

مقاله پژوهشی:

مقایسه الگوی جذب و کارایی منابع متیونین آزاد کریستاله مصنوعی و بانده شده به پروتئین در مرغ های گوشتی با مصرف تک وعده های خوراک

مونا زمانی^۱، مجتبی زاغری^{۲*} و فاطمه غازیانی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استاد و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲۱)

چکیده

این آزمایش به منظور مقایسه الگوی جذب و کارایی منابع مختلف متیونین شامل منابع آزاد کریستاله مصنوعی (دی-ال-متیونین (DL-Met)، ال-متیونین (L-Met) و دی پپتید (Met-Met)) و متیونین باند شده به پروتئین (PB-Met) در مرغ های گوشتی با مصرف تک وعده های خوراک انجام شد. تعداد ۱۰۰ قطعه جوجه گوشتی ماده سویه راس ۳۰۸، در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج جیره آزمایشی (پایه، DL-Met_{2.0}، L-Met_{2.0}، Met-Met_{2.0} و PB-Met_{2.0}) به دلیل مطابقت با رژیم تک وعده های نیمچه های مادر گوشتی از سن ۳۹ تا ۶۰ روزگی تغذیه شدند. در طی دوره آزمایش، میزان ۹۰ گرم خوراک پلت ۱ بار در روز به هر مرغ داده می شد که طی مدت ۱۷±۲/۵ دقیقه مصرف می گردید. نتایج نشان دادند که مکمل سازی جیره با متیونین باند شده به پروتئین (PB-Met_{2.0}) موجب بهبود معنی دار (P<۰/۰۱) عملکرد رشد در مقایسه با مصرف آمینو اسیدهای مصنوعی شد. حداکثر غلظت متیونین پلاسمای خون، ۱ ساعت پس از مصرف جیره های حاوی DL-Met_{2.0} و Met-Met_{2.0} و ۲ ساعت بعد از مصرف جیره های حاوی PB-Met_{2.0} و L-Met_{2.0} مشاهده شد (P<۰/۰۱). بالاترین میزان پروتئین لاشه و کارایی پروتئین (P<۰/۰۱) و همچنین پایین ترین میزان نیتروژن فضولات (P<۰/۰۵) در تیمار حاوی PB-Met_{2.0} مشاهده شد. کارایی آمینو اسیدهای ضروری خصوصاً متیونین، در مرغ های تغذیه شده با جیره حاوی PB-Met افزایش یافت (P<۰/۰۱). در نتیجه به نظر می رسد که در مرغ های گوشتی با مصرف تک وعده های خوراک، DL-Met و Met-Met به دلیل عدم همزمانی جذب با سایر آمینو اسیدها، بهره وری کمتری دارند. بنابراین همزمان سازی جذب آمینو اسید متیونین با استفاده از منابع مناسب، موجب افزایش کارایی آن می شود. در نتیجه PB-Met به عنوان منبع ترجیحی مکمل متیونین در جیره مرغ های گوشتی با مصرف تک وعده های خوراک پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی: عدم تعادل آمینو اسید، کارایی پروتئین، گلو تاتیون، نیتروژن فضولات، هموسیستین.

Comparison of the absorption kinetics and utilization of crystalline-free and protein-bound methionine sources in broilers with single-meal feed consumption

Mona Zamani¹, Mojtaba Zaghari^{2*} and Fatemeh Ghaziani³

1, 2, 3. Ph.D. Candidate, Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Apr. 28, 2020 - Accepted: Oct. 12, 2020)

ABSTRACT

This experiment was performed to compare the absorption kinetics and utilization of different methionine (Met) sources including synthetic-free crystalline DL-Met (DL-Met), L-methionine (L-Met) and dipeptide (Met-Met) and protein-bound methionine (PB-Met) in broilers with single-meal feed consumption. A total of 100 female Ross 308 broiler chickens were fed in a completely randomized design with five experimental diets (basal, DL-Met_{2.0}, L-Met_{2.0}, Met-Met_{2.0} and PB-Met_{2.0}) in accordance with compliance to the single-meal broiler breeder from 39 to 60 days of age. During experimental period, 90 grams of pellet feed was given per chicken once a day, which was consumed within 17±2.5 minutes. The results showed that dietary supplementation with PB-Met_{2.0} caused a significant improvement (P<0.01) in growth performance, compared to the consumption of synthetic amino acids. The maximum blood plasma methionine concentration was observed at 1 hour after consumption of diets containing DL-Met_{2.0} and Met-Met_{2.0} and 2 hours after consumption of diets containing PB-Met_{2.0} and L-Met_{2.0} (P<0.01). The highest carcass protein content and protein utilization efficiency (P<0.01) and also the lowest excreta nitrogen content (P<0.05) were observed in treatment containing PB-Met_{2.0}. The efficacy of essential amino acids, especially methionine was increased in chickens fed diet containing PB-Met (P<0.01). As a result, it seems that DL-Met and Met-Met have less efficiency in broilers with single-meal feed consumption, due to the lack of absorption synchronization with other amino acids. Therefore, the absorption synchronization of methionine using appropriate sources increases its efficiency. In conclusion, PB-Met is recommended as a preferred source of methionine in diet of broilers with single-meal feed consumption.

Keywords: Amino Acid Imbalance, Excreta Nitrogen, Glutathione, Homocysteine, Protein Efficiency.

* Corresponding author E-mail: mzaghari@ut.ac.ir

مقدمه

با وجود اینکه مکمل سازی جیره طیور با آمینو اسیدهای آزاد مصنوعی، همواره از جنبه‌های اقتصادی و زیست محیطی مورد توجه بوده است، نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهند که آمینو اسیدهای آزاد در شرایط محدودیت غذایی، کارایی اندکی دارند. دلیل این امر، بالا بودن سرعت جذب آمینو اسیدهای آزاد نسبت به آمینو اسیدهای موجود در ساختار پروتئین در شرایط تغذیه تک‌وعده‌ای یا محدودیت خوراک است. در نتیجه، یک مخلوط نامتعادل از آمینو اسیدها به مکان ساخت پروتئین می‌رسد و کارایی آمینو اسیدهای آزاد، کاهش می‌یابد (Yen *et al.*, 2004; Nonis & Gous, 2006). از آنجایی که در تمام دنیا مرغ‌های مادر گوشتی تحت محدودیت غذایی قرار می‌گیرند و خوراک تک‌وعده‌ای را طی مدت زمان ۲۰ تا ۳۰ دقیقه مصرف می‌کنند، این امر احتمالاً منجر به کاهش کارایی آمینو اسیدهای کریستاله و برآورد بالاتر احتیاجات آن‌ها به میزان ۱۰ تا ۳۰ درصد خواهد شد. محققان در آزمایشی پاسخ مرغ‌های مادر گوشتی را به مکمل سازی جیره با لیزین و متیونین مصنوعی، بررسی و کاهش میزان تخم‌گذاری، بازده تولید تخم‌مرغ و کارایی متیونین را گزارش کردند (Nonis & Gous, 2006). بنابراین، ضرورت دارد راهکارهایی جهت جلوگیری از کارایی ناکافی آمینو اسیدهای کریستاله در شرایط تغذیه محدود اتخاذ گردد. یک راه حل مؤثر، همزمان سازی جذب آمینو اسیدهای آزاد و باند شده به پروتئین، با تأخیر در میزان جذب آمینو اسیدهای آزاد است (Batterham, 1974; Batterham & O'Neill, 1978; Murison, 1981; Baker & Batterham & Izquierdo, 1985). استفاده از روش کپسوله کردن آمینو اسیدها می‌تواند در کاهش نرخ آزاد سازی آن‌ها در مکان‌های جذبی روده، مؤثر باشد (Alam *et al.*, 2004). روش دیگر، ایجاد تأخیر در جذب متیونین آزاد با استفاده از منابع آهسته رهش است. یکی از این منابع، دی‌پتید متشکل از دو متیونین به هم متصل (DL-methionyl-DL-methionine, AQUAVI®) (Met-Met, Evonik Degussa)، مخلوطی از ۴ ایزومر

فضایی متیونین (LD-Met-Met, DL-Met-Met, Niu *et al.*, 2018). از آنجایی که به جز مطالعه تجزیه جامع یا متا آنالیز انجام شده توسط Nonis & Gous (2006)، مطالعه دیگری توسط محققان جهت بررسی کارایی آمینو اسیدهای مصنوعی آزاد و باند شده به پروتئین در پرندگان انجام نشده است و با توجه به اینکه متیونین اولین آمینو اسید محدود کننده در خوراک طیور است، هدف از این تحقیق بررسی اثر مکمل سازی متیونین آزاد، آهسته رهش و باند شده به پروتئین بر عملکرد، کینتیک جذب و کارایی پروتئین و آمینو اسیدها در جوجه‌های ماده گوشتی با مصرف تک وعده‌ای خوراک به عنوان الگویی برای بررسی اثر محدودیت خوراک در مرغ‌های مادر گوشتی، بوقلمون و یا هر پرنده دیگری با محدودیت خوراک و یا مصرف تک‌وعده‌ای خوراک بر کارایی آمینو اسیدها بود.

مواد و روش‌ها

روند اجرا و طرح آزمایش

این پژوهش با استفاده از جوجه‌های گوشتی یک روزه ماده سویه تجاری راس ۳۰۸، به عنوان الگوی نیمچه‌های سویه گوشتی با مصرف تک‌وعده‌ای خوراک از سن صفر تا ۶۰ روزگی انجام شد. تعیین جنسیت جوجه‌ها از طریق تفاوت سرعت رشد پرهای اولیه و پوششی (Auto sexing) در سن یک روزگی توسط کارخانه جوجه‌کشی انجام شد. تغذیه جوجه‌ها در دوره‌های آغازین و رشد تا پایان سن ۳۸ روزگی بر اساس احتیاجات مواد مغذی سویه تجاری راس ۳۰۸ (۲۰۱۶) به‌طور آزاد و به شکل فیزیکی آردی انجام شد.

تیمارهای آزمایشی در دوره پایانی به مدت ۳ هفته از سن ۳۹ تا ۶۰ روزگی با اعمال محدودیت غذایی، اعمال شدند. قبل از اعمال تیمارهای آزمایشی، ۱۰ روز عادت‌دهی جهت اجرای محدودیت غذایی در نظر گرفته شد، به‌طوری‌که در پایان دوره عادت‌دهی، ۱۶ ساعت محدودیت نوری از ساعت ۴ بعد از ظهر تا ساعت ۸ صبح روز بعد اعمال گردید. در طی دوره آزمایش، میزان ۹۰ گرم دان پلت به منظور کاهش زمان مصرف خوراک، ۱ بار در روز (ساعت ۸ صبح) به

مغذی جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ نشان داده شده است.

فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده در طول دوره آزمایش صفات عملکرد

در طی دوره آزمایشی ۳ هفته‌ای، میزان مصرف خوراک ۹۰ گرم به ازای هر مرغ در روز بود. وزن بدن، میزان افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک به طور هفتگی برای هر گروه محاسبه و در طی دوره آزمایشی ۳ هفته‌ای بیان شدند. میزان تلفات نیز به صورت روزانه ثبت شد.

سنجش فراسنجه‌های خون

جهت سنجش غلظت متیونین پلاسماي خون، در سن ۵۹ روزگی، ۲ قطعه پرنده از هر تکرار با وزن مشابه با میانگین وزن گروه به‌طور تصادفی انتخاب و خونگیری از ورید زیر بال در زمان صفر (قبل از مصرف خوراک) و سپس در فواصل زمانی مشخص پس از مصرف خوراک (۱، ۲ و ۳ ساعت پس از مصرف خوراک) انجام شد. نمونه‌های خون در داخل لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (K_2 EDTA) ریخته شدند و جدا سازی پلاسماي خون با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. جهت سنجش غلظت آمینو اسیدها در پلاسماي خون، نمونه‌ها با استفاده از متانول، پروتئین‌زدایی و سنجش با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با کارایی بالا (Agilent 1200 HPLC, USA) و آشکارساز فلورسنت انجام شد (Henderson *et al.*, 2000; Bartolomeo & Maisano, 2006).

برای بررسی وضعیت سوخت و ساز آمینو اسید متیونین، غلظت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز (AST-SGOT)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT-SGPT)، گلوکوتاتیون اکسید (GSSG) و گلوکوتاتیون احیا (GSH) در سرم خون و غلظت هموسیستئین در پلاسماي خون سنجش شد. جهت این امر، نمونه‌های خون در پایان دوره آزمایش (سن ۶۰ روزگی) از ورید زیر بال ۲ قطعه پرنده در هر تکرار گرفته و نمونه‌های خون در لوله‌های بدون خلأ حاوی مواد فعال کننده

هر مرغ داده می‌شد، که نهایتاً طی مدت $17 \pm 2/5$ دقیقه مصرف می‌گردید. مقدار دان و زمان اعمال محدودیت غذایی مطابق با شرایط اجرای محدودیت غذایی در مرغ‌های مادر گوشتی بود. هر تیمار دارای ۴ تکرار (واحد آزمایشی از نوع قفس باطری گرم) و ۵ قطعه جوجه در هر واحد آزمایشی بود. قفس‌های باطری ۴ طبقه از جنس توری سیمی گالوانیزه بودند. ارتفاع پایین‌ترین طبقه از زمین، ۲۴ سانتی‌متر و ابعاد هر طبقه $90 \times 78 \times 40$ سانتی‌متر بود. در قسمت طولی قفس یک دان‌خوری ناودانی و در عرض آن یک آب‌خوری ناودانی وجود داشت. عرض دهانه آب‌خوری و دان‌خوری در قسمت فوقانی ۱۰ سانتی‌متر بود. کف هر طبقه از قفس با توری مشبک پوشیده شده و سینی مخصوص جمع‌آوری فضولات در زیر آن تعبیه شده بود.

تیمارهای آزمایشی طبق جداول احتیاجات مواد مغذی سویه تجاری راس ۳۰۸ (۲۰۱۶) تنظیم شدند. تیمارهای آزمایشی حاوی ۲۹۷۱-۲۹۵۱ کیلوکالری انرژی قابل سوخت و ساز در هر کیلوگرم) و $176/7$ - $172/7$ گرم در کیلوگرم پروتئین خام بودند. قبل از تنظیم جیره‌های آزمایشی، میزان ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام، خاکستر و آمینو اسیدهای مواد خوراکی با استفاده از روش‌های استاندارد (AOAC, 1990) تعیین گردید. میزان آمینو اسیدهای موجود در مواد خوراکی پس از هیدرولیز اسیدی و میزان آمینو اسیدهای گوگرددار پس از اکسیداسیون با اسید پرفرمیک ۸۸٪ همراه با هیدرولیز اسیدی با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی (IEC) اندازه‌گیری شد (AOAC, 1990). جیره‌های غذایی بر اساس مقادیر آنالیز شده اجزای تشکیل دهنده خوراک، تنظیم شدند. تیمارهای آزمایشی حاوی منابع مختلف متیونین کریستاله شامل (DL-Met، L-Met و Met-Met) و منبع متیونین باند شده به پروتئین (PB-Met) به میزان ۲ گرم در کیلوگرم جهت مقایسه منابع مختلف متیونین بودند. پس از تجزیه شیمیایی مواد خوراکی موجود در کشور، پودر ماهی و کنجاله کلزا به عنوان منابع غنی از متیونین باند شده با پروتئین، انتخاب شدند. اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب مواد

GSH با استفاده از کیت‌های تجاری (ZellBio GmbH Assay kits, Germany) اندازه‌گیری میزان هموسیستئین پلاسمای خون با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با کارایی بالا (Agilent HPLC, USA) و آشکارساز فلورسنت صورت گرفت (Ubbink *et al.*, 1991; Gilfix *et al.*, 1997; Pfeiffer *et al.*, 1999).

لخته (Clot activator) برای جداسازی سرم و لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون (K₂ EDTA) جهت جدا سازی پلاسما، ریخته شدند. پس از جدا سازی سرم و پلاسما، فعالیت آنزیم‌های ALT و AST به کمک دستگاه اتوآنالیزر اسپکتروفتومتری با استفاده از کیت‌های تشخیصی شرکت پارس‌آزمون (Parsazmun, Tehran, Iran) و سنجش فعالیت آنزیم‌های GSSG و

جدول ۱. اجزای تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های آزمایشی (گرم در کیلوگرم به جز مواردی که متفاوت قید شده است)

Table 1. The ingredients and nutrients composition of experimental diets (g/kg, unless otherwise stated)

	Dietary treatments				
	Basal	DL-Met _{2.0}	L-Met _{2.0}	Met-Met _{2.0}	DL-Met _{0.0} PB-Met _{2.0}
Maize	678.5	678.5	678.5	678.5	680.0
Soybean meal	285.7	285.7	285.7	285.7	169.4
Canola meal	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
Menhaden meal	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0
Maize oil	1.2	1.2	1.2	1.2	0.0
Monocalcium phosphate	10.3	10.3	10.3	10.3	6.8
Limestone	12.3	12.3	12.3	12.3	9.5
Sodium chloride	2.5	2.5	2.5	2.5	2.2
Sodium bicarbonate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamin and mineral premix ¹	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
DL-Met	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0
L-Met	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0
Met-Met	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0
L-Lys-HCl	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Sand	2.4	0.4	0.4	0.4	0.0
Analyzed nutrient content					
ME (Kcal/kg)	2959	2969	2971	2940	2963
Dry matter	917.1	913.9	917.2	912.0	912.5
Crude protein	173.0	176.7	175.6	172.7	176.3
Ether extract	35.8	41.6	41.7	42.4	38.2
Ash	56.2	54.9	57.2	51.0	50.6
Ca (calculated)	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
Available Phosphorus (calculated)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Na (calculated)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Cl (calculated)	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Met	3.4	4.8	3.9	4.6	3.7
Cys	3.2	3.2	3.1	3.1	3.3
Met+Cys	6.6	8.0	7.0	7.7	7.0
Lys	10.8	10.5	10.4	10.3	10.7
Thr	7.0	6.9	6.8	6.9	7.1
Arg	12.2	11.9	11.8	11.8	11.4
Ile	7.4	7.5	7.4	7.2	7.4
Leu	15.1	15.2	15.0	15.1	15.0
Val	8.6	8.6	8.5	8.2	8.8
His	4.9	4.9	4.8	4.8	5.0
Phe	8.7	8.7	8.5	8.5	8.3
Gly	7.7	7.6	7.5	7.5	8.1
Ser	9.1	8.9	8.7	9.0	8.5
Pro	11.0	11.1	11.1	11.0	11.2
Ala	9.3	9.2	9.1	9.2	9.5
Asp	18.3	18.1	17.7	17.7	16.6
Glu	31.7	31.6	31.1	31.4	30.8

۱. مکمل ویتامینی و معدنی مقادیر زیر را در هر کیلوگرم خوراک تأمین می‌نمود: ۱۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۳۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D₃، ۱۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۳ میلی‌گرم ویتامین K، ۳ میلی‌گرم ویتامین B₁، ۶ میلی‌گرم ویتامین B₂، ۳۵ میلی‌گرم ویتامین B₃، ۱۵ میلی‌گرم ویتامین B₅، ۳ میلی‌گرم ویتامین B₆، ۰/۱۵ میلی‌گرم بیوتین، ۱/۵۰ میلی‌گرم اسید فولیک، ۰/۰۲ میلی‌گرم ویتامین B₁₂، ۱۶ میلی‌گرم مس، ۱/۲۵ میلی‌گرم ید، ۴۰ میلی‌گرم آهن، ۱۲۰ میلی‌گرم منیزیم، ۰/۳۰ میلی‌گرم سلنیوم، و ۱۱۰ میلی‌گرم روی.

1. Vitamin and mineral premix supplied the following per kg of diet: Vitamin A, 10000 IU; Vitamin D₃, 3500 IU; Vitamin E, 100 IU; Vitamin K, 3 mg; Vitamin B₁, 3 mg; Vitamin B₂, 6 mg; Vitamin B₃, 35 mg; Vitamin B₅, 15 mg; Vitamin B₆, 3 mg; Biotin, 0.15 mg; Folic Acid, 1.50 mg; Vitamin B₁₂, 0.02 mg; Copper, 16 mg; Iodine, 1.25 mg; Iron, 40 mg; Manganese, 120 mg; Selenium, 0.30 mg and Zinc, 110 mg.

انباشت در لاشه، محاسبه شد.

سنجش میزان نیتروژن فضولات

جهت تعیین میزان نیتروژن فضولات، فضولات هر قفس به طور روزانه طی ۴ روز آخر دوره آزمایشی، جمع‌آوری و تا روز تجزیه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریز گردید. در زمان آنالیز نیتروژن، مخلوط نمودن ۴ نمونه مربوط به هر قفس، نمونه برداری پس از همگن نمودن مخلوط، خشک نمودن با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی، آسیاب نمودن نمونه‌های خشک شده و سپس آنالیز ازت در نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کلدال و مطابق با روش‌های استاندارد انجام شد (AOAC, 1990).

ارزیابی فراسنجه‌های لاشه

پس از وزن‌کشی در پایان دوره آزمایشی (سن ۶۰ روزگی)، پرندگان یک شب گرسنه نگه داشته شدند (دسترسی آزاد به آب) و در سن ۶۱ روزگی مجدداً وزن‌کشی و ۲ قطعه پرنده از هر تکرار با وزن مشابه با میانگین وزن گروه به‌طور تصادفی انتخاب و کشتار شدند. تفکیک و وزن‌کشی قطعات لاشه جهت تعیین بازده لاشه، بازده سینه، بازده کبد و بازده چربی حفره بطنی انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی (۵ تیمار \times ۴ تکرار \times ۵ مشاهده) با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ (SAS Institute, 2003) و رویه GLM (برای فراسنجه‌هایی که فقط یک بار در طول آزمایش اندازه‌گیری شدند) و رویه MIXED (برای فراسنجه متیونین پلاسما که به‌صورت تکرار شونده در طول دوره آزمایش اندازه‌گیری شد و شامل اثر جیره، اثر زمان بعد از مصرف خوراک و اثر متقابل جیره و زمان بود) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق، تأثیر تیمارهای آزمایشی مکمل‌سازی‌شده

سنجش کارایی پروتئین و آمینو اسیدها

جهت تجزیه ترکیبات لاشه کامل، قبل از شروع دوره آزمایشی (سن ۳۸ روزگی)، از هر تکرار ۱ قطعه جوجه با وزن مشابه با میانگین وزن گروه به عنوان لاشه شاهد انتخاب، یک شب گرسنه نگه داشته شده (دسترسی آزاد به آب)، روز بعد مجدداً وزن‌کشی، با روش خفگی با گاز CO₂ کشتار و سپس لاشه‌ها به‌طور کامل در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد جهت آنالیز بعدی فریز شدند. در سن ۶۰ روزگی نیز از هر تکرار ۱ قطعه پرنده با روش گفته شده برای لاشه شاهد انتخاب، کشتار و فریز شد. در زمان تجزیه، قطعه کردن و چرخ کامل لاشه‌های فریز شده، نمونه برداری پس از همگن نمودن لاشه چرخ شده، خشک نمودن با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Freeze dryer)، آسیاب نمودن نمونه‌های خشک شده و سپس تجزیه فراسنجه‌های ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام و خاکستر خام با روش‌های استاندارد انجام شد (AOAC, 1990). سنجش آمینو اسیدها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Knauer HPLC, Germany) و آشکارساز فلورسنت انجام شد (Henderson *et al.*, 2000; Bartolomeo & Maisano, 2006). کارایی هر یک از آمینو اسیدها به این صورت محاسبه گردید.

= کارایی آمینو اسید (گرم/گرم)

انباشت آمینو اسید در لاشه (گرم)/ آمینو اسید قابل دسترس جهت انباشت در لاشه (گرم)

برای محاسبه میزان انباشت آمینو اسید در لاشه طی دوره آزمایشی، میزان انباشت آمینو اسید در لاشه شاهد (حاصل‌ضرب وزن لاشه شاهد در درصد آمینو اسید لاشه شاهد) از انباشت آمینو اسید در لاشه نهایی (حاصل‌ضرب وزن لاشه نهایی در درصد آمینو اسید لاشه نهایی) کسر گردید. جهت تعیین میزان آمینو اسید قابل دسترس جهت انباشت در لاشه، متوسط خوراک مصرفی طی دوره آزمایشی در درصد آمینو اسید خوراک ضرب شد. کارایی پروتئین نیز با روش گفته شده و با بدست آوردن نسبت بین انباشت پروتئین در لاشه و پروتئین قابل دسترس جهت

خون در ساعات مختلف پس از مصرف تیمارهای آزمایشی می‌توان گفت که در پرنده‌های تیمارهای حاوی $DL-Met_{2.0}$ و $Met-Met_{2.0}$ ، پایین‌ترین غلظت متیونین پلاسمای خون در ساعت صفر (پیش از مصرف خوراک) و بالاترین غلظت آن ۱ ساعت بعد از مصرف خوراک مشاهده شد که ۲ و ۳ ساعت پس از مصرف خوراک بطور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.01$). بالعکس، در پرنده‌های تیمارهای حاوی $PB-Met_{2.0}$ و $L-Met_{2.0}$ ، غلظت متیونین پلاسمای خون در ۱ و ۲ ساعت پس از مصرف خوراک افزایش و سپس در ۳ ساعت پس از مصرف خوراک، کاهش یافت ($P < 0.01$). در خصوص منبع $L-Met$ می‌توان نتیجه گرفت که این منبع متیونین به دلیل الگو و سرعت جذب مشابه با متیونین باند شده، مناسب‌تر از سایر منابع متیونین مصنوعی جهت استفاده همزمان با منبع متیونین باند شده با پروتئین است. نتایج فوق با گزارش‌های *Yen et al.* (2004) مطابقت دارند. این محققان در آزمایشی، افزایش غلظت پلاسمایی لیزین و ترئونین را در زمان ۱ ساعت پس از مصرف خوراک مکمل شده با آمینو اسیدها و در زمان ۲/۵ ساعت پس از مصرف خوراک فاقد مکمل‌سازی با آمینو اسیدها مشاهده و گزارش کردند. آمینو اسیدهای کریستاله با سرعت بیشتری نسبت به آمینو اسیدهای متصل به پروتئین در شرایط تغذیه تک‌وعده‌ای جذب می‌شوند. *Batterham & Bayley* (1989) نشان دادند که تغذیه تک‌وعده‌ای جیره مکمل شده با لیزین کریستاله موجب جذب سریع‌تر لیزین آزاد، عدم تعادل آمینو اسیدی در مکان سوخت و ساز و در نتیجه اکسیداسیون بیشتر آمینو اسیدهای ضروری نسبت به زمانی گردید که همه آمینو اسیدها در شکل متصل به پروتئین تأمین شدند.

با منابع مختلف متیونین ($DL-Met$ ، $L-Met$ ، $Met-Met$ و $PB-Met$) بر صفات عملکرد مرغ‌های گوشتی، معنی‌دار ($P < 0.01$) بود. به طوری که در پرندگان تیمار مکمل شده با متیونین باند شده با پروتئین ($PB-Met_{2.0}$)، میانگین افزایش وزن و وزن نهایی بدن، افزایش و ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با تیمارهای مکمل شده با منابع متیونین مصنوعی ($DL-Met_{2.0}$ ، $L-Met_{2.0}$ و $Met-Met_{2.0}$) کاهش یافت. محققان قبلی نیز آثار مثبت مکمل سازی خوراک با آمینو اسیدهای باند شده و آثار منفی جایگزینی آمینو اسیدهای باندشده با آمینو اسیدهای آزاد مصنوعی بر عملکرد را گزارش و بیان کردند. کاهش پروتئین خام جیره و جایگزینی آن با آمینو اسیدهای کریستاله موجب کاهش وزن نهایی، افزایش وزن و راندمان مصرف خوراک گردید (*Guay et al.*, 2006). در خصوص فراسنجه‌های لاشه، مکمل سازی خوراک با منابع مختلف متیونین تأثیر معنی‌داری بر بازده لاشه، سینه، کبد و چربی حفره بطنی نداشت ($P > 0.05$) (جدول ۲).

مطابق با شکل ۱، اثر مکمل‌سازی خوراک با منابع مختلف متیونین و زمان مصرف خوراک بر غلظت متیونین پلاسمای خون، معنی‌دار بود ($P < 0.01$). به طوری که بالاترین غلظت متیونین پلاسمای خون، در مرغ‌های تغذیه شده با جیره‌های مکمل شده با $DL-Met$ و $Met-Met$ ، در ۱ ساعت بعد از مصرف خوراک (به ترتیب $156/60 \text{ ng}/\mu\text{l}$ و $159/98 \text{ ng}/\mu\text{l}$) و با مصرف جیره‌های حاوی $PB-Met$ و $L-Met$ ، در ۲ ساعت پس از تغذیه (به ترتیب $89/55 \text{ ng}/\mu\text{l}$ و $52/15 \text{ ng}/\mu\text{l}$) مشاهده شد. این نتیجه نشان دهنده جذب سریع‌تر متیونین آزاد کریستاله از نوع $DL-Met$ و $Met-Met$ در مرغ‌های تغذیه شده به‌طور تک‌وعده‌ای بود. با دقت در روند تغییر غلظت متیونین پلاسمای

جدول ۲. تأثیر جیره‌های آزمایشی بر عملکرد و فراسنجه‌های لاشه مرغ‌های گوشتی با مصرف تک‌وعده‌ای خوراک از سن ۳۹ تا ۶۰ روزگی
Table 2. The effect of experimental diets on performance and carcass characteristics of broilers with single-meal feed consumption from 39 to 60 days of age

Dietary treatments				Performance			Carcass characteristics (%)			
Met source	DL-Met	L-Met	Met-Met	BW (g)	WG (g)	FCR (g/g)	Carcass	Breast	Liver	Abdominal fat pad
				2326.46 ^c	631.05 ^c	2.93 ^a	77.46	37.63	1.60	0.53
				2381.56 ^{ab}	768.00 ^a	2.34 ^d	76.66	37.97	1.54	0.34
Met amount (g/kg)	2.0	2.0	-	2343.46 ^{bc}	752.84 ^a	2.46 ^c	75.76	38.89	1.66	0.64
			2.0	2356.18 ^{bc}	701.33 ^b	2.64 ^b	77.01	37.88	1.68	0.40
			2.0	2411.65 ^a	798.15 ^a	2.32 ^d	76.98	39.93	1.43	0.57
	P-value			0.006	<0.0001	<0.0001	0.51	0.23	0.24	0.69
	SEM			14.22	15.18	0.03	0.69	0.75	0.08	0.16

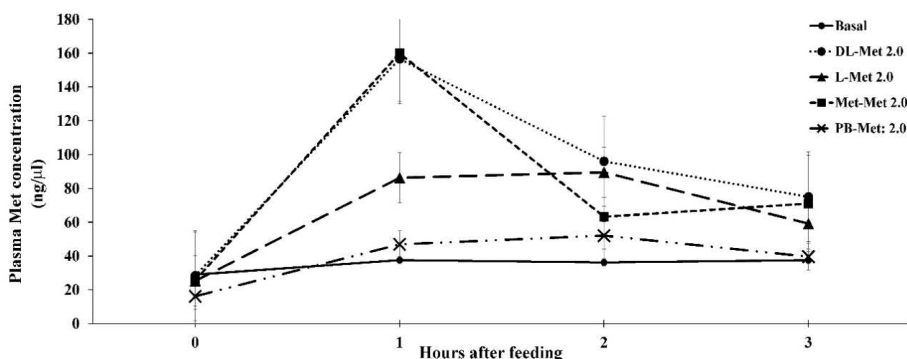
a-d: حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

a-d: Means in each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

دآمینه شدن آمینو اسیدهای مازاد را کاهش داد. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر میزان هموسیستئین پلاسمای خون، معنی دار ($P < 0.01$) بود به طوری که تیمار مکمل شده با متیونین باند شده به پروتئین موجب کاهش غلظت هموسیستئین پلاسمای خون ($25/68$ میکرومول/لیتر) با اختلاف معنی دار نسبت به منابع متیونین مصنوعی گردید. این نتیجه نشان داد که متیونین باند شده به پروتئین توانست کارایی استفاده از متیونین را در تیمارهای مکمل شده افزایش و میزان هموسیستئین پلاسمای خون را کاهش دهد. هموسیستئین یک آمینو اسید غیر پروتئینی است که توسط دمتیله شدن متیونین رژیم غذایی به وجود می آید. هموسیستئین در مسیر ترانس میتیلاسیون سوخت و ساز متیونین به سیستاتینونین و سپس در مسیر ترانس سولفوراسیون به سیستئین تبدیل می شود. آنزیم های دخیل در این مسیرها سیستاتینونین بتا سینتاز (C β S) و سیستاتینونین گاما لیاژ (C γ L) می باشند. هنگامی که تعادل بین تولید و مصرف هموسیستئین مختل شود، این آمینو اسید در سلول ها و مایع میان بافتی تجمع می یابد و در نتیجه افزایش مقدار آن در پلاسمای خون رخ می دهد. سطوح مازاد متیونین جیره از طریق ساز و کار خود تنظیمی منفی، فعالیت آنزیم C β S را کاهش می دهد و موجب تجمع هموسیستئین می شود (Murray *et al.*, 2003; Samuels, 2003).

همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود، مکمل سازی جیره با منابع مختلف متیونین تأثیر معنی داری ($P < 0.01$) بر نسبت گلوکوتایون احیاء به اکسید (GSH/GSSG) سرم خون مرغ های گوشتی داشت و موجب افزایش این نسبت شد. در واقع پایین ترین میزان این نسبت در مرغ های تغذیه شده با تیمار شاهد بدون مکمل سازی متیونین با اختلاف معنی داری با تیمارهای مکمل سازی شده، مشاهده گردید. نتیجه این تحقیق با مطالعات قبلی محققان همخوانی داشت. (Nemeth *et al.*, 2004) گزارش کردند که مکمل سازی جیره با متیونین، منجر به افزایش میزان GSH و کاهش میزان GSSG گردید و هر دو آمینو اسید متیونین و سیستئین عوامل کلیدی در سیستم اکسیداسیون-احیاء گلوکوتایون می باشند. با توجه به اینکه متیونین باند شده به پروتئین توانست نسبت فوق را در مقایسه با تیمار شاهد تا میزان بیش از ۱۰ واحد که محدوده مورد اعتماد در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی است، افزایش دهد، می توان نتیجه گرفت که متیونین باند شده به پروتئین توانست به خوبی جایگزین متیونین مصنوعی (DL-Met) شود و متیونین مورد نیاز جهت ساخت GSH را فراهم نماید.

اثر تیمارهای آزمایشی بر میزان آنزیم های کبدی AST و ALT سرم خون معنی دار نبود. بنابراین، استفاده از این دو منبع متیونین، با بهبود الگوی آمینو اسیدی جیره، نیاز به آمینوترانسفرازهای کبدی جهت



شکل ۱. تأثیر تیمارهای آزمایشی مکمل شده با منابع مختلف متیونین بر غلظت متیونین پلاسمای خون مرغ های گوشتی با مصرف تک وعده ای خوراک از سن ۳۹ تا ۶۰ روزگی

Figure 1. The effects of experimental diets on blood parameters of broilers with single-meal feed consumption from 39 to 60 days of age

جدول ۳. تأثیر جیره‌های آزمایشی بر فراسنجه‌های خون مرغ‌های گوشتی با مصرف تک‌وعده‌ای خوراک از سن ۳۹ تا ۶۰ روزگی
Table 3. The effect of experimental diets on blood parameters of broilers with single-meal feed consumption from 39 to 60 days of age

Dietary treatments				Blood parameters				
Met source	DL-Met	L-Met	Met-Met	PB-Met	GSH/GSSG ¹	HCY ² (μmol/L)	AST ³ (U/L)	ALT ⁴ (U/L)
	-----Basal-----				3.77 ^d	21.50 ^b	218.50	10.90
Met amount	2.0	-	-	-	15.63 ^a	34.38 ^a	234.75	11.02
(g/kg)	-	2.0	-	-	11.19 ^{ab}	33.05 ^a	221.00	9.91
	-	-	2.0	-	13.56 ^{bc}	40.43 ^a	241.19	11.32
	-	-	-	2.0	12.94 ^c	25.68 ^b	218.75	10.27
	P-value				<0.0001	0.0005	0.32	0.39
	SEM				0.60	2.43	11.12	0.55

a-c: حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (P<0.05).

a-c: Means in each column with different superscripts are significantly different (P<0.05).

1. Reduced glutathione to oxidized glutathione ratio.

2. Homocysteine.

3. Aspartate aminotransferase.

4. Alanine aminotransferase.

۰/۱۹ گرم/گرم، کارایی متیونین باند شده با پروتئین به ازای هر گرم متیونین در شکل باند شده بود که از تقسیم کارایی متیونین در تیمار حاوی PB-Met_{2.0} (۰/۶۹) گرم/گرم) بر میزان متیونین باند شده موجود در جیره (۳/۶ گرم، جدول ۱) محاسبه گردید. بنابراین، متیونین آزاد مصنوعی در پرنده‌های با مصرف یک وعده خوراک مانند مرغ‌های مادر گوشتی بدلیل عدم همزمانی جذب با متیونین باند شده با پروتئین، کارایی کمتری دارد.

در خصوص کارایی سایر آمینو اسیدهای ضروری، تأثیر منابع مختلف متیونین بر کارایی سایر آمینو اسیدها شامل اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک، سرین، گلیسین، ترئونین، آرژنین، آلانین، والین، لوسین و لیزین، معنی‌دار (P<0.05) بود. بالاترین میزان کارایی آمینو اسیدهای فوق در جوجه‌های تیمار مکمل شده با متیونین باند شده به پروتئین (PB-Met_{2.0}) مشاهده شد. در واقع به دلیل بهبود الگوی آمینو اسیدی در مکان ساخت پروتئین با استفاده از منبع متیونین باند شده به پروتئین، کارایی سایر آمینو اسیدهای ضروری، بهبود یافت. این نتایج موافق با نتایج گزارش شده توسط Nonis & Gous (2006) بود که نشان دادند جایگزینی پروتئین جیره با مقادیر در حال افزایش لیزین و متیونین آزاد مصنوعی تا ۲/۳ گرم/کیلوگرم خوراک، کارایی متیونین را تا میزان ۴/۳ درصد کاهش داد. Batterham (1974) در آزمایشی گزارش کرد که تفاوت میزان جذب لیزین آزاد و باند شده با پروتئین در شرایط تغذیه تک‌وعده‌ای موجب کاهش کارایی لیزین آزاد و همچنین عملکرد رشد گردید.

مطابق با جدول ۴، مکمل سازی جیره با متیونین باند شده با پروتئین (PB-Met_{2.0}) موجب افزایش معنی‌دار (P<0.01) درصد پروتئین لاشه (۷۰/۳۴ درصد)، کارایی پروتئین (۰/۵۴ گرم/گرم) و کاهش معنی‌دار (P≤0.05) میزان نیتروژن فضولات (۴/۰۴ درصد) در مقایسه با تیمارهای مکمل شده با متیونین مصنوعی گردید. بنابراین، متیونین باند شده به پروتئین توانست با ایفای نقش مثبت در همزمانی جذب و نهایتاً بهبود الگوی آمینو اسیدی در مکان ساخت پروتئین، درصد پروتئین لاشه و بهره‌وری پروتئین را افزایش و همچنین میزان نیتروژن فضولات را کاهش دهد. بین منابع متیونین مصنوعی، منبع L-Met مقدار کارایی پروتئین را نسبت به دو منبع دیگر افزایش و میزان نیتروژن دفعی را کاهش داد.

نتایج کارایی آمینو اسیدهای ضروری در جدول ۵ نشان داده شده است. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر کارایی آمینو اسید متیونین، معنی‌دار (P<0.01) بود به طوری که بالاترین میزان کارایی متیونین در تیمار حاوی متیونین باند شده با پروتئین (PB-Met_{2.0}) مشاهده شد (۰/۶۹ گرم/گرم) که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای مکمل شده با متیونین مصنوعی (DL-Met_{2.0}، L-Met_{2.0} و Met-Met_{2.0}) نشان داد. پایین‌ترین میزان کارایی متیونین مربوط به تیمار حاوی DL-Met_{2.0} (۰/۳۶ گرم/گرم) بود. در این تیمار که حاوی ۲ گرم درکیلوگرم متیونین آزاد مصنوعی و ۲/۸ گرم درکیلوگرم متیونین باند شده با پروتئین (متیونین کل ۴/۸ گرم/گرم، جدول ۱) بود، کارایی متیونین آزاد برابر با صفر محاسبه گردید (محاسبه شده به صورت ۲/(۲/۸×۰/۱۹) - ۰/۳۶) × عدد

جدول ۴. تأثیر جیره‌های آزمایشی بر تجزیه ترکیبات لاشه کامل (% ماده خشک)، کارایی پروتئین و میزان نیتروژن فضولات مرغ‌های گوشتی با مصرف تک‌وعده‌ای خوراک از سن ۳۹ تا ۶۰ روزگی

Table 4. The effect of experimental diets on whole body composition (% dry matter), efficiency of protein utilization and excreta nitrogen content of broilers with single-meal feed consumption from 39 to 60 days of age

Dietary treatments	Body composition (% based on %DM)			Efficiency of protein utilisation (g/g)	Nitrogen content of excreta (%)
	CP	EE	ASH		
Met source	DL-Met	L-Met	Met-Met	PB-Met	
	-----Basal-----				
Met amount (g/kg)	2.0	-	-	-	
	-	2.0	-	-	
	-	-	2.0	-	
	-	-	-	2.0	
	P-value				
	SEM				

a-c: حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

a-c: Means in each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

جدول ۵. تأثیر جیره‌های آزمایشی بر میزان کارایی آمینو اسیدهای ضروری در مرغ‌های گوشتی با مصرف تک‌وعده‌ای خوراک از سن ۳۹ تا ۶۰ روزگی

Table 5. The effect of experimental diets on efficiency of essential amino acid utilization of broilers with single meal feed consumption from 39 to 60 d of age

Dietary treatments	Efficiency of utilisation (g/g)							
	Met	Asp	Glu	Ser	His	Gly	Thr	Arg
Met source	DL-Met	L-Met	Met-Met	PB-Met				
	-----Basal-----							
Met amount (g/kg)	2.0	-	-	-				
	-	2.0	-	-				
	-	-	2.0	-				
	-	-	-	2.0				
	P-value							
	SEM							

a-c: حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

a-c: Means in each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

ادامه جدول ۵. تأثیر جیره‌های آزمایشی بر میزان کارایی آمینو اسیدهای ضروری در مرغ‌های گوشتی با مصرف تک‌وعده‌ای خوراک از سن ۳۹ تا ۶۰ روزگی

Table 5 Continued. The effect of experimental diets on efficiency of essential amino acid utilization of broilers with single meal feed consumption from 39 to 60 d of age

Dietary treatments	Efficiency of utilisation (g/g)						
	Ala	Cys	Val	Phe	Ile	Leu	Lys
Met source	DL-Met	L-Met	Met-Met	PB-Met			
	-----Basal-----						
Met amount (g/kg)	2.0	-	-	-			
	-	2.0	-	-			
	-	-	2.0	-			
	-	-	-	2.0			
	P-value						
	SEM						

a-c: حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

a-c: Means in each column with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

مصنوعی، افزایش داد. از آنجا که در بدن حیوانات تنها ایزومر L جهت ساخت پروتئین و سایر فرایندهای سوخت و سازی ضروری مورد استفاده قرار می‌گیرد، بنابراین L-Met به‌طور مستقیم در ساخت پروتئین استفاده می‌شود ولی D-Met بایستی مراحل را جهت

Zarate *et al.* (1999) گزارش کردند که کارایی لیزین کریستاله تنها ۶۲ درصد کارایی لیزین باند شده با پروتئین در ماهی *Ictalurus punctatus* بود. بین منابع متیونین مصنوعی، منبع L-Met عملکرد بهتری داشت و مقادیر کارایی را در مقایسه با دو منبع دیگر متیونین

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج این تحقیق نشان دادند که به دلیل عدم همزمانی جذب منابع آمینو اسیدی مصنوعی و باند شده با پروتئین در حیوانات تغذیه شده به‌طور تک‌وعده‌ای، آمینواسیدهای آزاد مصنوعی، با کارایی اندک مورد بهره‌وری قرار می‌گیرند. بنابراین آمینو اسید باند شده با پروتئین به عنوان منبع ترجیحی مکمل آمینو اسید در پرندگان تغذیه شده به طور تک‌وعده‌ای مانند مرغ‌های مادر گوشتی پیشنهاد می‌گردد. البته بین منابع متیونین مصنوعی مورد استفاده در این تحقیق، منبع L-Met نسبت به دو منبع دیگر (DL-Met و Met-Met) عملکرد بهتری داشت و با توجه به روند و سرعت جذب مشابه با متیونین باند شده به پروتئین، مناسب‌تر از سایر منابع متیونین مصنوعی جهت استفاده همزمان با متیونین باند شده به پروتئین در شرایط محدودیت غذایی است.

تبدیل شدن به ایزومر L طی کند. در مرحله اول این تبدیل که دامیناسیون اکسیداتیو است، آلفا- آمینو اسید با دخالت آنزیم D- آمینو اسید اکسیداز به آلفا- کتواسید تبدیل می‌شود. سپس در مرحله دوم که آمیناسیون مجدد است، کتواسید به L- آمینو اسید تبدیل می‌شود. از آنجا که کارایی این تبدیل ایزومری، ۱۰۰٪ نیست (Niu *et al.*, 2018; Esteve-Garcia & Rehman Khan, 2018)، بنابراین منطقی است که منبع L-Met کارایی بالاتری نسبت به منابع DL-Met و Met-Met داشته باشد. از طرفی با توجه به اینکه مقادیر مازاد ایزومر D به عنوان محدود کننده سرعت سیستم اکسیداز عمل می‌کند، جذب سریع منابع DL-Met و Met موجب عدم تعادل آمینو اسیدی و هدایت آمینو اسیدهای مازاد به سمت مسیرهای کاتابولیک به جای مسیرهای آنابولیک می‌شود (Niu *et al.*, 2018).

REFERENCES

1. Alam, M., Teshima, S., Koshio, S. & Ishikawa, M. (2004). Effects of supplementation of coated crystalline amino acids on growth performance and body composition of juvenile kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Aquaculture Nutrition*, 10, 309-316.
2. AOAC (1990). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 15th edition, Arlington, VA.
3. Aviagen Group Ltd. (2016). Ross 308. Parent Stock Nutrition Specification. Aviagen, Newbridge, Midlothian EH28 8SZ, Scotland, UK.
4. Baker, D.H. & Izquierdo, O.A. (1985). Effect of meal frequency and spaced crystalline lysine ingestion on the utilization of dietary lysine by chickens. *Journal of Nutrition Research*, 5, 1103-1112.
5. Bartolomeo, M.P. & Maisano, F. (2006). Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*, 17, 131-137.
6. Batterham, E.S. (1974). The effect of frequency of feeding on the utilization of free lysine by growing pigs. *British Journal of Nutrition*, 31, 237-242.
7. Batterham, E.S. & Bayley, H.S. (1989). Effect of frequency of feeding of diets containing free or protein-bound lysine on the oxidation of [¹⁴C] lysine or [¹⁴C] phenylalanine by growing pigs. *British Journal of Nutrition*, 62, 647-655.
8. Batterham, E.S. & Murison, R.D. (1981). Utilisation of free lysine by growing pigs. *British Journal of Nutrition*, 46, 87-92.
9. Batterham, E.S. & O'Neil, G.H. (1978). The effect of frequency of feeding on the response by growing pigs to supplements of free lysine. *British Journal of Nutrition*, 39, 265-270.
10. Esteve-Garcia, E. & Rehman Khan, D. (2018). Relative bioavailability of DL and L-Methionine in broilers. *Journal of Animal Sciences*, 8, 151-162.
11. Gilfix, B.M., Blank, D.W. & Rosenblatt, D.S. (1997). Novel reductant for determination of total plasma homocysteine. *Clinical Chemistry*, 43, 687-688.
12. Guay, F., Donovan, S.M. & Trottier, N.L. (2006). Biochemical and morphological developments are partially impaired in intestinal mucosa from growing pigs fed reduced-protein diets supplemented with crystalline amino acids. *Journal of Animal Science*, 84, 1749-1760.
13. Henderson, J.W., Ricker, D.R., Bidlingmeyer, B.A. & Woodward, C. (2000). Rapid, accurate, sensitive, and reproducible HPLC analysis of amino acids. Amino acid analysis using Zorbax Eclipse-AAA columns and the Agilent 1100 HPLC. *Agilent Technologies Innovating the HP Way*, Part No. 5980-11936.

14. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. & Rodwell, V.W. (2003). Harper's Illustrated Biochemistry. 26th Edition. Mc Graw-Hill Publishing, New York, USA.
15. Nemeth, K., Mezes, M., Gaal, A., Bartos, K., Balogh, K. & Husveth, F. (2004). Effect of supplementation with methionine and different fat sources on the glutathione redox system of growing chickens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52, 369-378.
16. Niu, J., Lemme, A., He, J.Y., Li, H.Y., Xie, S.W., Liu, Y.J., Yang, H.J., Figueiredo-Silva, C. & Tian, L.X. (2018). Assessing the bioavailability of the Novel Met-Met product (AQUAVI[®] Met-Met) compared to DL-methionine (DL-Met) in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 484, 322-332.
17. Nonis, M.K. & Gous, R.M. (2006). Utilisation of synthetic amino acids by broiler breeder hens. *South African Journal of Animal Science*, 36, 126-134.
18. Pfeiffer, C.M., Huff, D.L. & Gunter, E.W. (1999). Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, 45, 290-292.
19. Samuels, N. (2003). Screening for homocysteine levels in Israel in primary care clinics: a need for guidelines. *Preventive Medicine Journal*, 37, 668-671.
20. SAS Institute (2003). *SAS[®] User's Guide: Statistics*, Version 9.1. Cary, NC.
21. Ubbink, J.B., Hayward, W.J. & Bissbort, V.S. (1991). Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum. *Journal of Chromatography*, 565, 441-446.
22. Yen, J.T., Kerr, B.J., Easter, R.A. & Parkhurst, A.M. (2004). Difference in rates of net portal absorption between crystalline and protein-bound lysine and threonine in growing pigs fed once daily. *Journal of Animal Science*, 82, 1079-1090.
23. Zarate, D.D., Lovell, R.T. & Payne, M. (1999). Effects of feeding frequency and rate of stomach evacuation on utilization of dietary free and protein-bound lysine for growth by channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture Nutrition*, 5, 17-22.