

تأثیر تغذیه متیونین محافظت شده بر تولید و ترکیبات شیر گاوهای شیرده هلشتاین در اوایل دوره شیردهی

مهدی دهقان بنادکی^{۱*} و حشمت اله بهرامی یکدانگی^۲

۱، ۲، استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۱ - تاریخ تصویب: ۸۸/۷/۸)

چکیده

در این پژوهش از ۵۶ راس گاو هلشتاین با میانگین روزهای شیردهی ۷۱ روز و میانگین تولید شیر ۳۵ کیلوگرم در روز در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با اندازه‌گیری‌های تکرار شده استفاده شد. گاوها به طور تصادفی به دو جیره آزمایشی و بر اساس شکم زایش به دو بلوک (زایش اول و زایش دو به بالا) اختصاص داده شدند. جیره آزمایشی اول شامل جیره پایه (حدود ۶۰٪ کنسانتره و ۴۰٪ علوفه) به همراه ۵۰ گرم متیونین محافظت شده در روز (با خلوص ۵۵ درصد) به صورت مخلوط با خوراک و جیره آزمایشی دوم شامل جیره پایه بدون ماده افزودنی (گروه شاهد) بود. طول دوره آزمایش ۴۰ روز بوده که ۱۰ روز اول آن جهت عادت دهی گاوها اختصاص داده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که گاوهای تغذیه شده با متیونین محافظت شده از نظر تولید شیر و خوراک مصرفی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند. بین ترکیبات شیر از قبیل چربی، پروتئین، لاکتوز، مواد جامد بدون چربی، کل مواد جامد بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>0.05$). تغذیه متیوپلاس در آزمایش حاضر موجب کاهش معنی‌دار سطح اسیدهای چرب غیر استریفه خون (NEFA) و همچنین افزایش معنی‌دار سطح گلوکز خون گاوها در مقایسه با گروه شاهد شد ($P<0.05$). گاوهای اختصاص یافته به دو جیره آزمایشی تفاوتی از نظر تغییر امتیاز بدنی (BCS) طی دوره آزمایشی نداشتند. بنابراین با توجه به پژوهش حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که تغذیه متیونین محافظت شده در اوایل دوره شیردهی با افزایش سطح گلوکز خون و کاهش اسیدهای چرب غیراستریفه گاوها موجب کاهش احتمال ابتلاء به ناهنجاریهای متابولیکی مانند کتوز و کبد چرب از طریق بهبود عملکرد کبد در متابولیسم چربی و گلوکوئوتوز می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گاو هلشتاین، متیونین محافظت شده، تولید شیر، گلوکز، اسیدهای چرب غیر استریفه.

مقدمه

روش‌های زیادی جهت تغییر پروفیل اسیدهای آمینه ورودی به دوازدهم جهت تامین نیاز دام به اسیدهای آمینه خاص انجام شده است که شامل تحریک سنتز بیشتر پروتئین میکروبی، تغذیه پروتئین‌های مقاوم به تجزیه در شکمبه و تغذیه اسیدهای آمینه محافظت شده در شکمبه می‌باشد (Rulquin & Delaby, 1997). روش اخیر بیشتر به منظور تامین اسیدهای آمینه محدود

کننده تولید شیر انجام گرفته است (Girard et al., 2004; Rulquin & Delaby, 1997).

متیونین و لیزین در بیشتر مطالعات به عنوان دو اسید آمینه محدود کننده برای گاوهای شیرده شناسایی شده‌اند. محدودیت آنها به علت غلظت پایین این اسیدهای آمینه در مواد غذایی در مقایسه با غلظت آنها در شیر و سنتز پروتئین میکروبی در شکمبه می‌باشد. NRC 2001 پیشنهاد کرده که غلظت لیزین و متیونین

آزمایشات شیردانی، روده‌ای و تزریق‌های داخل رگی مشخص شد که فرم جذب شده متیونین همیشه در نشخوارکنندگان در حد مطلوبی نمی‌باشد (Chalupa, 1975; Charles et al., 2004). این آزمایشات نشان می‌دادند که اسیدهای آمینه گوگردار اولین محدودیت برای رشد پشم و افزایش وزن بدن در گوسفند می‌باشد همچنین متیونین برای رشد گاوها و تولید شیر آنها محدود کننده می‌باشد. بنابراین محققین در آزمایشات مختلف به دنبال شیوه‌هایی جهت محافظت متیونین در برابر هضم شکمبه‌ای بودند (Charles et al., 2004).

یکی از روش‌های محافظت متیونین در شکمبه، پوشاندن سطح متیونین با موادی که در برابر آنزیم‌های میکروبی مقاومت کرده و همچنین استفاده از پلی‌مرهایی است که در برابر تغییرات pH حساس می‌باشند (Schwab et al., 2003). این پلی‌مرها در pH شکمبه ای غیرقابل حل و در pH اسیدی شیردان حل می‌شوند. این پلی‌مرها بالاترین محافظت را در شکمبه داشته و به راحتی در محیط روده‌ای به تدریج آزاد شده و قابلیت زیست‌فراهمی بالایی دارند. روش دیگر جهت افزایش و انتقال متیونین به روده، استفاده از مشتقات و آنالوگ‌های متیونین می‌باشد (Blum et al., 1999; Schwab et al., 2003).

استفاده از متیونین محافظت شده در تغذیه گاوهای شیرده در برخی مطالعات موجب افزایش تولید شیر و تغییر در ترکیبات شیر شده است (Johnson et al., 1999; Lara et al., 2006; Rulquin & Delaby, 1997). همچنین کاهش بیماری‌های متابولیکی ناشی از متابولیسم چربی نیز با مصرف متیونین محافظت شده گزارش شده است (Rulquin & Delaby, 1997; Pisulewski et al., 1996). هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر استفاده از یک منبع متیونین محافظت شده در شکمبه بر تولید و ترکیبات شیر و همچنین متابولیت‌های خونی گاوهای هلشتاین شیرده در اوایل دوره شیردهی بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه پژوهشی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در

در پروتئین قابل متابولیزم (MP)^۱ برای حداکثر کردن استفاده از MP در تولید پروتئین شیر به ترتیب ۷/۲ و ۲/۴ درصد باشد. در واقع در کلیه شرایط این میزان قابل حصول نمی‌باشد و یک توصیه عملی برای لیزین و متیونین شامل ۶/۶ و ۲/۲٪ لیزین و متیونین در پروتئین قابل متابولیزم می‌باشد (National Research Council, 1998; Overton et al., 2001). این غلظت از لیزین و متیونین در جیره‌هایی بر پایه ذرت سیلو شده و استفاده از مکمل‌هایی با میزان لیزین بالا (کنجاله سویا، پودر خون و پودر ماهی) و متیونین محافظت شده در شکمبه (RP Met)^۲ و اضافه و محدود کردن مصرف پروتئین غیرقابل قابل تجزیه در شکمبه (UDP) تا سطح مورد نیاز قابل حصول می‌باشد (Girard et al., 2004; Schwab et al., 2003).

متیونین از جمله اسیدهای آمینه ای است که باعث افزایش انتقال و خروج چربی از کبد می‌شود به نحوی که بیش از ۲۸ درصد متیونین جذب شده صرف کولین می‌شود. متیونین به عنوان گروه دهنده متیل نقش مهمی در سنتز لیپوپروتئین‌ها بازی می‌کند (McMurray et al., 1984; Rulquin & Delaby, 1997; Schwab et al., 2003). فسفولیپیدها جز اصلی تشکیل‌دهنده لیپوپروتئین‌ها می‌باشند که ترکیب اخیر به عنوان یک عامل در انتقال چربی از کبد نقش دارد. متیونین همچنین جهت سنتز پروتئین موجود در لیپوپروتئین‌ها مورد نیاز می‌باشد. چون انتقال لیپوپروتئین‌ها در نشخوارکنندگان به طور ذاتی به آهستگی انجام می‌شود بسیاری از تحقیقات بیان می‌کنند که این به علت کمبود متیونین می‌باشد (Bobe et al., 2004; Chalupa, 1975; Rulquin & Delaby, 1997). همچنین متیونین در تشکیل اسیدهای صفراوی نقش داشته و با توجه به اینکه این اسیدهای صفراوی در جذب چربی‌ها موثرند می‌توان گفت که متیونین در جذب و انتقال چربی‌ها در بدن نقش دارند (Bobe et al., 2004; Chalupa, 1975).

توجه به متیونین محافظت شده در شکمبه به دهه ۱۹۶۰ و اوایل دهه ۱۹۷۰ بر می‌گردد زمانی که از طریق

1. Metabolizable protein
2. Rumen Protected Methionine

اتوآنالیزر^۲ (هیتاچی مدل ۹۱۱)^۳ تجزیه شدند. امتیاز نمره وضعیت بدنی گاوها در آغاز و پایان آزمایش بر اساس مقیاس ۱ تا ۵ تعیین شد. در طول مدت آزمایش گاوها به خوراک بالانس شده بصورت آزاد و همچنین به سنگ نمک و آب دسترسی آزاد داشتند. داده‌های حاصل از این پژوهش با نرم‌افزار آماری SAS، PROC MIXED و مدل آماری زیر تجزیه و تحلیل شد:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + P_k + b_f(Pmilk) + e_{ijkl}$$

که در آن:

μ : مجموع مشاهدات

T: اثر تیمار (متیوپلاس)

B: اثر بلوک (شکم زایش ۱ و بالاتر از ۱)

P: اثر دوره اندازه گیری

$b_f(Pmilk)$: عامل کوراریت (میزان تولید شیر اولیه)

e : اثرات تصادفی خطا (اثرات باقیمانده)

میانگین تیمارها توسط آزمون توکی سنجش شد و معنی‌دار بودن اثر تیمار در سطح ۵ درصد گزارش شد.

جدول ۱- درصد مواد خوراکی تشکیل دهنده جیره غذایی گروه (بر اساس ماده خشک)

درصد	مواد خوراکی
۲۰	یونجه
۱۶	ذرت سیلو شده
۲	تفاله چغندر قند
۱۸	دانه جو
۱۰	دانه ذرت
۳	دانه گندم
۱۵	کنجاله سویا
۶	کنجاله کلزا
۵	تخم پنبه
۲	پودر چربی محافظت شده
۰/۵	نمک
۱/۲	جوش شیرین
۰/۴	کربنات کلسیم
۰/۷	مکمل معدنی ویتامینی ^۱
۰/۲	دی کلسیم فسفات
۱۰۰	جمع کل

۱- یک کیلوگرم مکمل ویتامینی دارای ۲ میلیون واحد بین المللی ویتامین A، ۲۵۰ هزار واحد بین المللی ویتامین D، ۳۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین E، ۱۲۵۰۰ میلی گرم آهن، ۱۲۵۰۰ میلی گرم مس، ۱۰ میلی گرم کبالت، ۱۰۰ میلی گرم پد، ۴۰۰ میلی گرم آهن، ۱۰ هزار میلی گرم منگنز، ۶۵۰۰ میلی گرم روی و ۱۰ میلی گرم سلنیوم بود.

2. Autoanalyzer
3. Hitachi, model 911

کرج بر روی ۵۶ راس گاو شیرده پر تولید در اوایل دوره شیردهی (متوسط تولید ۳۵ کیلوگرم و روزهای شیردهی ۷۱ روز) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو تیمار (افزودنی متیونین محافظت شده و گروه شاهد) و دو بلوک بر اساس شکم زایش (زایش اول و زایش دو به بالا) و ۲۸ تکرار (گاو) برای هر تیمار انجام شد. گاوهای گروه اول از جیره متعادل شده (بر اساس NRC 2001) حاوی ۵۰ گرم متیوپلاس^۱ با خلوص ۵۵٪ (تامین کننده حداقل ۲۷ گرم متیونین خالص) تغذیه شدند و گاوهای گروه دوم، با جیره متعادل شده مشابهی بدون افزودنی متیوپلاس تغذیه شدند (جدول ۱ و ۲) نسبت لایزین به متیونین در جیره شاهد ۳/۵ به ۱ و در جیره حاوی متیوپلاس ۳ به ۱ تنظیم شد. طول مدت آزمایش ۴۰ روز بود که ۱۰ روز اول جهت عادت‌دهی و ۳۰ روز بعدی جهت نمونه گیری اختصاص یافت. گاوها در جایگاه مسقف با فضای آخور و آبشخور یکسان نگهداری شدند و روزانه دو بار در ساعت ۷ صبح و ۱۷ بعدازظهر تغذیه می‌شدند، میزان خوراک ارائه شده و پس آخور به صورت گروهی و روزانه اندازه‌گیری می‌شد. همچنین گاوها روزانه سه بار در ساعت‌های ۲، ۱۰ و ۱۸ دوشیده می‌شدند و رکورد هر سه وعده به عنوان رکورد روزانه ثبت می‌شد.

جهت تعیین ترکیبات شیر، هفته‌ای یکبار نمونه گیری از شیر گاوها انجام می‌شد و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شده و ترکیبات آن از قبیل چربی، پروتئین، لاکتوز، مواد جامد بدون چربی، و کل مواد جامد شیر توسط دستگاه میلو اسکن foss مدل ۱۳۳B اندازه‌گیری می‌شد. به منظور تعیین فراسنجه‌های خونی در روز پایانی آزمایش، با استفاده از لوله‌های خلا هپارینه شده، ۴ تا ۶ ساعت بعد از تغذیه صبح از ورید دمی هر گاو خونگیری شد. نمونه‌های خون بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و پس از سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) پلاسما آن جدا گردید. نمونه‌های پلاسما در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری و پس از اتمام آزمایش جهت تعیین ترکیبات خونی از قبیل گلوکز، تری گلسیرید، کل پروتئین پلاسما، اسیدهای چرب غیر استریفیه، بتاهیدروکسی بوتیرات، AST، ازت اورای خون، کلسترول کلسیم و فسفر با دستگاه

1. Methioplus

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌های این آزمایش در جداول ۳ و ۴ گزارش شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود افزودن متیونین محافظت شده (متیوپلاس) در این آزمایش اثر معنی‌داری بر خوراک مصرفی روزانه، تولید و ترکیبات شیر گاوها نداشت (جدول ۳) هر چند که گاوهای تغذیه شده با متیوپلاس افزایش عددی در تولید شیر داشتند (۳۳/۱۳ در مقابل ۳۲/۷۷ کیلوگرم) ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P>0.05$). این نتایج با گزارشات برخی از محققین مطابقت دارد (Bateman et al., 1999; Pisulewski et al., 1996) ولی برخی دیگر از محققین افزایش تولید یا تغییر در ترکیبات شیر را با مصرف متیونین محافظت شده گزارش کرده‌اند (Johnson et al., 1999; Lara et al., 2006; Rulquin & Delaby, 1997) معنی‌دار تولید شیر در مطالعه حاضر به علت درصد بالای پروتئین جیره (۱۸/۶ درصد)، تفاوت در منبع متیونین محافظت شده و ترکیب پروتئینی جیره را می‌توان ذکر نمود. زیرا تغذیه پروتئین محافظت شده در جیره‌های با درصد پروتئین بالا در جیره به علت عدم محدودیت در اسیدهای آمینه محدود کننده، تأثیرات معنی‌داری روی تولید شیر ندارد (Bateman et al., 1999; Pisulewski et al., 1996).

جدول ۲- غلظت انرژی و مواد مغذی جیره‌های غذایی پایه

مقدار	انرژی یا ماده مغذی
۵۸/۳	ماده خشک (درصد)
۱۸/۶	پروتئین خام (درصد)
۶۵/۶	پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (درصد CP)
۳۴/۴	پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه (درصد CP)
۲۹/۹	الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد)
۱۹/۴	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (درصد)
۴۰/۶	کربوهیدرات‌های غیر الیافی
۱/۷	انرژی خالص شیردهی (مگا کالری در کیلوگرم)
۵/۳	عصاره اتری (درصد)
۰/۹	کلسیم (درصد)
۰/۵	فسفر (درصد)
۳/۵	نسبت لیزین به متیونین

تغذیه متیوپلاس در آزمایش حاضر موجب کاهش معنی‌دار سطح اسیدهای چرب غیر استریفه خون (NEFA) و همچنین افزایش معنی‌دار سطح گلوکز خون گاوها (جدول ۴) در مقایسه با گروه شاهد شد ($P<0.05$). این نتایج می‌تواند نشانگر نقش متیونین محافظت شده در شکمبه و قابل جذب در روده باریک بر متابولیسم چربی بدن باشد. متیونین از جمله اسیدهای آمینه‌ای است که می‌تواند باعث افزایش انتقال و خروج

جدول ۳- مقایسه ماده خشک مصرفی، ضریب نمره بدنی و تولید و ترکیبات شیر گاوهای تغذیه شده با

جیره حاوی متیوپلاس و جیره شاهد

SEM ¹	جیره شاهد	جیره متیوپلاس	صفت مورد مطالعه
۱/۰۴۲	۲۲/۲۵	۲۲/۱۷	ماده خشک مصرفی (کیلوگرم در روز)
۰/۷۳۴	۰/۱۷	۰/۲۱	تغییر ضریب نمره بدنی (طی دوره آزمایشی)
۰/۷۳۴	۳۲/۷۷	۳۳/۱۳	تولید شیر (کیلوگرم در روز)
۰/۱۸۷	۳/۲۲	۳/۲۴	چربی شیر (درصد)
۰/۰۹۶	۳/۰۱	۳/۰۳	پروتئین شیر (درصد)
۰/۱۰۹	۴/۹۴	۴/۹۳	لاکتوز شیر (درصد)
۰/۲۹۵	۱۱/۷۰	۱۱/۷۹	مواد جامد شیر ^۲ (درصد)
۰/۱۸۳	۸/۴۷	۸/۵۶	مواد جامد بدون چربی شیر ^۳ (درصد)
۰/۰۷۰	۱/۰۵	۱/۰۷	میزان چربی شیر (کیلوگرم در روز)
۰/۰۳۸	۰/۹۸	۱/۰۰	میزان پروتئین شیر (کیلوگرم در روز)
۰/۰۵۳	۱/۶۱	۱/۶۴	میزان لاکتوز شیر (کیلوگرم در روز)
۰/۱۳۱	۳/۸۱	۳/۸۸	میزان مواد جامد شیر (کیلوگرم در روز)
۰/۰۸۶	۲/۷۷	۲/۸۳	میزان مواد جامد بدون چربی شیر (کیلوگرم در روز)
۰/۸۳۲	۱۷/۶۴	۱۷/۳۸	ازت اورهای شیر ^۴ (میلی گرم در دسی لیتر)

1. Standard Error of Means

2. Total Solids

3. Solids non fat

4. Milk Urea Nitrogen

همچنین تغییرات امتیاز بدنی در هر گروه گاوهای تغذیه شده با جیره‌ها آزمایشی تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودنی متیوپلاس (حاوی ۵۵ درصد متیونین محافظت شده در شکمبه) تاثیری بر تولید شیر و ترکیبات آن و مصرف اختیاری خوراک نداشت. افزودنی متیوپلاس می‌تواند موجب کاهش غلظت اسیدهای چرب غیراستریفه خون (NEFA) و افزایش سطح گلوکز خون گاوها در اوایل دوره شیردهی شود و از این طریق احتمال ابتلا به ناهنجاری‌های متابولیکی از قبیل کتوز و کبد چرب را در اوایل دوره شیردهی کاهش دهد.

سپاسگزاری

از حوزه معاونت پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به جهت همکاری در انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود همچنین از شرکت سنا دام پارس به خاطر تأمین هزینه‌های انجام طرح، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

چربی از کبد شود (Bobe et al., 2004; Emmanuel & Kennelly, 1984). متیونین به عنوان گروه دهنده متیل و همچنین کمک در سنتز لستین و آپولیپوپروتئین B. نقش مهمی در سنتز لیپوپروتئین‌ها بخصوص لیپوپروتئین با چگالی خیلی پائین (VLDL) ایفا می‌کند (Bobe et al., 2004; Pisulewski et al., 1996). هر چند که نقش متیونین در گلوکونئوژنز از اسیدهای آمینه کم است ولی این اسید آمینه از طریق افزایش خروج چربی از کبد و ممانعت از تجمع چربی در کبد، نقش کبد را در گلوکونئوژنز از پروپیونات در نشخوارکنندگان بهبود می‌بخشد و از این طریق موجب افزایش سطح گلوکز خون گاوها می‌شود (Pisulewski et al., 1996). این نتایج با گزارشات برخی از محققین همخوانی دارد (Bateman et al., 1999; Pisulewski et al., 1996). متیوپلاس تاثیر معنی‌داری بر سایر متابولیت‌های خونی گاوهای مورد مطالعه نداشت (جدول ۴) هر چند کاهش عددی در فعالیت آنزیم کبدی AST مشاهده شد که می‌تواند ناشی از متابولیسم مناسب‌تر کبد گاوهای تغذیه شده با متیوپلاس باشد.

1. Very low density lipoprotein

جدول ۴- مقایسه متابولیت‌های خون گاوهای تغذیه شده با جیره حاوی متیوپلاس و جیره شاهد

SEM ¹	جیره شاهد	جیره متیوپلاس	صفت مورد مطالعه
۰/۰۱۹	۰/۲۳ ^a	۰/۱۶ ^b	اسیدهای چرب غیر استریفه ^۲ (میلی مول در لیتر)
۰/۰۷۷	۰/۶۸	۰/۶۲	بتا - هیدروکسی بوتیرات ^۳ (میلی مول در لیتر)
۳/۰۲۱	۵۵/۹۳ ^b	۶۵/۲۱ ^a	گلوکز (میلی گرم در دسی لیتر)
۰/۲۵۹	۶/۹۹	۶/۹۸	کل پروتئین (گرم در دسی لیتر)
۱/۷۵۸	۱۷/۸۲	۱۷/۰۴	تری گلیسریدها (میلی گرم در دسی لیتر)
۱۸/۱۶	۲۶۲/۵	۲۶۴/۰	کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر)
۱/۲۲	۱۸/۹	۱۸/۸	ازت اوره ای خون (میلی گرم در دسی لیتر)
۵/۷۶	۷۷/۶	۷۲/۸	AST کبدی (واحد در لیتر)
۱/۴۷	۹/۹	۱۰/۵	کلسیم (میلی گرم در دسی لیتر)
۰/۴۹	۶/۱	۵/۳	فسفر (میلی گرم در دسی لیتر)

a, b: میانگین صفات در یک ردیف با حروف انگلیسی متفاوت، دارای تفاوت معنی‌دار از نظر آماری هستند. ($P < 0.05$)

1. Standard Error of Means

2. NEFA

3. BHBA

REFERENCES

- Bateman, H. G., Spain, J. N., Kerly, M. S., Belyea, R. L. & Marshall, R. T. (1999). Evaluation of ruminally protected methionine and lysine or blood meal and fish meal as protein sources for lactating Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 82, 2115–2120.

2. Bertics, S. J., Grummer, R. R., Cadorniga-Valino, C. & Stoddard, E. E. (1992). Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 75, 1914-1921.
3. Blum, J. W., Bruckmair, 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*, 81, 1991-1998.
4. Bobe, G., Young, J. W. & Beitz, D. C. (2004) Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 3105-3124.
5. Chalupa, W. (1975). Rumen bypass and protection of proteins and amino acids, *Journal of Dairy Science*, 58, 1198-1218.
6. Charles, G., Schwab Ryan, S. & Ordway, M. (2004). Methionine supplementation options. University of New Hampshire, Department of Animal and Nutritional Sciences, from http://www.formulate2.com/schwab_methionine.pdf
7. Devies, G. H., Mamunes, P., Miller, C. D. & Hayward, D. M. (1976). *Analytical biochemistry*. Netherland: Elsevier.
8. Emmanuel, B. & Kennelly, J. J. (1984). Kinetics of methionine and choline and their incorporation into plasma lipids and milk components in lactating goats. *Journal of Dairy Science*, 67, 1912-1918.
9. Girard, C. L., Lapiere, H., Matte, J. J. & Lobley, G. E. (2004). Effects of dietary supplements of folic acid and rumen-protected methionine on lactational performance and folate metabolism of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 88, 660-670.
10. Grummer, R. R., Shaver, R. D. & Gunderson, S. (2001). Feed additives for the transition cow, In: *Tri-State Dairy Nutrition Conference*, 20-21 April, Fort Wayne, Indiana, USA, pp. 42-45.
11. Johnson, H. E., Whitehouse, N. L., Garthwaite, B. D., Piepenbrink, M. S. & Schwab, C. G. (1999). Supplementation of corn and barley-based diets of late gestation and early lactation cows with liquid methionine hydroxy analog. *Journal of Dairy Science*, 82(Suppl. 1), 65.
12. Lara, A., Mendoza, G., Landois, L., Barcena, R., Sánchez-Torres, M., Rojo, R., Ayala, J. & Vega, S. (2006). Milk production in Holstein cows supplemented with different levels of ruminally protected methionine. *Livestock Science*, 105, 105-108.
13. McMurray, C. H., Blanchflower, W. J. & Rice, D. A. (1984). Automated kinetic method for D-3-hydroxybutyrate in plasma or serum. *Clinical chemistry*, 30, 421-425.
14. National Research Council. (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. (7th ed.). Washington, DC. Nat. Acad. Sci.
15. Overton, T. R., Emmert, L. S. & Clark, J. H. (1998). Effects of source of carbohydrate and protein and rumen-protected methionine on performance of cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 221-228.
16. Pisulewski, P. M., Rulquin, H., & Peyraud, J. L. (1996). Lactational and systemic responses of dairy cows to postruminal infusions of increasing amounts of methionine. *Journal of Dairy Science*, 79, 1781-1789.
17. Rulquin, H. & Delaby, L. (1997). Effects of the energy balance of dairy cows on lactation responses to rumen-protected methionine. *Journal of Dairy Science*, 80, 2513-2522.
18. Schwab, C. G., Ordway, R. S. & Whitehouse, N. L. (2003). Amino acid balancing in the context of MP and RUP requirements, In: *Proceeding of Four-State Applied Nutrition and Management Conference*, 11-12 June, La Crosse, WI, pp. 25-34.