

بررسی افزودن متیونین و لیزین محافظت شده شکمبه‌ای به جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروتئین بر عملکرد تولیدی و فراسنجه‌های تخمیری گاوهای شیرده هلشتاین در اوایل دوره شیردهی

حسین عبدی بنمار^۱، کامران رضایزدی^{۲*} و مهدی دهقان بنادکی^۳
۱، ۲، ۳، دانشجوی دکتری و دانشیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱۶ - تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۵)

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثر افزودن متیونین و لیزین محافظت شده شکمبه‌ای به جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروتئین بر عملکرد تولیدی و فراسنجه‌های تخمیری گاوهای شیرده هلشتاین در اوایل دوره شیردهی بود. تعداد ۲۱ رأس گاو شیرده هلشتاین در اوایل دوره شیردهی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ جیره و ۷ گاو در هر جیره به مدت ۳۵ روز تحت آزمایش قرار گرفتند. جیره‌های آزمایشی شامل: (۱) جیره حاوی پروتئین بالا با ۱۷/۵ درصد پروتئین خام، (۲) جیره حاوی پروتئین متوسط با ۱۶ درصد پروتئین خام همراه با ۱۲ گرم در روز متیونین محافظت شده شکمبه‌ای، (۳) جیره حاوی پروتئین پایین با ۱۴/۵ درصد پروتئین خام همراه با ۱۴ گرم در روز متیونین محافظت شده شکمبه‌ای و ۵ گرم لیزین محافظت شده شکمبه‌ای بودند. نتایج به دست آمده نشان داد که مصرف ماده خشک، شیر خام تولیدی، شیر تصحیح شده بر اساس ۳/۵ درصد چربی، درصد چربی شیر، نسبت‌های مولی اسیدهای چرب فرار و pH مایع شکمبه تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفتند، ولی جیره‌ها اثر معنی‌داری بر درصد پروتئین شیر، نیتروژن اوره‌ای شیر و غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه گاوها داشتند ($P < 0/05$). با توجه به نتایج به دست آمده، سطح ۱۶ درصد پروتئین خام به همراه مکمل متیونین عملکرد بهتری نسبت به سایر جیره‌های آزمایشی داشت.

واژه‌های کلیدی: متیونین و لیزین محافظت شده شکمبه‌ای، پروتئین خام جیره، گاو شیرده، تولید و ترکیب شیر، فراسنجه شکمبه‌ای.

مقدمه

(Blum et al., 1999). اگرچه گاوهای شیرده، پروتئین خام خوراک را با بازده بالاتری نسبت به دیگر دام‌های نشخوارکننده مورد استفاده قرار می‌دهند، با این وجود، ۲ تا ۳ برابر نیتروژن موجود در شیر را از طریق کود دفع می‌کنند (Broderick, 2005). لذا تغذیه جیره‌های با پروتئین بالا، علاوه بر افزایش هزینه تولید شیر و اثرات مضر بر تولید مثل دام، موجب دفع مقادیر زیادی نیتروژن به محیط می‌شود (Broderick, 2005). تقریباً ۵۰٪ کل نیتروژن ورودی از سیستم‌های زمینی به اتمسفر از سیستم‌های پرورش دام

طی سالهای گذشته، تحقیقات بسیاری در مورد تغذیه پروتئین و تأمین اسیدهای آمینه مورد نیاز گاوهای شیرده پرتولید به منظور حمایت از افزایش تولید شیر و پروتئین شیر صورت گرفته است (Dinn et al., 1998; Broderick, 2003; Broderick et al., 2008). پروتئین خام موجود در خوراک گاوهای شیرده برای رشد میکروبه‌های شکمبه ضروری است و پروتئین میکروبی و خوراکی رسیده به روده باریک، تأمین‌کننده نیازهای اسید آمینه‌ای بدن نشخوارکنندگان می‌باشد

از اوج شیردهی مورد مطالعه قرار گرفته است (Wang et al., 2010). همچنین در بیشتر این مطالعات، به منظور تأمین انرژی حاصل از منابع پروتئینی حذف شده درجیره‌های کم پروتئین، از غلات استفاده کرده‌اند که می‌تواند بر تخمیر شکمبه‌ای تأثیر گذاشته باشد (Piepenbrink et al., 1996; Leonardi et al., 2003; Socha et al., 2005; Broderick et al., 2008).

لذا با توجه به موارد ذکر شده، هدف این پژوهش مطالعه اثر افزودن متیونین و لیزین محافظت شده شکمبه‌ای به جیره‌های حاوی سطوح مختلف پروتئین بر عملکرد تولیدی و فراسنجه‌های شکمبه‌ای گاوهای شیرده هلشتاین در اوایل دوره شیردهی بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۲۱ رأس گاو شیرده هلشتاین در اوایل دوره شیردهی (روزهای شیردهی 55 ± 10)، با میانگین تولید شیر 39 ± 2 کیلوگرم و وزن بدن $54 \pm 583/6$ کیلوگرم) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ جیره و ۷ تکرار (گاو) در هر جیره مورد استفاده قرار گرفتند. طول مدت زمان آزمایش ۳۵ روز بود که شامل ۷ روز جهت عادت‌پذیری به جیره جدید و ۲۸ روز جمع‌آوری داده‌ها بود. جیره‌های آزمایشی شامل: (۱) جیره حاوی پروتئین بالا با $17/5$ درصد پروتئین خام، (۲) جیره حاوی پروتئین متوسط با 16 درصد پروتئین خام همراه با 12 گرم در روز متیونین محافظت شده شکمبه‌ای، (۳) جیره حاوی پروتئین پایین با $14/5$ درصد پروتئین خام همراه با 14 گرم در روز متیونین محافظت شده شکمبه‌ای و 5 گرم لیزین محافظت شده شکمبه‌ای بودند (جدول‌های ۱ و ۲). به منظور تأمین کمبود متیونین و لیزین در جیره‌های آزمایشی از متیوپلاس و لیزین-۵۰ (Soda Nutrition, Italy) به ترتیب به عنوان منابع متیونین و لیزین محافظت شده شکمبه‌ای استفاده شد. مقادیر ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام و چربی تمام مواد خوراکی بر اساس روش‌های AOAC (1990)، مقادیر الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF) و الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) بر اساس روش Van Soest (1991) مورد آنالیز قرار گرفت.

منشا می‌گیرد. گاوهای شیرده تقریباً ۲۵ تا ۳۶ درصد نیتروژن مصرفی را به صورت نیتروژن شیر ترشح می‌کنند و باقیمانده آن را از طریق مدفوع و ادرار دفع می‌کنند (Leonardi et al., 2003).

یکی از راه‌های ممکن جهت کاهش دفع نیتروژن ادراری، کاهش مقدار پروتئین خام تغذیه شده به گاوهای شیرده می‌باشد. در یک پژوهش، کاهش پروتئین خام جیره غذایی گاوهای شیرده از $18/4$ به $15/1$ درصد، نیتروژن ادراری را به طور خطی کاهش داد. در حالی که کاهش پروتئین خام مصرفی توانست تولید شیر را به میزان $1/1$ کیلوگرم در روز و تولید پروتئین شیر را به میزان 100 گرم در روز کاهش دهد (Broderick., 2003). از طرفی 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 et al., 2003). متیونین و لیزین به عنوان اولین اسیدهای آمینه ضروری محدودکننده در پروتئین قابل متابولیسم گاوهای شیری شناسایی شده اند (NRC, 2001). بهینه کردن مصرف متیونین از طریق دستکاری ترکیب جیره مشکل می‌باشد، به شکلی که همیشه استفاده از مواد خوراکی مانند مکمل‌های پروتئینی بر پایه ذرت که از نظر متیونین غنی می‌باشند، به پروفیل اسید آمینه‌ایده آلی منجر نخواهد شد. در واقع، وقتی که نیاز متیونین حیوان تأمین می‌شود، ممکن است کمبود دیگر اسیدهای آمینه مانند لیزین رخ دهد (Graulet et al., 2005).

در پژوهش‌هایی که تاکنون در مورد افزودن متیونین و لیزین محافظت شده به جیره‌های کم پروتئین صورت گرفته است، عمدتاً از منابع خالص متیونین یا منابع توأم متیونین و لیزین استفاده شده است و در مطالعات محدودی از منبع خالص لیزین محافظت شده جهت تأمین لیزین مورد نیاز و همچنین متعادل کردن نسبت لیزین به متیونین استفاده شده است (Piepenbrink et al., 1996; Dinn et al., 1998; Leonardi et al., 2003; Socha et al., 2005; Broderick et al., 2008). در یک پژوهش انجام گرفته در سالهای اخیر، تأثیر افزودن لیزین هیدروکلراید به جیره غذایی گاوهای شیرده پس

جدول ۱- مواد تشکیل دهنده جیره‌های آزمایشی

(بر حسب درصد در ماده خشک)			
مواد خوراکی	جیره ۱	جیره ۲	جیره ۳
یونجه خشک	۱۸/۳۳	۱۸/۴۱	۱۸/۴۰
ذرت سیلو شده	۲۰/۳۶	۲۰/۴۵	۲۰/۴۵
دانه ذرت	۱۱/۸۱	۱۱/۸۶	۱۱/۸۶
دانه جو	۱۲/۵۴	۱۲/۶۰	۱۲/۵۹
سبوس گندم	۰/۳۷	۲/۱۸	۶/۱۹
کنجاله سویا	۱۰/۸۷	۱۰/۹۲	۶/۱۹
پنبه دانه	۷/۸۷	۷/۹۰	۷/۹۰
کنجاله منداب	۳/۸۳	۳/۸۵	۳/۸۴
کنجاله گلوتن ذرت	۲/۹۳	۰	۰
تفاله چغندر قند	۸/۱۵	۸/۱۸	۸/۱۸
پودر چربی	۰/۶۱	۱/۲۲	۱/۸۲
کربنات کلسیم	۰/۷۷	۰/۸۱	۰/۸۵
نمک	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۰
بی کربنات سدیم	۰/۸۱	۰/۸۱	۰/۸۱
دی کلسیم فسفات	۰/۱۶	۰/۱۲	۰/۱۲
مکمل ویتامینی و معدنی*	۰/۴۰	۰/۴۰	۰/۴۰
متیوپلاس	۰	۰/۱۱	۰/۱۲
لیزین-۵۰	۰	۰	۰/۰۸

* یک کیلوگرم مکمل ویتامینی و معدنی دارای ۶۰۰ هزار واحد بین المللی ویتامین A، ۲۰۰ هزار واحد بین المللی ویتامین D، ۲۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۲۵۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدان، ۱۹۵ گرم کلسیم، ۸۰ گرم فسفر، ۲۱ گرم منیزیم، ۲۲۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۳۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۳۰۰ میلی‌گرم مس، ۳۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۱۰۰۰ میلی‌گرم کبالت، ۱۲۰ میلی‌گرم ید و ۲۰ میلی‌گرم سلنیوم بود.

جدول ۲- انرژی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی

(بر حسب درصد در ماده خشک)			
انرژی خالص شیره‌دهی (مگا کالری در کیلوگرم)	جیره ۱	جیره ۲	جیره ۳
پروتئین خام (درصد)	۱۷/۵	۱۶	۱۴/۵
پروتئین قابل تجزیه در شکمبه ^۱ (درصد)	۱۱/۳	۱۱	۱۰/۲
پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه ^۲ (درصد)	۶/۲	۵	۴/۳
چربی خام (درصد)	۴/۴۵	۵/۰۷	۵/۸
کربوهیدرات‌های غیر الیافی ^۳ (درصد)	۳۴/۲۰	۳۴/۱۹	۳۳/۷۵
NDF ^۴ (درصد)	۳۶/۷۴	۳۷/۴۰	۳۸/۷۶
ADF ^۵ (درصد)	۲۳/۹۶	۲۴/۰۸	۲۴/۳۶
خاکستر خام (درصد)	۷/۹۲	۸/۱۲	۸/۲
کلسیم (درصد)	۰/۷۶	۰/۷۷	۰/۷۸
فسفر (درصد)	۰/۴۰	۰/۴۰	۰/۴۲
گوگرد (درصد)	۰/۲۷	۰/۲۸	۰/۲۸
لیزین (درصد از پروتئین قابل متابولیسم)*	۷/۱۳	۷/۵۹	۷/۷۸
متیونین (درصد از پروتئین قابل متابولیسم)*	۲/۱۵	۲/۵۲	۲/۶۱
نسبت لیزین به متیونین	۳/۳۲	۳	۳

* مقادیر برآورد شده توسط نرم‌افزار Amino Cow

همچنین مقاومت به تجزیه شکمبه‌ای و قابلیت هضم روده‌ای منبع متیونین و لیزین محافظت شده مورد استفاده به روش Berthiaume et al. (2000) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳) و از این داده‌ها جهت فرموله کردن جیره‌های آزمایشی به وسیله نرم‌افزار جیره‌نویسی Amino Cow, Mepron Ration Evaluator 3.5 استفاده گردید. این روش به ترتیب شامل انکوباسیون کیسه‌های حاوی مکمل آمینو اسیدی محافظت شده شکمبه‌ای به مدت ۴/۵ ساعت در مایع شکمبه از طریق فیستولای شکمبه‌ای، سپس انکوباسیون در محلول پپسین- اسیدکلریدریک به مدت ۲/۵ ساعت و سپس عبور دادن کیسه‌ها از طریق کانولای دئودنومی و استفاده از تکنیک Mobile nylon bag و در نهایت جمع‌آوری کیسه‌ها از مدفوع و اندازه‌گیری میزان اسید آمینه باقی مانده می‌باشد. مقادیر اسید آمینه ناپدید شده در شکمبه، پس از شکمبه، کل دستگاه گوارش، مقاومت شکمبه‌ای، قابلیت هضم روده‌ای و اسید آمینه فراهم در روده باریک منبع اسید محافظت شده شکمبه‌ای اسید آمینه با استفاده از معادلات زیر برآورد گردید (Berthiaume et al., 2000):

AA disappearance in the rumen = [(AA in original bags - AA left after 4.5 h in the rumen)/AA in original bags] * 100

Ruminal resistance = 100 - AA disappearance in the rumen

AA disappearance in the postrumen = [(AA left after 4.5 h in the rumen - AA left after pepsin-HCL incubation and intestinal digestion) / AA left after 4.5 h in the rumen] * 100

AA disappearance in the total tract = [(AA disappearance in the rumen - AA disappearance in the postrumen

Postruminal digestibility = AA disappearance in the postrumen / (100 - AA disappearance in the rumen

AA available in small intestine = AA disappearance in the postrumen * (100 - AA disappearance in the rumen

تغذیه گاوها به صورت انفرادی بود و خوراک مصرفی، روزانه ۲ بار در دو وعده صبح (ساعت ۸) و بعدازظهر (ساعت ۱۴) به صورت کاملاً مخلوط شده و در حد اشتها به گاوها داده شد. به دلیل اینکه، مقادیر مکمل‌های

1. Rumen Degradable Protein
2. Rumen Undegradable Protein
3. Non Fibrous Carbohydrates
4. Neutral Detergent Fiber
5. Acid Detergent Fiber

منظور تعیین NEFA و BHBA به آزمایشگاه دامپزشکی مینا ارسال گردید. تخمین نیتروژن دفعی از طریق ادرار با استفاده از غلظت نیتروژن اوره‌ای شیر و وزن بدن با استفاده از معادله Kuffman & St. Pierre (2001) انجام شد. همچنین نمونه‌های مواد خوراکی و مکمل‌های اسید آمینه‌ای جهت اندازه‌گیری مقدار متیونین و لیزین به آزمایشگاه مسعود واقع در تهران ارسال گردید و با استفاده از روش کروماتوگرافی با عملکرد بالا (HPLC) مورد آنالیز قرار گرفت.

با توجه به تکرار شدن برخی از داده‌ها در طول زمان مانند ماده خشک مصرفی و تولید و ترکیبات شیر، آنالیز این داده‌ها به صورت repeated measurement و با رویه MIXED و نرم‌افزار آماری SAS (1998) انجام شد. همچنین دام‌ها بر اساس شکم‌زایش به ۲ بلوک یک شکم‌زا و چند شکم‌زا تقسیم بندی شدند به طوری که از تعداد ۲۱ دام مورد استفاده، ۶ دام یک شکم‌زا و ۱۵ دام چند شکم‌زا بودند. مدل آماری مورد استفاده برای آنالیز این داده‌ها به صورت زیر بود:

$$y_{ij} = \mu + T_i + P_j + T_i P_j + B_k + A_1(T_i) + b_1 \text{Milk} + b_2 \text{DIM} + e_{ijkl}$$

y_{ij} : متغیر وابسته

μ : میانگین کل y

T_i : اثر تیمار ($i = 1, 2, 3$)

P_j : اثر زمان نمونه‌گیری ($j = 1, 2, 3, 4$)

B_k : اثر بلوک ($k = 1, 2$)

$T_i P_j$: اثر متقابل تیمار و زمان

$A_1(T_i)$: اثر تصادفی حیوان داخل تیمار

b_1 : ضریب تابعیت متغیر وابسته از شیر اولیه

Milk: شیر اولیه دام‌ها در هنگام شروع آزمایش

b_2 : ضریب تابعیت متغیر وابسته از روزهای شیردهی

DIM: روزهای شیردهی دام‌ها در هنگام شروع آزمایش

e_{ijkl} : اثر اشتباه آزمایشی

مدل آماری مورد استفاده برای آنالیز سایر داده‌ها که تکرار در طول زمان نداشتند (مانند فراسنج‌های شکم‌ه‌ای)، به صورت زیر بوده و به منظور آنالیز این داده‌ها از نرم‌افزار آماری SAS (1998) و Proc GLM استفاده گردید:

$$y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + e_{ij}$$

اسید آمینه‌ای نسبت به کل خوراک مصرفی بسیار کم بوده و در صورت نصف شدن و افزودن به هر دو وعده به صورت مساوی، امکان بروز اشتباه و عدم مصرف کامل مکمل اسید آمینه‌ای وجود داشت، به منظور اطمینان بیشتر ترجیح داده شد که به صورت سرک بر روی وعده خوراک صبح ریخته شود (Blum et al., 1999; Robinson et al., 1998). میزان مصرف خوراک روزانه به صورت انفرادی اندازه‌گیری شد. جهت محاسبه تغییرات وزن بدن گاوها، وزن‌کشی در ابتدا و انتهای دوره آزمایشی در دو روز متوالی انجام گردید. جهت تعیین شیر تولیدی و ترکیبات آن، چهار بار در هفته رکوردگیری و نمونه برداری انجام گرفت و نمونه‌های شیر جهت تعیین میزان درصد چربی، پروتئین و نیتروژن اوره‌ای شیر به آزمایشگاه شیر شهریار ارسال گردید و با استفاده از دستگاه میلکو اسکن (Foss Electric, Denmark) مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین نمونه‌گیری از مایع شکمبه در روز ۲۸ آزمایش، ۴ ساعت بعد از خوراک‌دهی صبح و با استفاده از لوله معدی و یک پمپ خلاء جهت اندازه‌گیری میزان اسیدهای چرب فرار، غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه و pH مایع شکمبه انجام شد. pH شکمبه به وسیله دستگاه pH متر رومیزی و غلظت آمونیاک شکمبه توسط روش تیتراسیون Crooke & Simpson (1971) انجام شد. نمونه‌های مایع شکمبه مورد استفاده جهت اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار و غلظت آمونیاک شکمبه به وسیله افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۵۰ درصد به ۵۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد. غلظت اسیدهای چرب فرار به روش گاز کروماتوگرافی (GC) در آزمایشگاه تغذیه دام گروه علوم دامی دانشگاه تهران انجام گرفت. در روز بیست و هفتم آزمایش و ۴ ساعت پس از خوراک‌دهی، خون‌گیری از سیاهرگ دمی توسط لوله‌های تحت خلاء (ونوجکت) انجام شد. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه انتقال و توسط دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳ هزار به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و پلاسما نمونه‌ها جداسازی شد. به منظور جلوگیری از انعقاد از هیپارین استفاده شد. پلاسما به دست آمده در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از اتمام آزمایش به

عملکرد تولیدی

ماده خشک، تغییرات وزن بدن، تولید شیر، شیر تصحیح شده بر اساس ۳/۵ درصد چربی (FCM ۳/۵)، درصد و مقدار چربی شیر تولیدی گاوها تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت (جدول ۴). ولی درصد و مقدار پروتئین شیر تولیدی و میزان نیتروژن اوره‌ای شیر به طور معنی‌داری تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار گرفت ($P < 0.05$). عدم تأثیر جیره‌های آزمایشی بر ماده خشک مصرفی و تغییرات وزن بدن با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد (Holter et al., 1982; Davidson et al., 2003; Broderick et al., 2008) که نشان‌دهنده عدم تشدید تعادل منفی انرژی با کاهش سطح پروتئین جیره تا ۱۴/۵ درصد می‌باشد. اگرچه برخی از مطالعات عدم کاهش تولید شیر در اثر کاهش درصد پروتئین خام جیره غذایی گاوهای شیری در اوایل دوره شیردهی از ۱۸/۹ به ۱۶ درصد پروتئین خام را مشاهده کرده‌اند (Leonardi et al., 2003)، ولی Broderick et al. (2008) گزارش کردند که کاهش درصد پروتئین خام تا ۱۴/۸ درصد منجر به کاهش معنی‌داری در میزان تولید شیر گردید که با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر مطابقت ندارد. در مطالعات اخیر که به بررسی تأثیر مکمل کردن جیره‌های کم پروتئین با اسیدهای آمینه محافظت شده شکمبه‌ای پرداخته‌اند (Leonardi et al., 2003; Socha et al., 2005; Broderick et al., 2008) از طریق افزودن غلات، انرژی حاصل از مکمل‌های پروتئینی که در جیره‌های کم پروتئین حذف شده اند را تأمین کرده‌اند. در حالی که در مطالعه حاضر، با استفاده از افزایش سطح مصرف مکمل چربی این کار انجام گرفت که احتمال دارد علت عدم افت تولید در جیره ۱۴/۵ درصد پروتئین خام باشد. زیرا با وجود اینکه، مقدار انرژی جیره‌ها در آزمایشات قبلی یکسان بود، ولی نوع مواد خوراکی جایگزین شده و قابلیت تخمیر آنها در شکمبه نیز مهم است که می‌تواند به واسطه تأثیر بر متابولیسم شکمبه‌ای تفسیر نتایج را مشکل نماید (Broderick et al., 2008). Wang et al. (2010) تأثیر افزودن مکمل متیونین، لیزین یا متیونین و لیزین در جیره حاوی ۱۶/۴ درصد پروتئین که بر اساس توصیه‌های NRC (2001) دارای کمبود ۱۰ درصدی

متغیر وابسته y_{ijkl} :

μ: میانگین کل y

 A_i : اثر جیره آزمایشی ($i = 1, 2, 3$) B_j : اثر بلوک ($j = 1, 2$) ϵ_{ij} : اثر اشتباه آزمایشی

به منظور مقایسه میانگین‌ها از روش Duncan استفاده گردید و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

میزان و فراهمی اسیدهای آمینه در منابع اسیدآمینه‌ای محافظت شده شکمبه‌ای

میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده اسید آمینه در منابع اسید آمینه محافظت شده شکمبه‌ای به مقادیر گزارش شده توسط شرکت سازنده نزدیک بود (به ترتیب ۹۶/۳۹ و ۹۴ درصد مقادیر گزارش شده توسط شرکت سازنده برای متیوپلاس و لیزین-۵۰). با توجه به اینکه روش محافظت هر دو منبع اسید آمینه به روش میکرو انکپسولاسیون (Microencapsulation) در یک غشا چربی می‌باشد، هر دو منبع اسید آمینه دارای روند مشابهی از ناپدید شدن در شکمبه، پس از شکمبه، کل دستگاه گوارش، قابلیت هضم روده‌ای و اسید آمینه قابل دسترس بودند. البته مقاومت شکمبه‌ای و میزان اسید آمینه قابل دسترس برآورد شده برای مکمل لیزین محافظت شده نسبت به مکمل متیونین محافظت شده کمتر بود (جدول ۳).

جدول ۳- میزان و ناپدید شدن اسید آمینه از منابع اسیدآمینه‌ای محافظت شده شکمبه‌ای در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش

لیزین-۵۰	متیوپلاس	
۵۰	۵۵	میزان اسید آمینه ^۱ (درصد)
۴۷ ± ۰/۹۰	۵۳ ± ۱/۲۰	میزان اسید آمینه ^۲ (درصد)
۳۹/۴۵ ± ۱/۲۱	۳۱/۴۹ ± ۱/۳۹	شکمبه (درصد)
۵۶/۶۷ ± ۲/۳۵	۶۶/۱۶ ± ۱/۰۳	پس از شکمبه (درصد)
۹۶/۱۲ ± ۳/۷۹	۹۷/۶۵ ± ۲/۴۳	کل دستگاه گوارش (درصد)
۶۰/۵۵ ± ۱/۲۱	۶۸/۵۱ ± ۱/۳۹	مقاومت شکمبه‌ای (درصد)
۹۳/۵۹ ± ۴/۰۶	۹۶/۵۷ ± ۱/۴۱	قابلیت هضم روده‌ای (درصد)
۳۴/۳۱ ± ۳/۱۵	۴۵/۳۳ ± ۱/۶۸	اسید آمینه قابل دسترس (درصد)

۱. مقادیر گزارش شده توسط شرکت سازنده

۲. مقادیر اندازه‌گیری شده

پروتئین قابل متابولیسم بیان شده است، تأمین کنند. ولی (Lapierre et al., 2006) پیشنهاد کردند که به علت رقابت بین مسیرهای متابولیکی، بیان کردن احتیاجات به صورت نسبت، از صحت کافی برخوردار نیست. Patton (2009) پیشنهاد کرد که افزودن متیونین محافظت شده شکمبه‌ای بصورت مقادیر گرمی جهت تأمین احتیاجات روزانه متیونین بدون توجه به درصد از پروتئین قابل متابولیسم، روش مناسبتری جهت توصیف احتیاجات در شرایط تغذیه عملی می‌باشد. احتمالاً این نوع تأمین احتیاجات مخصوصاً در شرایط تغذیه جیره‌های کم پروتئین کاربردی تر و صحیح تر خواهد بود. لذا در این پژوهش نیز تأمین احتیاجات متیونین و لیزین بر اساس گرم در روز صورت گرفت.

پروتئین قابل متابولیسم بود را مطالعه کردند و گزارش کردند که جیره دارای مکمل متیونین موجب بهبود مقدار چربی شیر شده و جیره‌های دارای مکمل متیونین، لیزین یا متیونین و لیزین موجب افزایش تولید شیر و بهبود راندمان مورد استفاده قرار گرفتن نیتروژن برای تولید پروتئین شیر گردید که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در مطالعه این محققین، از یکی از آنالوگهای مایع متیونین (-2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid, HMB) به عنوان منبع متیونین و از لیزین هیدروکلراید به عنوان منبع لیزین استفاده شد. اگرچه آنها تلاش کرده‌اند که با استفاده از مکمل لیزین و متیونین، نیازهای توصیه شده این اسیدهای آمینه توسط NRC (2001) را که به صورت درصدی از

جدول ۴- اثر جیره‌های آزمایشی بر تولید و ترکیبات شیر، ماده خشک مصرفی و تغییرات وزن بدن گاوها

P	SEM	جیره ۳	جیره ۲	جیره ۱	جیره‌های آزمایشی
Ns	۱/۳۱	۲۴/۹۱	۲۵/۲۲	۲۴/۴۹	ماده خشک مصرفی (کیلوگرم در روز)
Ns	۰/۰۸۲	-۰/۱۴	-۰/۲۱	-۰/۱۶	تغییرات وزن بدن (کیلوگرم در روز)
Ns	۱/۹۳	۳۸/۷۳	۳۹/۳۱	۳۹/۰۸	تولید شیر (کیلوگرم در روز)
Ns	۱/۹۸	۳۷/۷۶	۳۹/۸۷	۳۸/۳۶	تولید شیر تصحیح شده بر اساس ۳/۵٪ چربی (کیلوگرم در روز)
*	۰/۲۶	۲/۸۶ ^b	۳/۰۸ ^a	۲/۹۰ ^b	درصد پروتئین شیر
*	۰/۰۳۶	۱/۱۱ ^b	۱/۳۴ ^a	۱/۲۵ ^{ab}	پروتئین شیر تولیدی (کیلوگرم در روز)
Ns	۰/۱۷	۳/۳۵	۳/۵۹	۳/۴۶	درصد چربی شیر
Ns	۰/۰۷۲	۱/۳۰	۱/۴۱	۱/۳۴	چربی شیر تولیدی (کیلوگرم در روز)
*	۱/۵۲	۱۰/۴۹ ^c	۱۵/۷۳ ^b	۱۷/۲۹ ^a	نیتروژن اوره‌ای شیر (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)
*	۱/۱۳	۲۸/۹۳ ^a	۲۵/۷۶ ^{ab}	۲۴/۱۲ ^b	بازده نیتروژن جهت تولید شیر (درصد)

a, b, c حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد.

*: معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ ، ns: غیر معنی‌دار

متیونین جهت سنتز پروتئین شیر ۳ به ۱ توصیه شده و لیزین به عنوان دومین اسید آمینه محدودکننده سنتز پروتئین شیر بعد از متیونین گزارش شده است (Schwab et al., 1992; NRC, 2001)، ولی افزودن مکمل متیونین و لیزین و همچنین حفظ نسبت لیزین به متیونین در میزان ۳ به ۱ نتوانست از کاهش پروتئین شیر در جیره حاوی ۱۴/۵ درصد پروتئین جلوگیری کند. این نتایج با نتایج به دست آمده از مطالعات قبل که تغذیه سطوح پروتئین خام کمتر از ۱۵ درصد را مورد بررسی قرار داده بودند، مطابقت دارد (Piepenbrink et al., 1996; Broderick et al., 2008). که احتمال محدودکننده شدن اسیدهای آمینه دیگری غیر از متیونین و لیزین را

بهبود درصد پروتئین شیر در اثر افزودن مکمل متیونین محافظت شده شکمبه‌ای به جیره غذایی گاوهای شیرده مشاهده شد (Berthiam et al., 2006; Patton, 2010)، که این پاسخ احتمالاً به این دلیل است که متیونین به عنوان اولین اسید آمینه محدودکننده برای سنتز پروتئین شیر معرفی شده است (Schwab et al., 1992; NRC, 2001). در پژوهش حاضر، تغذیه جیره غذایی با ۱۶ درصد پروتئین خام به همراه مکمل متیونین، درصد و تولید پروتئین شیر بیشتری نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی داشت که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد (Leonardi et al., 2003; Broderick et al., 2008). از طرفی، اگرچه نسبت مناسب لیزین به

ارتباط دارند، خواهد داشت (Overton & Waldron, 2004). محققینی که تأمین متیونین در قبل از زایش و ادامه آن پس از زایش را مورد بررسی قرار داده‌اند، عمدتاً افزایش تولید شیر در طی اوایل دوره شیردهی را گزارش کرده‌اند (Soch et al., 1994; Overton et al., 1996). Davidson et al. (2008) گزارش کردند که تغذیه مکمل متیونین در یک جیره غذایی با کمبود متیونین تأثیری بر فراسنجه‌های متابولیسم انرژی مانند غلظت اسیدهای چرب استریفیه نشده، بتاهدروکسی بوتیرات و لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین نداشت. در مطالعه حاضر نیز جیره‌های غذایی کم پروتئین از نظر متیونین مورد نیاز کمبود داشته و افزودن مکمل فقط با هدف تأمین نیاز متیونین روزانه انجام گردید و به نظر می‌رسد که در جیره‌های کم پروتئین افزودن مکمل متیونین تا مقادیر مورد نیاز روزانه تأثیری بر شاخص‌های انرژی و جلوگیری از کتوز و کبد چرب نداشت. نیتروژن دفعی از طریق ادرار به طور معنی‌داری در اثر تغذیه جیره‌های آزمایشی کاهش یافت ($P < 0.05$). این یافته با نتایج به دست آمده توسط مطالعات قبلی همخوانی دارد (Cressmann et al., 1980; Dinn et al., 1998; Leonardi et al., 2003; Broderick et al., 2008). Dinn et al. (1998) و Cressmann et al. (1980)، ۷۰ گرم افزایش در نیتروژن دفعی ادراری روزانه را به ترتیب در اثر افزایش ۱/۶ درصد و ۲/۶ درصد غلظت پروتئین خام جیره‌های غذایی گاوهای شیرده مشاهده کردند. همچنین Leonardi et al. (2003) گزارش کردند که با افزایش غلظت پروتئین جیره غذایی به میزان ۲/۷ درصد، نیتروژن دفعی ادراری به میزان ۵۷ گرم در روز افزایش می‌یابد. در حالی که تغییری در میزان نیتروژن دفعی از طریق شیر یا مدفوع مشاهده نشد. شایان ذکر است که در ارتباط با آلودگی محیطی، نیتروژن ادراری تأثیر بیشتری نسبت به نیتروژن مدفوعی دارد. در

در این سطح پروتئین پیشنهاد می‌کند. کاهش درصد پروتئین خام جیره غذایی موجب کاهش معنی‌دار نیتروژن اوره‌ای شیر گردید که با نتایج گزارش شده توسط مطالعات قبلی مطابقت دارد (Leonardi et al., 2003; Davidson et al., 2003; Broderick et al., 2008). Hof et al. (1997) بیان کردند که نیتروژن اوره‌ای شیر شاخص خوبی از وضعیت تغذیه‌ای پروتئین در گاوهای شیری محسوب می‌شود. افزایش بازده نیتروژن جهت تولید پروتئین شیر که در مطالعه حاضر مشاهده شد با نتایج گزارش شده توسط مطالعات قبلی مطابقت دارد (Dinn et al., 1998; Broderick et al., 2008). یکی از شاخص‌های راندمان استفاده از نیتروژن در گاوهای شیری نسبتی از نیتروژن مصرفی است که از طریق شیر ترشح می‌شود (Schwab et al., 2005). بهبود این فراسنجه در جیره آزمایشی دارای ۱۶/۵ درصد به علت بهبود درصد پروتئین شیر، کاهش درصد پروتئین مصرفی و حفظ تولید شیر روزانه بود. در حالی که در جیره آزمایشی حاوی ۱۴/۵ درصد پروتئین خام، بالاتر بودن بازده نیتروژن عمدتاً به علت کاهش میزان پروتئین مصرفی بود.

فراسنجه‌های خونی و نیتروژن دفعی ادراری

غلظت اسیدهای چرب استریفیه نشده و بتاهدروکسی بوتیرات پلاسما تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت (جدول ۵). عدم تأثیر تغذیه جیره‌های کم پروتئین که با متیونین یا لیزین محافظت شده مکمل شده بودند، بر شاخص‌های انرژی پلاسما با نتایج مطالعات قبلی مشابهت دارد (Socha et al., 2005; Dinn et al., 1998). متیونین و لیزین نقش مهمی در بتا اکسیداسیون میتوکندریایی اسیدهای چرب در کبد (نقش در بیوسنتز کارنیتین) و خروج تری‌گلیسیریدها به صورت لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین که در بیوسنتز آپولیپوپروتئین B100 مهم بوده و با متابولیسم کولین

جدول ۵- اثر جیره‌های آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی

	SEM	جیره ۳	جیره ۲	جیره ۱	جیره‌های آزمایشی
P					
ns	۰/۰۶	۰/۳۹۷	۰/۴۲۵	۰/۳۶۳	اسیدهای چرب استریفیه نشده (میلی مول در لیتر)
ns	۰/۱۲	۰/۵۸۵	۰/۶۴۹	۰/۶۸۷	بتاهدروکسی بوتیرات (میلی مول در لیتر)
*	۱۲/۹۷	۱۷۵/۹۷ ^b	۲۰۳/۵۶ ^b	۲۴۷/۲۵ ^a	نیتروژن دفعی ادرار (گرم در روز)

a, b, c حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد.

* معنی‌دار در سطح $P < 0.05$, ns غیر معنی‌دار

موجود در شکمبه عمدتاً از دامیناسیون و دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه شاخه‌دار تولید می‌شوند (Gorosito et al., 1985). ولی کاهش پروتئین خام در پژوهش حاضر اثر معنی‌داری بر غلظت این اسیدهای چرب نداشت. که علت احتمالی آن به این دلیل است که در طراحی این آزمایش سعی شد که جهت تأمین متیونین و لیزین مورد نیاز در جیره‌های کم پروتئین از منابع اسید آمینه‌ای محافظت شده استفاده شود تا کمترین تأثیر را بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای داشته باشد. پایین‌تر بودن غلظت نیتروژن آمونیاکی در جیره دارای متیونین و لیزین نسبت به جیره دارای متیونین احتمالاً به این دلیل است که جیره دارای متیونین ۱/۵ درصد پروتئین خام کمتری بود و با توجه به خنثی بودن منابع اسید آمینه‌ای مورد استفاده در شکمبه، این یافته مورد انتظار است. کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در اثر کاهش درصد پروتئین خام جیره غذایی توسط بسیاری از مقالات گزارش شده است (Davidson et al., 2003; Broderick et al., 2008). که به علت میزان و در نتیجه مصرف کمتر پروتئین قابل تجزیه در شکمبه می‌باشد (جدول ۲). Satter & Slyter (1974) گزارش کردند که غلظت‌های نیتروژن آمونیاکی بالاتر از ۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بر تولید پروتئین میکروبی در محیط‌های کشت پیوسته اثری نداشت و احتیاجات نیتروژنی میکروب‌های شکمبه با این غلظت تأمین می‌شود و غلظت نیتروژن آمونیاکی ذکر شده با تغذیه جیره‌های حاوی ۱۴ درصد پروتئین خام تأمین خواهد شد (Satter & Roffler, 1975).

جیره‌های با غلظت پایین پروتئین خام، مدفوع مسیر اصلی دفع نیتروژن است، در حالی که با افزایش سطح پروتئین جیره غذایی، دفع ادراری نیتروژن افزایش یافته و می‌تواند تا ۷۰ درصد نیتروژن مازاد بر نیاز دام از طریق ادرار دفع شود (Castillo et al., 2001).

فراسنجه‌های شکمبه‌ای

نسبت‌های مولی اسیدهای چرب فرار، غلظت کل اسیدهای چرب فرار، نسبت استات به پروپیونات و pH شکمبه تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت ولی کاهش پروتئین جیره غذایی به طور معنی‌داری موجب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه گردید (جدول ۶). عدم تأثیر کاهش پروتئین جیره غذایی بر نسبت مولی استات، پروپیونات و دیگر اسیدهای چرب فرار که در این مطالعه مشاهده گردید، با نتایج به دست آمده در مطالعات قبلی که سطوح پروتئین مشابهی با سطوح پروتئین مورد استفاده در مطالعه حاضر را مورد بررسی قرار داده بودند، مطابقت دارد (Holter et al., 1982; Davidson et al., 2003; Broderick et al., 2008). به طوری که (Briderick et al., 2008) تفاوت معنی‌دار در غلظت مولی استات، پروپیونات و کل اسیدهای چرب فرار را فقط بین سطوح ۱۸/۹ درصد و ۱۴/۸ درصد پروتئین خام جیره غذایی مشاهده کردند، البته کاهش میزان کنجاله سویا انجام گرفت، جیره حاوی ۱۴/۸ درصد پروتئین خام نسبت به جیره حاوی ۱۸/۹ درصد پروتئین بیش از ۲ درصد در ماده خشک مقدار پروتئین قابل تجزیه در شکمبه کمتری داشت. اسیدهای چرب والرات، ایزووالرات و دیگر اسیدهای چرب شاخه‌دار

جدول ۶- اثر جیره‌های آزمایشی بر فراسنجه‌های شکمبه‌ای

جیره‌های آزمایشی	جیره ۱	جیره ۲	جیره ۳	SEM	P
استات (میکرو مولار)	۶۳/۵۰	۶۰/۶۰	۵۳/۱۸	۴/۹۹	ns
پروپیونات (میکرو مولار)	۲۱/۵۵	۲۰/۸۵	۱۹/۲۲	۱/۰۹	ns
بوتیرات (میکرو مولار)	۱۰/۵۳	۹/۸۳	۹/۱۵	۰/۸۷	ns
والرات (میکرو مولار)	۱/۶	۱/۲۵	۱/۱۳	۰/۱۸	ns
ایزووالرات (میکرو مولار)	۰/۸۸	۰/۷۷	۰/۶۵	۰/۱۸	ns
کل اسیدهای چرب فرار (میکرو مولار)	۹۷/۰۵	۹۳/۳۰	۸۳/۳۳	۵/۷۴	ns
نسبت استات به پروپیونات	۳/۱۲	۲/۹۰	۲/۷۹	۰/۲۷	ns
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۱۱/۰۱ ^a	۹/۸۷ ^{ab}	۷/۱۷ ^b	۱/۰۷	*
pH مایع شکمبه	۶/۳۶	۶/۳۰	۶/۰۱	۰/۱۲	ns

a,b,c حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد.

*: معنی‌دار در سطح $P < 0.05$, ns: غیر معنی‌دار

که جیره غذایی دارای ۱۶ درصد پروتئین خام به همراه مکمل متیونین عملکرد بهتری نسبت به سایر جیره‌های آزمایشی داشت. همچنین در هنگام تغذیه جیره‌های کم پروتئین، تأمین انرژی جیره از طریق مکمل‌های چربی به جای غلات از افت شیر در این جیره‌ها می‌تواند جلوگیری کند.

سپاسگزاری

از کارکنان گروه علوم دامی و همچنین از آزمایشگاه تغذیه و ایستگاه تحقیقات دامپروری گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

ولی Reynal (2004) بیان نمود که غلظت‌های آمونیاک بالاتر از ۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر ممکن است جهت حداکثر کردن ساخت پروتئین میکروبی در شرایط *In vivo* مورد نیاز باشد و آمونیاک مورد نیاز با افزایش قابلیت تخمیر سوبسترا افزایش یابد. همچنین Olmos Comeneloro & Broderick (2006) با مقایسه سطوح پروتئین از ۱۳/۵ تا ۱۹/۴ درصد نتیجه‌گیری کردند که تغذیه جیره غذایی با ۱۶/۸ درصد پروتئین خام برای حداکثر کردن جریان پروتئین میکروبی به روده باریک گاوهای شیرده کافی است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نشان می‌دهد

REFERENCES

1. Association of Official Analytical Chemists. (1990). *Official Methods of Analysis*. Arlington, VA.
2. Berthiaume, R., Lapierre, H., Stevenson, M., Cote, N. & McBride, B. W. (2000). Comparison of the In Situ and In Vivo Intestinal Disappearance of Ruminally Protected Methionine. *Journal of Dairy Science*, 83, 2049-2056.
3. Berthiaume, R., Thivierge, M. C., Patton, R. A., Dubreuil, P., Stevenson, M., McBride, B. W. & Lapierre, H. (2006). Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 1621-1634.
4. Berthiaume, R., Thivierge, M. C., Patton, R. A., Dubreuil, P., Stevenson, M., McBride, B. W. & Lapierre, H. (2006). Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 1621-1634.
5. Blum, J. W., Bruckmaier, R. M. & Jans, F. (1999). Rumen-Protected Methionine Fed to Dairy Cows: Bioavailability and Effects on Plasma Amino Acid Pattern and Plasma Metabolite and Insulin Concentrations. *Journal of Dairy Science*, 82, 1991-1998.
6. Broderick, G. A. (2005). Feeding Dairy Cows to Minimize Nitrogen Excretion. In: *Proceeding of Tri-State Dairy Nutrition Conference*. 137-152.
7. Broderick, G. A. (2003). Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86, 1370-1381.
8. Broderick, G. A., Stevenson, M. J., Patton, R. A., Lobos, N. E. & Olmos Colmenero, J. J. (2008). Effect of Supplementing Rumen-Protected Methionine on Production and Nitrogen Excretion in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 91, 1092-1102.
9. Castillo, A. R., Kebreab, E., Beever, D. E., Barbi, J. H., Sutton, J. D., Kirby, H. C. & France, J. (2001). The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *Journal of Dairy Science*, 79, 247-253.
10. Cressman, S. G., Grieve, D. G., Macleod, G. K., Wheeler, E. E. & Young, L. G. (1980). Influence of dietary protein concentration on milk production of dairy cattle in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 63, 1839-1847.
11. Davidson, S., Hopkins, B. A., Odle, J., Brownie, C., Fellner, V. & Whitlow, L. W. (2008). Supplementing Limited Methionine Diets with Rumen-Protected Methionine, Betaine, and Choline in Early Lactation Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 91, 1552-1559.
12. Davidson, S., Hopkins, B. A., Diaz, D. A., Bolt, S. M., Brwnie, C., Fellner, V. & Witlow L. W. (2003). Effect of Amount and Degradability of Dietary Protein on Lactation, Nitrogen Utilization, and Excretion in Early Lactation Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 86, 1681-1689.
13. Dinn, N. E., Shelford, J. A. & Fisher, L. J. (1998). Use of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System and Rumen-Protected Lysine and Methionine to Reduce Nitrogen Excretion from Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 229-237.
14. Gorosito, A. R., Russell, J. B. & Van Soest, P. J. (1985). Effect of Carbon-4 and Carbon-5 Volatile Fatty Acids on Digestion of Plant Cell Wall in Vitro. *Journal of Dairy Science*, 68, 840-847.
15. Graulet, B., Richard, C. & Robert, J. C. (2005). Methionine Availability in Plasma of Dairy Cows

- Supplemented with Methionine Hydroxy Analog Isopropyl Ester. *Journal of Dairy Science*, 88, 3640-3649.
16. Hof, G., Vervoorn, M. D., Lenaers, P. J. & Tamminga, S. (1997). Milk Urea Nitrogen as a Tool to Monitor the Protein Nutrition of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 80, 3333-3340.
 17. Holter, J. B., Byrne, J. A. & Schwab, C. G. (1982). Crude Protein for High Milk Production. *Journal of Dairy Science*, 65, 1175-1188.
 18. Kauffman, A. J. & St. Pierre, N. (2001). The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 84, 2284-2294.
 19. Lapierre, H., Pacheco, D., Berthiaume, R., Ouellet, D. R., Schwab, C. G., Dubreuil, P., Holtrop, G. & Lobley, G. E. (2006). What is the true supply of amino acids for a dairy cow? *Journal of Dairy Science*, 89(E Suppl.), E1-E14.
 20. 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, 4033-4042.
 21. National Research Council. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th Rev. Edition. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
 22. Olmos Colmenro, J. J. & Broderick, G. A. (2006). Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 1704-1712.
 23. Overton, T. R. & Waldron, M. R. (2004). Nutritional Management of Transition Dairy Cows: Strategies to Optimize Metabolic Health. *Journal of Dairy Science*, 87(E. Suppl.), E105-E119.
 24. Patton, R. A. (2009). The strategic use of ruminally protected amino acids in dairy nutrition. In: *Proceedings of Florida Ruminant Nutrition Symposium*. (Pp. 39-51). University of Florida, Gainesville.
 25. Patton, R. A. (2010). Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 93, 2105-2118.
 26. Piepenbrink, M. S., Overton, T. R. & Clark, J. H. (1996). Response of Cows Fed a Low Crude Protein Diet to Ruminally Protected Methionine and Lysine. *Journal of Dairy Science*, 79, 1636-1646.
 27. Reynal, S. M. (2004). *Nitrogen utilization by dairy cows*. Ph. D. Dissertation. University of Wisconsin, Madison.
 28. Robinson, P. H., Chalupa, W., Sniffen, C. J., Julien, W. E., Sato, H., Watanabe, K., Fujieda, T. & Suzuki, H. (1998). Ruminally protected lysine or lysine and methionine for lactating dairy cows fed a ration designed to meet requirements for microbial and postruminal protein. *Journal of Dairy Science*, 81, 1364-1373.
 29. SAS Institute. (1998). *User's Guide: Statistics*. Version 8.2. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
 30. Satter, L. D. & Roffler, R. E. (1975). Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 58, 1219-1237.
 31. Satter, L. D. & Slyter, L. L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British Journal of Nutrition*, 32, 199-208.
 32. Schwab, C. G., Bozak, C. K., Whitehouse, N. L. & Messbah, M. M. A. (1992). Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. 1. Sequences of lysine and methionine limitation. *Journal of Dairy Science*, 75, 3486-3502.
 33. Schwab, C. G., Hahtanen, P., Hunt, C. W. & Hvelplund, T. (2005). Nitrogen Requirements of Cattle. In: E. Pfeffer and A. Hristov, (Eds.). *Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle*. CABI Publishing.
 34. Socha, M. T., Putnam, D. E., Garthwaite, B. D., Whitehouse, N. L., Kierstead, N. A., Schwab, C. G., Ducharme, G. A. & 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, 1113-1126.
 35. Socha, M. T., Schwab, C. G., Putnam, D. E., Whitehouse, N. L., Kierstead, N. A. & Garthwaite, B. D. (1994). Production responses of early lactation cows fed rumen-stable methionine or rumen-stable lysine plus methionine at two levels of dietary crude protein. *Journal of Dairy Science*, 77(Suppl.1), 93. (Abstr.).
 36. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharide in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
 37. Wang, C., Liu, H. Y., Wang, Y. M., Yang, Z. Q., Liu, J. X., Wu, Y. M., Yan, T. & Ye, H. W. (2010). Effects of dietary supplementation of methionine and lysine on milk production and nitrogen utilization in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 3661-3670.