارش نشد (Menchu, 2019). با توجه به نتایج تحقیق حاضر و مطالعات فوق می توان چنین نتیجه گیری کرد که pH مایع شکمبه تحت تاثیر افزودن اسیدهای آمینه لیزین و متیونین به صورت آزاد یا محافظت شده قرار نمی گیرد و افزودن این منابع به جیره غذایی بر سرعت تخمیر کربوهیدرات ها اثر معنی داری ندارد.

در تحقیق حاضر، در شرایط برون تنی افزودن ۰/۳۰ درصد لیزین هیدروکلراید یا ۰/۳۰ درصد دی ال متیونین به صورت غیرمحافظت شده به جیره غذایی گاو شیری با ۱۶/۵۰ درصد پروتئین خام سبب افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی شد. همسو با نتایج تحقیق حاضر، (Chung و همکاران، ۲۰۰۶) گزارش کردند که با افزودن ۰/۲۹ درصد دی ال متیونین و ۲/۲۷ درصد لیزین هیدروکلراید به جیره غذایی گاوهای کانولا گذاری شده، غلظت آمونیاک مایع شکمبه افزایش یافت. در مقابل با نتایج تحقیق حاضر، اضافه کردن سطح صفر و ۱۱ گرم دی ال متیونین در روز (۰/۴۵ درصد ماده خشک) به جیره گاوهای شیری، به جیره های با دو سطح پروتئین بالا (۱۷/۷۰ درصد) و پایین (۱۵/۷۰ درصد) اثر معنی داری روی غلظت نیتروژن آمونیاکی نداشت (BaghbanzadehNobari, 2013). غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه بزغاله های پرواری با افزودن دی ال متیونین (۱/۲۷ درصد ماده خشک) و لیزین هیدروکلراید (۲/۴۵ درصد ماده خشک) به جیره غذایی، تغییر نکرد (Ao و همکاران، ۲۰۱۹). غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه تابعی از مقدار پروتئین خام جیره غذایی، نرخ تجزیه پذیری پروتئین خام، نرخ عبور و نرخ تخمیر هست و ممکن است یکی از دلایل مربوط به اختلاف نتایج تحقیق

ندارد. از طرفی، همسو با نتایج تحقیق حاضر (Lee و همکاران، ۲۰۱۵) اثر هیدروکسی آنالوگ متیونین روی تخمیر شکمبه گاوهای هلشتاین کانولا گذاری شده بررسی شد و گزارش کردند غلظت اسیدهای چرب فرار تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت. در آزمایشی روی گاوهای شیرده که در شکمبه و دوازدهه کانولا گذاری شده بودند و روزانه مقدار صفر، ۳۰ یا ۶۰ گرم از ان-استیل-ال متیونین به شکمبه تزریق می شد، غلظت اسیدهای چرب فرار تحت تاثیر قرار نگرفت (Menchu, 2019). در تحقیق دیگری در گاوهای شیری در اوایل شیردهی غلظت اسیدهای چرب فرار با افزودن متیونین محافظت شده به جیره حاوی ۱۴/۵ درصد پروتئین خام تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت (Tamura و همکاران، ۲۰۱۹). در آزمایشی با جایگزینی اسید آمینه محافظت شده لیزین یا متیونین با اوره در جیره گاو هلشتاین کانولا گذاری شده، غلظت اسیدهای چرب فرار نسبت به تیمار کنترل افزایش یافت (Pereira و همکاران، ۲۰۱۷). همسو با نتایج تحقیق حاضر، (BaghbanzadehNobari, ۲۰۱۳) با جیره های با دو سطح پروتئین بالا (۱۷/۷۰ درصد) و پایین (۱۵/۷۰ درصد) و افزودن سطح صفر و ۱۱ گرم دی ال متیونین در روز به جیره گاوهای شیری، اثر معنی داری روی بازده سنتز پروتئین میکروبی مشاهده نشد.

همسو با نتایج تحقیق حاضر، افزودن هیدروکسی آنالوگ متیونین به شکمبه گاوهای هلشتاین کانولا گذاری، تاثیری بر pH مایع شکمبه نداشت (Lee و همکاران، ۲۰۱۵). در شرایط برون تنی (شبه سازی شکمبه بز) با افزودن سطوح کم و زیاد متیونین محافظت شده به جیره با ۱۴ درصد پروتئین خام، pH تحت تاثیر قرار نگرفت (Abbasi و همکاران، ۲۰۱۸). در تحقیق دیگری، با افزودن آنالوگ متیونین به جیره گاوهای هلشتاین کانولا گذاری شده، pH مایع شکمبه

محافظت در برابر تجزیه میکروبی اسیدهای آمینه در شکمبه محسوب می‌شود، عدم تاثیر آنها بر غلظت آمونیاک شکمبه دور از انتظار نیست. در برخی مطالعات (Benmar و همکاران، ۲۰۱۱) با کاهش درصد پروتئین خام جیره غذایی گاو شیری و افزودن اسیدهای آمینه محافظت شده به جیره غذایی، کاهش غلظت آمونیاک شکمبه را گزارش کرده‌اند که این امر به احتمال زیاد مربوط به کاهش درصد پروتئین خام جیره غذایی است و مرتبط با اضافه نمودن اسید آمینه محافظت شده نیست. در بسیاری از مقالات کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در اثر کاهش درصد پروتئین خام جیره غذایی گزارش شده است که به علت میزان و در نتیجه مصرف کمتر پروتئین قابل تجزیه در شکمبه می‌باشد (Broderick و همکاران، ۲۰۰۸ و Davidson و همکاران، ۲۰۰۳).

حاضر با سایر محققین مربوط به تفاوت در نحوه انجام آزمایش باشد، زیرا در آزمایشات برون تنی، محصولات پایانی تخمیر در طول زمان تجمع می‌یابد. در تأیید نتایج تحقیق حاضر، تزریق سطوح مختلف متیونین و لیزین محافظت شده به شکمبه گاوهای شیری، تأثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی نداشت (Menchu، ۲۰۱۹). در سایر تحقیقات نیز استفاده از آنالوگ اسیدهای آمینه لیزین یا متیونین یا فرم محافظت شده آنها تأثیری بر غلظت آمونیاک در آزمایشات درون تنی و برون تنی نداشته است (Baghbanzadeh Nobari، ۲۰۱۳؛ Lee و همکاران، ۲۰۱۵؛ Noftsker و همکاران، ۲۰۰۵؛ Pereira و همکاران، ۲۰۱۷؛ Rostami و همکاران، ۲۰۱۸؛ Tamura و همکاران، ۲۰۱۹). به هر حال با در نظر گرفتن اینکه فرم آنالوگ اسیدهای آمینه یک نوع

جدول ۴- تأثیر لیزین هیدروکلراید، دی ال متیونین و آنالوگ کلسیمی آنها بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک (واحد در دقیقه در میلی لیتر مایع شکمبه) جیره‌های آزمایشگاهی توسط مخلوط میکروارگانیسم‌های شکمبه گاو شیری

Table 4- The effect of lysine hydrochloride, DL methionine and their calcium analogues on *in vitro* activity of ruminal hydrolytic enzymes (units per minute in ml of rumen content) of experimental diets using mixed ruminal microorganisms of dairy cows

فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک				
Alpha amylase ⁴	FPD ³ activity	MCCase ²	CMCase ¹	
16.73	0.789	1.007	2.37	شاهد Control
16.39	0.916	0.916	2.17	لیزین هیدروکلراید Hydrochloride Lysine
16.92	0.747	1.004	2.32	آنالوگ لیزین Lysine Calcium Analogue
16.71	0.781	0.985	2.28	دی ال متیونین DL Methionine
16.67	0.757	0.969	2.22	آنالوگ متیونین Methionine Calcium Analogue
17.33	0.757	0.945	2.19	دی ال متیونین + لیزین هیدروکلراید DL Methionine + Lysine Hydrochloride
17.14	0.739	0.922	2.13	آنالوگ متیونین + آنالوگ لیزین Methionine Analog + Lysine Calcium Analog Calcium
0.386	0.0158	0.0962	0.1082	SEM ⁵
				P-value ⁶
0.6797	0.2	0.7373	0.6909	Treatment

۱. کربوکسی متیل سلولز، ۲. سلولز میکروکریستالی، ۳. فعالیت تجزیه کننده کاغذ فیلتر، ۴. آلفا آمیلاز، ۵. خطای استاندارد میانگین، ۶. میانگین در یک ستون با حروف بالا متفاوت است (p<0.05).

1. Carboxymethyl cellulose, 2. Microcrystalline cellulose, 3. Filter paper-degrading activity, 4. Alpha amylase, 5. Standard Error of Means, 6. Means within a column with different superscript letters are different (P<0.05).

متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی را افزایش دهند که این اتفاق رخ نداده است. علت این امر می‌تواند به خاطر این باشد که تیمار کنترل و تیمارهای حاوی آنالوگ‌های کلسیمی نیز حداقل غلظت آمونیاک مورد نیاز برای رشد بهینه میکرواورگانیزم‌های سلولیتیک را فراهم کرده‌اند. یکسان بودن درصد فیبر جیره‌های (جدول ۱) آزمایشی نیز می‌تواند فعالیت آنزیمی مشابه را توجیه نماید.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج نشان داد که بیشترین گاز تولیدی تجمعی مربوط به فرم غیرمحافظت شده لیزین هیدروکلراید و کمترین گاز تولیدی مربوط به فرم غیرمحافظت شده دی‌ال متیونین بود. استفاده از لیزین و متیونین و آنالوگ‌های کلسیمی آن‌ها اثری روی قابلیت هضم ماده خشک، سنتز پروتئین میکروبی، pH شکمبه و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیکی شکمبه نداشت. قابلیت هضم ماده آلی، غلظت اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر و انرژی قابل متابولیسم تنها در تیمار دریافت‌کننده لیزین هیدروکلراید نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود. لیزین و متیونین به‌صورت غیرمحافظت شده باعث افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی شد ولی آنالوگ‌های آن‌ها اثری روی نیتروژن آمونیاکی نداشتند. به‌طورکلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که آنالوگ کلسیمی لیزین و متیونین نسبت به فرم آزاد آن‌ها کمتر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه را دستخوش تغییرات می‌کنند.

فعالیت آنزیمی: در جدول ۴ نتایج مربوط به تاثیر استفاده از لیزین و متیونین و آنالوگ‌های کلسیمی آن‌ها بر فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه نشان داده شده است. افزودن لیزین هیدروکلراید و دی‌ال متیونین و آنالوگ‌های کلسیمی آن‌ها اثر معنی‌داری روی آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه نداشت.

در تغذیه نشخوارکنندگان جمعیت باکتری‌های شکمبه و فعالیت آنزیم‌های مترشحه از آن‌ها معمولاً با تغییر در ماهیت جیره، تحت تاثیر قرار می‌گیرد. با افزایش درصد کنسانتره جیره فعالیت باکتری‌های آمیلولیتیک و پروتئولیتیک و با افزایش سطح فیبر جیره، فعالیت آنزیم‌های سلولیتیک و زایلاناز معمولاً افزایش پیدا می‌کند (Vercoe و همکاران، ۲۰۱۰). اطلاعات زیادی در مورد اثرات لیزین و متیونین و آنالوگ‌های کلسیمی آن‌ها بر روی فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه وجود ندارد. میکرواورگانیزم‌های شکمبه برای رشد و فعالیت خود نیاز به منابع مختلف نیتروژن در شکمبه دارند. باکتری‌های تجزیه‌کننده کربوهیدرات‌های ساختاری معمولاً از آمونیاک به عنوان یک سوبسترای ترجیحی نیتروژن استفاده می‌کنند در صورتی که باکتری‌های تجزیه‌کننده نشاسته و پروتئین، پپتیدهای کوچک و اسیدآمین را ترجیح می‌دهند و در صورت کمبود این منابع به سمت استفاده از آمونیاک سوق پیدا می‌کنند (Russell و همکاران، ۱۹۹۲). در مطالعه حاضر با توجه به اینکه غلظت آمونیاک بین تیمارهای آزمایشی متفاوت بود و تیمارهای حاوی لیزین هیدروکلراید و دی‌ال متیونین بیشتر از آنالوگ‌های کلسیمی آن‌ها بود، انتظار بر این بود که گروه‌های مذکور فعالیت آنزیم‌های کربوکسی

References

- Abbasi, I. H. R., Abbasi, F., Abd El-Hack, M. E., Swelum, A. A., Yao, J., & Cao, Y. (2018). Post-ruminal effects of rumen-protected methionine supplementation with low protein diet using long-term simulation and in vitro digestibility technique. *AMB Express*, 8, 1-8.

- Abbasi, I. H. R., Abbasi, F., Liu, L., Bodinga, B. M., Abdel-Latif, M. A., Swelum, A. A., ... & Cao, Y. (2019). Rumen-protected methionine a feed supplement to low dietary protein: effects on microbial population, gases production and fermentation characteristics. *AMB Express*, 9, 1-10.
- Agarwal, N., Agarwal, I., Kamra, D. N., & Chaudhary, L. C. (2000). Diurnal variations in the activities of hydrolytic enzymes in different fractions of rumen contents of Murrah buffalo. *Journal of Applied Animal Research*, 18(1), 73-80.
- Ao, R., Liang, C., Zhiwei, K., Bin, Z., ChuanShe, Z., Zhiliang, T., ... & Teklebrhan, T. (2019). Effects of dietary methionine and lysine supplementation on growth performance, meat composition and rumen fermentation pattern in goats. *Indian Journal of Animal Research*, 53(12), 1629-1634.
- BaghbanzadehNobari B, 2013. Effect of different levels of crude protein and methionine on performance, blood, ruminal parameters and nutrient digestibility in Holstein dairy cow. Doctor of Philosophy thesis.236.
- Bahrami-Yekdangi, H., Khorvash, M., Ghorbani, G. R., Alikhani, M., Jahanian, R., & Kamalian, E. (2014). Effects of decreasing metabolizable protein and rumen-undegradable protein on milk production and composition and blood metabolites of Holstein dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3707-3714.
- Benmar, H. A., Rezayazdi, K., & Banadaki, M. D. (2011). Effect of supplementation of different level protein diets with rumen protected methionine and lysine on performance and ruminal parameters of Holstein dairy cows in early lactation.
- Blu, M., & Ørskov, E. R. (1993). Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal feed science and technology*, 40(2-3), 109-119.
- Broderick, G. A., & 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(1), 64-75.
- Broderick, G. A., Stevenson, M. J., Patton, R. A., Lobos, N. E., & Colmenero, J. O. (2008). Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(3), 1092-1102.
- Chung, Y. H., Bateman II, H. G., Williams, C. C., Stanley, C. C., Gantt, D. T., Braud, T. W., ... & Sod, G. A. (2006). Effects of methionine and lysine on fermentation in vitro and in vivo, nutrient flow to the intestine, and milk production. *Journal of dairy science*, 89(5), 1613-1620.
- Davidson, S., Hopkins, B. A., Diaz, D. E., Bolt, S. M., Brownie, C., Fellner, V., & Whitlow, L. W. (2003). Effects of amounts and degradability of dietary protein on lactation, nitrogen utilization, and excretion in early lactation Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1681-1689.
- Fadayifar A, Azarfar A and Kiani A, 2017. The manufacturing of the chelate metal-amino acid in order to prevent degradation of amino acids in the rumen of ruminant and improving the bioavailability of metals. In Iranian Patent. Iran. (In Persian).
- Fowler, C. M., Karnati, S. K. R., Bequette, B. J., Yu, Z., & Firkins, J. L. (2010). Evaluation of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid isopropyl ester (HMBi) and methionine (Met) supplementation on digestibility and efficiency of bacterial growth in continuous culture. *J. Dairy Sci*, 93, 576.
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., Lopez, S., & Bannink, A. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, 83(2), 143-150.
- Kaufmann, W., & Lüpping, W. (1982). Protected proteins and protected amino acids for ruminants. In *Protein contribution of feedstuffs for ruminants* (pp. 36-75). Butterworth-Heinemann.

- Koenig, K. M., Rode, L. M., Knight, C. D., & McCullough, P. R. (1999). Ruminal escape, gastrointestinal absorption, and response of serum methionine to supplementation of liquid methionine hydroxy analog in dairy cows. *Journal of dairy science*, 82(2), 355-361.
- Lee, C., Hristov, A. N., Cassidy, T. W., Heyler, K. S., Lapierre, H., Varga, G. A., ... & Parys, C. (2012). Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. *Journal of dairy science*, 95(10), 6042-6056.
- Lee, C., Oh, J., Hristov, A. N., Harvatine, K., Vazquez-Anon, M., & Zanton, G. I. (2015). Effect of 2-hydroxy-4-methylthio-butanoic acid on ruminal fermentation, bacterial distribution, digestibility, and performance of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 98(2), 1234-1247.
- Leonardi, C., Stevenson, M., & Armentano, L. E. (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *Journal of dairy science*, 86(12), 4033-4042.
- Lobley, G. E., & Milano, G. D. (1997). Regulation of hepatic nitrogen metabolism in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 56(2), 547-563.
- Marten, G. C., & Barnes, R. F. (1979). Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. In *Standardization of analytical methodology for feeds: proceedings....* IDRC, Ottawa, ON, CA.
- Meisinger, J. J., & Jokela, W. E. (2000, October). Ammonia losses from manure. In *Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf., Cornell Univ., Ithaca, NY*.
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science*, 93(1), 217-222.
- Menchu, S. (2019). *Ruminal protection and intestinal availability of rumen-protected methionine and lysine in lactating dairy cows* (Master's thesis, Utah State University).
- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, 31(3), 426-428.
- Noftsger, S., & St-Pierre, N. R. (2003). Supplementation of methionine and selection of highly digestible rumen undegradable protein to improve nitrogen efficiency for milk production. *Journal of Dairy Science*, 86(3), 958-969.
- Noftsger, S., St-Pierre, N. R., & Sylvester, J. T. (2005). Determination of rumen degradability and ruminal effects of three sources of methionine in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 88(1), 223-237.
- National Research Council, Committee on Animal Nutrition, & Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle: 2001*. National Academies Press.
- Pereira, A. B. D., Whitehouse, N. L., Aragona, K. M., Schwab, C. S., Reis, S. F., & Brito, A. F. (2017). Production and nitrogen utilization in lactating dairy cows fed ground field peas with or without ruminally protected lysine and methionine. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6239-6255.
- Robert, J. C., Ferragu, V., Bouza, B., & Williams, P. E. V. (1998, January). Influence of different sources of methionine (DL methionine, hydroxy-analogues of methionine) and sulphur on the digestibility of organic matter of maize silage measured in vitro. In *Proceedings of the British Society of Animal Science* (Vol. 1998, pp. 170-170). Cambridge University Press.
- Rostami, A., Azizi, O., & Jahani-azizabadi, H. (2018). Effect of decreasing dietary protein and the use of rumen-protected lysine and methionine on performance of Holstein dairy cows during early lactation. *Journal of Ruminant Research*, 6(2), 43-60.
- Russell, J. B., O'connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., & Sniffen, C. J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of animal science*, 70(11), 3551-3561.
- Socha, M. T., Putnam, D. E., Garthwaite, B. D., Whitehouse, N. L., Kierstead, N. A., Schwab, C. G., ... & Robert, J. C. (2005). Improving intestinal amino acid supply of pre-and

- postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 1113-1126.
- Tamura, T., Inoue, K., Nishiki, H., Sakata, M., Seki, M., Koga, T., ... & Kurihara, M. (2019). Effects of rumen-protected methionine on milk production in early lactation dairy cattle fed with a diet containing 14.5% crude protein. *Animal Science Journal*, 90(1), 62-70.
- Vercoe, P. E., Makkar, H. P., & Schlink, A. C. (Eds.). (2010). *In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies* (p. 247). Heidelberg: Springer.

PROOF