

تأثیر روش‌های مختلف فرآوری بر مؤلفه‌های تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای و قابلیت هضم روده‌ای پروتئین خام و اسیدهای آمینه کنجاله سویا در گاوهای هلستاین

علی خلیج هدایتی^۱، یدالله چاشنی‌دل^{۲*}، مهدی دهقان بنادکی^۳ و اسدالله تیموری یانسری^۴
۱، ۲، ۴. دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیار، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳. دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۸)

چکیده

به منظور تعیین تأثیر روش‌های مختلف فرآوری کنجاله سویای تولیدی از روغن‌کشی به روش حلال بر تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای و قابلیت هضم روده‌ای پروتئین خام و اسیدهای آمینه از سه رأس گاو شیری هلستاین غیرشیرده دارای کاتولای شکمبه‌ای استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) کنجاله سویای فرآوری‌نشده (شاهد)، ۲) کنجاله فرآوری‌شده با افزودن ۲۵ درصد آب و گرمادهی در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، ۳) کنجاله گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه و ۴) کنجاله فرآوری‌شده با افزودن ۳ مول زایلوز به ازای هر مول لیزین و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت درون کیسه‌های نایلونی در شکمبه جاگذاری و نگهداری (انکوباسیون) شدند. فرآوری کنجاله سویا، میزان تجزیه پروتئین خام را در بخش‌های تجزیه با روند سریع، کند و ثابت به ترتیب کاهش، افزایش و کاهش داد ($P < 0.05$). فرآوری بر درصد ناپدید شدن شکمبه‌ای اسیدهای آمینه به جز ترئونین تأثیر معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). ناپدید شدن روده‌ای پروتئین خام تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد، اما تفاوت‌های معنی‌داری در میزان ناپدید شدن اسیدهای آمینه ضروری به جز ترئونین بین تیمارهای آزمایشی مشاهده شد ($P < 0.05$). فرآوری با زایلوز موجب افزایش زیست‌فراهمی اسید آمینه لیزین شد ($P < 0.05$). این نتایج نشان داد، ترکیب اسید آمینه‌ای پروتئین عبوری کنجاله سویا و فرآورده‌های آن با پروتئین خوراک اولیه متفاوت است.

واژه‌های کلیدی: اسید آمینه، تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای، قابلیت هضم روده‌ای، کنجاله سویا.

Effects of different processing of soybean meal on ruminal degradability parameters and intestinal digestibility of crude protein and amino acids in Holstein cows

Ali Khalaj Hedayati¹, Yadollah Chashnidel^{2*}, Mehdi Dehghan Banadaky³ and Asadollah Teimori Yansari⁴
1, 2, 4. Ph.D. Candidate, Assistant Professor and Associate Professor, Agricultural Sciences & Natural Resources University, Sari, Iran
3. Associate Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Jan. 17, 2017 - Accepted: Oct. 30, 2017)

ABSTRACT

Three Non-lactating Holstein cows equipped with ruminal cannulas were used to determine the impact of different methods of treating soybean meal (SBM) on the ruminal degradability and intestinal digestibility of crude protein and amino acids (AA). Solvent-extracted SBM (Control), Meal processed by adding 25% (w/w) water and heated at 150 °C for 30 minutes (treatment 2), Meal heated at 150 °C for 30 minutes (treatment 3), and meal melted xylose by adding 3 moles per mole of lysine and heated at 150 °C for 30 minutes (treatment 4), were incubated in the rumen in nylon bags for 0, 2, 4, 8, 16, 24, and 48 h according to National Research Council (2001) guidelines. Processing of SBM caused to decrease, increase and decrease of rapidly degradable CP fraction, slowly degradable CP fraction and the constant degradation rate of crude protein, respectively ($P < 0.05$). There was a significant differences between treatment on the ruminal disappearance of amino acids except were for threonine and glycine ($P < 0.05$). Intestinal disappearance of crude protein had no difference between treatments. However, the rate of disappearance of essential amino acids except threonine was different between treatments ($P < 0.05$). Processing with xylose improved bioavailability of the lysine ($P < 0.05$). Results had shown that there were differences between RUP amino acid profile of original SBM and processed products.

Keywords: Amino acid, intestinal digestibility, Rumen degradability, Soybean meal.

* Corresponding author E-mail: khedayati@gmail.com

مقدمه

هدف اصلی در تغذیه پروتئین در گاوهای شیرده افزایش بازده استفاده از منابع نیتروژن برای هدف‌های تولیدی است (NRC¹, 2001). تولید مؤثر پروتئین شیر نیازمند عرضه اسیدهای آمینه ضروری در میزان و نسبت‌های درست به‌منظور بیشینه تولید پروتئین و کاهش هدررفت است (Doepel *et al.*, 2016). برخی از مدل‌های رایج تغذیه‌ای، نیازهای پروتئین را به‌صورت پروتئین قابل سوخت‌وساز (متابولیسم) بیان می‌کنند که مجموع پروتئین قابل هضم ناشی از وجود میکروب‌های شکمبه، پروتئین غیرقابل تجزیه در شکمبه^۲، و منابع پروتئین با منشأ داخلی است (Sniffen *et al.*, 1992; NRC, 2001).

بررسی و تجزیه و تحلیل چند متغیره اندازه‌گیری عبور اسیدآمینه به روده باریک نشان داد، غلظت‌های تک‌تک اسیدهای آمینه در بخش RUP و نیز سهم نسبی RUP به‌کل پروتئینی که به دوازدهم عبور می‌کند بیشتر تغییرات در ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین دوازدهم‌ای را برآزش می‌کند (NRC, 2001). در گاوهای شیرده پر تولید، RUP نماینده بخش اصلی تشکیل‌دهنده اسیدهای آمینه قابل سوخت‌وساز است (Mjoun *et al.*, 2010). برخی دستگاه‌های ارزیابی پروتئین مانند سامانه هلندی (Van *et al.*, 2011) پروتئین (Duinkerken & Larsen, 2011)، نوردایک (NRC 2001) فرض می‌کنند که ترکیب اسیدهای آمینه RUP همسان ترکیب اسیدهای آمینه ماده خوراکی اولیه است. اگرچه نتایج متناقض بوده، اما ثابت شده که ترکیب اسیدهای آمینه خوراک در فرآیند عبور از شکمبه تغییر می‌کند (Erasmus *et al.*, 1996; Mjoun *et al.*, 2010; Maxin *et al.*, 2013). در نتیجه برآورد دقیق ترکیب بخش اسیدآمینه عبوری در تنظیم جیره‌ها برای تأمین نیاز پروتئینی دام و نه بیش از آن، اهمیت دارد. برحسب قابلیت هضم روده‌ای و ترکیب اسیدآمینه، محتوای RUP در بین مواد خوراکی به‌طور گسترده‌ای متفاوت است (Prestlúkken & Rise, 2003). به‌ویژه آنکه ترکیب اسیدهای آمینه

بخش جذب‌شده از RUP، می‌تواند به‌طور مشخصی از خوراک اولیه متفاوت باشد (Maxin *et al.*, 2013). در شرایط معمول تغذیه‌ای میزان ناکافی یا الگوی نامناسب اسیدهای آمینه ضروری جذب‌شده از روده باریک گاوهای شیرده (به‌ویژه اسیدهای آمینه متیونین، لیزین و هیستیدین) (NRC, 2001) ممکن است تا حدی مسئول ایجاد یا تشدید کاهش کارایی استفاده از نیتروژن پس از جذب آن از روده باریک باشد (Lobly, 2002). با وجود کاستی‌های سامانه‌های موجود تغذیه‌ای به‌طور کلی علاقه زیادی در متخصصان تغذیه دام برای تنظیم جیره گاوهای شیری از لحاظ اسیدهای آمینه، به دلیل سودمندی‌های بالقوه آن در افزایش پروتئین شیر و بهبود کارایی استفاده از نیتروژن دارند (Schwab, 2010). لذا انتخاب منبع مناسب مکمل پروتئینی برای تغذیه، یک فرصت عالی به‌منظور تأثیرگذاری بر تأمین اسیدهای آمینه مورد نیاز گاوهای شیرده ایجاد می‌کند. این امر به خاطر آن است که منبع پروتئین خام، تأمین روده‌ای اسیدهای آمینه را به‌وسیله تأثیرگذاری بر میزان عبور RUP و نیتروژن میکروبی به قسمت‌های بعدی دستگاه گوارش را تعدیل می‌کند (Ipharraguerre *et al.*, 2005).

به‌منظور موفقیت راهبردهای تغذیه‌ای که برای متعادل کردن اسیدهای آمینه هدف‌گذاری شده‌اند، مدل‌ها نیازمند برآورد دقیق پروتئین عبوری خوراک‌ها، ترکیب و قابلیت هضم تک‌تک اسیدهای آمینه در پروتئین عبوری هستند (Paz-*et al.*, 2014). کنجالة سوپا یک منبع اسیدآمینه‌ای با کیفیت در تغذیه گاو شیری به‌شمار می‌آید، اما درصد تجزیه‌پذیری آن در شکمبه بالا بوده و تجزیه پروتئین‌های آن در شکمبه به سود ساخت (سنتر) پروتئین میکروبی یک امر نامطلوب در گاوهای شیری پر تولید به‌شمار می‌آید. به همین دلیل روش‌های فرآوری چندی به‌صورت تجاری برای افزایش بخش پروتئین عبوری آن توسعه‌یافته است و در برجسب‌های تجاری فرآورده‌ها، اعداد مختلفی از RUP گزارش شده است. اما مورد اصلی در تنظیم جیره‌های گاو شیری میزان فراهمی اسیدآمینه در محل جذب آن بوده و هرگونه افزایش در RUP، به‌حتم به معنی افزایش در

1. National Research Council

2. Rumen Undegradable Protein (RUP)

خشک و کنسانتره، دو بار در روز تغذیه شدند. نسبت علوفه به کنسانتره ۷۰:۳۰ و میزان پروتئین جیره ۱۳۰ گرم بر کیلوگرم ماده خشک بود. نمونه‌های فرآوری شده و شاهد توسط آسیاب آزمایشگاهی دارای غربال ۲ میلی‌متری آسیاب شدند. میزان نمونه ۱۵ میلی‌گرم به ازای هر سانتی‌متر مربع از سطح کیسه‌ها، اندازه منافذ ۴۶ میکرومتر و جنس کیسه‌ها از پلی‌استر بود. دو کیسه برای هر نمونه در زمان‌های ۴، ۲۰، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت درون شکمبه هر یک از گاوها جاگذاری و نگهداری (انکوبه) شد. نمونه‌ها پیش از جاگذاری به مدت بیست دقیقه در آب با دمای ۳۹ درجه سلسیوس خیسانده شدند. در ضمن برای برآورد میزان ناپدید شدن در زمان صفر، کیسه‌های حاوی مواد خوراکی تنها با آب سرد شستشو شدند و برای مراحل بعدی با استفاده از سرما خشک^۱ شدند. داده‌های تجزیه پروتئین خام شکمبه‌ای به رابطه Ørskov & McDonald (1979) برازش شد:

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

که در این مدل، P درصد قابلیت تجزیه‌پذیری در شکمبه؛ a درصد بخش سریع تجزیه که در زمان صفر پس از انجام روش شستشو از کیسه‌ها ناپدید شده است؛ b درصد کند تجزیه؛ c ثابت تجزیه بخش b در واحد زمان و t زمان نگهداری (h) است. برای انجام محاسبات تجزیه‌پذیری از رویه غیرخطی نرم‌افزار SAS (2006) استفاده شد. درصد تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین در درصد عبور ۰/۰۵ و ۰/۰۸ در ساعت با استفاده از رابطه Ørskov & McDonald (1979) به صورت زیر محاسبه شد:

$$ED = a + b \cdot c / (c + k_p)$$

که در آن k_p نرخ عبور از شکمبه و a و b مؤلفه‌های محاسبه شده در بخش پیش و c برابر با ثابت تجزیه بخش b است.

تعیین پروتئین خام نمونه‌ها بر پایه روش کلدال انجام شد. ترکیب اسیدهای آمینه در مواد خوراکی اولیه، بقایای روش *In situ* پس از ۱۶ ساعت شکمبه گذاری با استفاده از فام‌نگاری (کروماتوگرافی) مایع با

فراهمی اسیدآمینه برای حیوان نیست. لذا با توجه به کمبود داده‌ها در مورد میزان عبور و ترکیب اسیدآمینه‌ای پروتئین عبوری کنجاله سویای فرآوری شده و لزوم دسترسی به داده‌های جدید برای تجدیدنظر در فرض اولیه سامانه‌های تغذیه‌ای بالا در مورد ترکیب اسیدآمینه‌ای پروتئین عبوری، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر فرآوری‌های انجام‌یافته بر روند تغییر مؤلفه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین خام و قابلیت هضم روده‌ای آن و تعیین دقیق‌تر ترکیب اسیدهای آمینه در بخش پروتئین غیرقابل تجزیه و قابلیت هضم روده‌ای آن‌ها در کنجاله سویای فرآوری شده به روش‌های مختلف انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این تحقیق، از کنجاله سویای تجاری تولیدشده به روش استفاده از حلال توسط کارخانه روغن‌کشی بهشهر نمونه‌گیری شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) کنجاله سویای بدون فرآوری (شاهد)، (۲) کنجاله فرآوری شده با اضافه کردن ۲۵ درصد وزنی آب و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، (۳) کنجاله گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، (۴) کنجاله فرآوری شده با افزودن ۳ مول زایلوز به ازای هر مول لیزین و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، بودند. برای مخلوط کردن زایلوز با کنجاله، پس از تعیین شمار مول اسیدآمینه لیزین در ۳۰۰ گرم نمونه کنجاله سویا و محاسبه گرم زایلوز مورد نیاز برای ایجاد نسبت اشاره شده در بالا، در آغاز زایلوز (Merck, Darmstadt, Germany) در ۷۵ میلی‌لیتر آب حل شده و پس از اسپری روی کنجاله به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس درون آون گرما داده شد.

برای انجام آزمایش از سه رأس گاو هلشتاین غیرشیرده موجود در ایستگاه آموزشی و پژوهشی دانشگاه تهران با میانگین وزن (۵۴±) ۷۵۰ کیلوگرم دارای کانولای شکمبه‌ای منعطف به قطر ۱۰ سانتی‌متر استفاده شد. گاوها در سطح نگهداری و با جیره‌ای کامل مخلوط شده متشکل از کاه، یونجه

1. Freeze Dried

برآورد میزان مشارکت پروتئین عبوری سویا در فراهم کردن اسیدآمینة قابل جذب در روده با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Mjoun *et al.*, 2010):

= اسیدآمینة قابل جذب در روده فراهم شده

توسط پروتئین عبوری کنجاله سویا

× (درصد تجزیه در شکمبه پس از ۱۶ ساعت - ۱۰۰)

۱۰ / (غلظت اسیدآمینة در خوراک اولیه) × (درصد ناپدید

شدن روده‌ای)

محاسبه‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کامل تصادفی که مدل آن به صورت زیر است انجام شد.

$$y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

که در آن y_{ij} : ارزش متغیر مورد بررسی از تیمار i ام، μ : میانگین کل، T_i : تأثیر تیمار (فرآوری) i ام و e_{ij} : تأثیر تصادفی خطا بودند. برای انجام محاسبات آماری از رویه GLM نرم‌افزار SAS (2006) استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

پروتئین خام کنجاله‌های سویای اولیه و فرآوری شده و همچنین اسیدهای آمینه در فرآورده‌ها با میزان منتشرشده توسط (NRC, 2001) قابل مقایسه است (جدول ۱). محتوای پروتئین خام فرآورده‌های مورد آزمایش با اختلاف‌های جزئی در حدود ۴۶ درصد بود. غلظت نیتروژن غیر پروتئینی (NPN) از لحاظ عددی در فرآورده‌های تیمار شده نسبت به کنجاله فرآوری نشده کمتر بود. همچنین تیمارهای فرآوری شده حاوی لیزین و متیونین کمتری بودند که ممکن است به دلیل واکنش‌های پیوندی و متقاطع دربرگیرنده این اسیدهای آمینه به عنوان نتیجه روش فرآوری باشد (Gerrard, 2002). این امر می‌تواند سبب کاهش آزادسازی آن‌ها در فرآیند آبکافت (هیدرولیز) اسیدی شود.

فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای

فرآوری گرمای میزان تجزیه پروتئین خام را در

کارایی بالا^۱ (Model: Younglin, - South Korea; Detector: Flourence, KNAURE, Japan; Column (unpolar): 15cm×4.6mm×5μ) و بر پایه دستورکار کمیسیون اروپایی (European Commission, 1998) در آزمایشگاه مسعود تهران، انجام شد. همچنین نسبت غلظت اسیدهای آمینه در بقایای پس از ۱۶ ساعت جاگذاری و نگهداری در شکمبه به غلظت اسیدهای آمینه در ماده خوراکی اولیه، برای محاسبه درصد ناپدید شدن اسیدهای آمینه در شکمبه تعیین شد. دلیل انتخاب ۱۶ ساعت زمان شکمبه‌گذاری، همانندسازی زمان معمول توقف کنجاله سویا در شکمبه در شرایط طبیعی، است (Paz *et al.*, 2014). درصد ناپدید شدن روده‌ای اسیدهای آمینه به صورت آزمایشگاهی و به روش سه مرحله‌ای (Calsamiglia & Gargallo *et al.*, 1995; Stern, 1995)، تصحیح شده توسط (Stern, 1995) تعیین شد که با محاسبه نسبت غلظت اسیدهای آمینه در نمونه باقی مانده از روش بالا به غلظت اسیدهای آمینه در RUP انجام شد. در این روش در آغاز نمونه‌ها پس از ۱۶ ساعت جاگذاری و نگهداری در شکمبه و انجام مرحله شستشو در آن خشک شدند. سپس ۰/۵ گرم از هر یک از تیمارها درون کیسه‌های نایلونی با ابعاد ۵×۵ سانتی‌متر و با اندازه منافذ ۵۰ میکرومتر ریخته شد. کیسه‌ها در سه تکرار برای هر نمونه درون بطری‌های دستگاه شکمبه مصنوعی (DaisyII) قرار داده شده و به مدت یک ساعت در ۲ لیتر محلول اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال حاوی ۱ گرم در لیتر آنزیم پپسین (pH=۱/۹) و در دمای ۳۹ درجه سلسیوس با گردش ملایم نگهداری شدند. پس از آن کیسه‌ها (تا صاف شدن آب ناشی از شستشو) شستشو شدند. در مرحله بعد کیسه‌ها در ۲ لیتر محلول با غلظت ۳ گرم در لیتر پانکراتین (حاوی بافر ۰/۵ مولار KH_2PO_4 و ۵۰ PPM تیمول، pH=۷/۷۵) به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۳۹ درجه سلسیوس و درون بطری‌های دستگاه نگهداری شدند. سپس کیسه‌ها شستشو و در آن خشک و نمونه‌های اولیه و بقایای موجود در کیسه‌ها برای سنجش میزان ازت و اسیدهای آمینه تجزیه شدند.

1. HPLC (High performance liquid chromatography)

جدول ۱. مقادیر پروتئین خام و ترکیب اسیدهای آمینه کنجاله سویای فرآوری شده به روش های مختلف
Table 1. Crude protein content and amino acid composition of soybean meal processed with different method

Item	Treatment ¹			
	SE	MH	DH	XH
CP (% DM)	46.60	46.45	46.70	45.55
NPN (% CP)	14.11	13.25	12.13	10.98
EAA ² (%CP)				
Arginine	5.91	7.10	7.01	7.59
Histidine	3.11	2.95	2.75	3.51
Isoleucine	4.76	4.28	5.14	4.38
Leucine	6.75	6.69	7.46	6.63
Lysine	7.83	5.94	6.31	6.84
Methionine	1.44	1.41	1.40	1.39
Threonine	3.11	3.33	4.11	4.11
Valine	4.33	4.20	4.56	4.35
Phenylalanine	3.78	3.80	4.61	3.46
TEAA ³	41.02	39.70	43.35	42.26
NEAA ³ (% CP)				
Alanine	3.88	4.14	3.85	4.33
Glycine	4.26	4.61	5.44	4.86
Serine	4.90	5.01	5.73	5.37
Tyrosine	2.36	2.37	2.90	2.07
Aspartic acid	10.63	11.68	9.68	12.21
Glutamic acid	17.22	17.63	15.34	17.92
TNEAA ³	43.25	45.44	42.94	46.76

۱. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) کنجاله سویای روغن کشی شده به روش استفاده از حلال و بدون فرآوری (SE)، (۲) کنجاله فرآوری شده با اضافه کردن ۲۵ درصد وزنی آب و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (MH)، (۳) کنجاله گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (DH)، (۴) کنجاله فرآوری شده با افزودن ۳ مول زایلوز به ازای هر مول لیزین و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (XH) بودند.

۲ و ۴. اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری.

۳ و ۵: کل اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری.

1. Treatment concluded 1) Solvent-Extracted SBM (SE), 2) Meal processed by adding Moisture (25% water) and Heated at 150 °C for 30 minutes (MH), 3) Dry Heated at 150 °C for 30 minutes (DH), and 4) meal melted Xylose by adding 3 moles per mole of lysine and Heated at 150 °C for 30 minutes (XH).

2, 4. Essential and None Essential Amino Acids.

3, 5. Total Essential and None Essential Amino Acids.

جدول ۲. تأثیر روش های فرآوری بر فراسنجه های مختلف

تجزیه پذیری و تجزیه پذیری مؤثر کنجاله سویا

Table 2. Effect of different processing method on degradability and effective degradability parameters of soybean meal

Parameter ^c	Treatment				SEM	P-value
	SE	MH	DH	XH		
A (%)	15.79 ^a	12.58 ^{ab}	8.58 ^b	12.06 ^b	1.47	0.04
B (%)	83.26 ^b	87.42 ^{ab}	90.56 ^a	84.96 ^b	1.58	0.03
C (%/h)	5.40	3.80	4.40	3.90	0.03	0.29
ERDP (5%/h)	58.57 ^a	50.17 ^b	50.73 ^b	48.97 ^b	2.18	0.04
ERDP (8%/h)	49.00 ^a	40.60 ^{ab}	40.53 ^b	39.7 ^b	2.19	0.03

۱. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) کنجاله سویای روغن کشی شده به روش حلالی و بدون فرآوری (SE)، (۲) کنجاله فرآوری شده با اضافه کردن ۲۵ درصد وزنی آب و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (MH)، (۳) کنجاله گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (DH)، (۴) کنجاله فرآوری شده با افزودن ۳ مول زایلوز به ازای هر مول لیزین و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (XH) بودند.

ab: میانگین ها در یک سطر با حرف های همسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند ($P < 0.05$).

1. Treatment concluded: 1) Solvent-Extracted SBM (SE), 2) Meal processed by adding Moisture (25% water) and Heated at 150 °C for 30 minutes (MH), 3) Dry Heated at 150 °C for 30 minutes (DH), and 4) meal melted Xylose by adding 3 moles per mole of lysine and Heated at 150 °C for 30 minutes (XH).

2. a: Quick degradable fraction, b: slowly degradable fraction, c: constant of degradation, ERDP: Effective rumen degradation protein.

ab: Means within a row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

بخش های تجزیه با روند سریع، کند و ثابت به ترتیب کاهش، افزایش و کاهش داد ($P < 0.05$). تجزیه پذیری مؤثر پروتئین خام در میزان های عبور ۵ و ۸ درصد بر ساعت به طور معنی داری بین تیمارها تفاوت داشت به طوری که کمترین میزان (۳۹/۷ درصد در ساعت) مربوط به تیمار فرآوری شده با زایلوز بود ($P < 0.05$). ضریب های تجزیه پذیری در تیمارهای فرآوری شده نسبت به شاهد (تیمار فرآوری نشده) نیز تفاوت معنی داری را نشان دادند ($P < 0.05$). تأثیر فرآوری گرمایی و شیمیایی در کاهش تجزیه پذیری پروتئین خام کنجاله سویای روغن کشی شده با استفاده از حلال در این آزمایش با میزان های گزارش شده توسط Harstd & Prestlücken (2000) و Borucki Castro *et al.* (2007) همخوانی داشت. همچنین گرما دادن سبب کاهش معنی دار بخش محلول و افزایش بخش آهسته تجزیه شونده پروتئین کنجاله سویا شد که با یافته های Samadi *et al.* (2011) همخوانی دارد. به طور کلی بهینه ترین شرایط فرآوری گرمایی، شرایطی است که به طور معنی داری قابلیت هضم شکمبه ای پروتئین را کاهش دهد و تأثیر زیان آوری بر هضم در قسمت های پس از شکمبه یا زیست فراهمی اسیدهای آمینه، نداشته باشد (NRC, 2001). Satter (1986) رابطه های بین گرمای اعمال شده و غلظت های RDP، RUP، غیرقابل هضم و RUP قابل هضم را به خوبی توضیح داده است.

در یک تحقیق در رابطه با عامل های مؤثر بر تجزیه پذیری شکمبه ای پروتئین، Nocek (1985) نتیجه گرفت که تصحیح آلودگی میکروبی در مکمل های پروتئینی مانند کنجاله سویا ضروری نیست. Varvikko (1986) در مقایسه ترکیب اسید آمینه ای RUP در بقایای کیسه شکمبه ای با یا بدون تصحیح میکروبی، نشان داد که آلودگی میکروبی تأثیر معنی داری بر ترکیب اسید آمینه ای RUP در مکمل های پروتئینی ندارد. لذا در این پژوهش فرض بر آن است که تأثیر آلودگی میکروبی بر ترکیب واقعی اسیدهای آمینه RUP ناچیز است و هیچ تصحیحی برای آن انجام نشده است.

تجزیه اسیدهای آمینه در شکمبه

به‌طور کلی پس از ۱۶ ساعت جاگذاری و نگهداری نمونه‌ای از تیمارها در شکمبه غلظت اسیدهای آمینه به‌جز ترئونین به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود بیشترین میزان ناپدید شدن در تیمار شاهد مربوط به اسیدگلوتامیک، هیستیدین، آرژنین و لیزین بود در حالی‌که اسید آمینه گوگردار متیونین و اسیدهای آمینه شاخه‌دار (ایزولوسین و لوسین) کمترین میزان‌های ناپدید شدن را دارند. جلوگیری فضایی شاخه‌جانبی اسیدهای آمینه شاخه‌دار و همچنین خاصیت آب‌گریزی آن‌ها دسترسی آنزیم‌های میکروبی را محدود می‌کند (Finly, 1985; Lio, 1999) که می‌تواند دلیل درصدهای به نسبت آهسته تجزیه اسیدهای آمینه شاخه‌دار باشد. پژوهش انجام‌شده توسط Van straalen *et al.* (1997) تجزیه آهسته‌تر متیونین و سیستئین را در مقایسه با اسیدهای آمینه دیگر در کنجاله سویای روغن‌کشی شده با حلال، نشان داده است که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. فرآوری بر کاهش درصد ناپدید شدن شکمبه‌ای اسیدهای آمینه به‌جز ترئونین مؤثر بود ($P < 0.05$). فرآوری سبب کاهش تجزیه شکمبه‌ای متیونین و لیزین شد ($P < 0.05$), به‌طوری‌که تیمار فرآوری‌شده با زایلوز کمترین درصد ناپدید شدن هر دو اسید آمینه در شکمبه را داشت. متیونین اغلب نخستین اسید آمینه محدودکننده رشد و تولید پروتئین شیر (Titgemeyer *et al.*, 1990b; Richadson *et al.*, 1978) و لیزین دومین اسید آمینه محدودکننده (Tice *et al.*, 1993) در تولید پروتئین شیر است و با حساسیت بیشتری تحت تأثیر روش فرآوری مورد استفاده برای محافظت پروتئین‌ها، از تجزیه در شکمبه، قرار می‌گیرد (Windschitl & Stern, 1988). واکنش قند احیاکننده زایلوز با آمین‌های اولیه به‌ویژه گروه آمینوی اپسیلون بقایای لیزین، می‌تواند علت کاهش تجزیه این اسیدهای آمینه در شکمبه باشد (Cleale *et al.*, 1987). درصد ناپدید شدن فنیل آلانین و تیروزین بر اثر فرآوری کنجاله سویا به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). فرآوری گرمایی

مرطوب (۲۳/۸۴ درصد) موجب کاهش معنی‌دار تجزیه تیروزین در رویارویی با میکروب‌های شکمبه شد. اسید آمینه ضروری فنیل آلانین پیش ماده ساخت (سنتز) اسید آمینه غیر ضروری تیروزین است (NRC, 2001). فرآوری همچنین درصد تجزیه شکمبه‌ای هیستیدین و آرژنین را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. بنابراین با فرآوری مناسب کنجاله سویا می‌توان با صرفه‌جویی در تیروزین میزان تبدیل فنیل آلانین به تیروزین را کاهش داد ($P < 0.05$). هیستیدین در گاوهای شیری تغذیه‌شده با جیره‌های بر پایه نوع و میزان علوفه (گراس) سیلوشده و غلات با پروتئین اندک، نخستین اسید آمینه محدودکننده تولید شیر است (Vanhatalo *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001a). بنابراین این امکان وجود دارد که افزودن کنجاله سویای فرآوری‌شده و افزایش عبور هیستیدین به روده باریک در این نوع جیره‌ها، منجر به افزایش تولید شیر شود. مقایسه درصدهای ناپدید شدن شکمبه‌ای اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری نشان داد که فرآوری گرمایی مرطوب و فرآوری با زایلوز نسبت به فرآوری گرمایی بدون افزودن رطوبت تأثیر بیشتری در کاهش تجزیه اسیدهای آمینه پروتئین‌های کنجاله سویا در شکمبه و بنابراین افزایش درصد عبور آن‌ها به روده دارند (جدول ۳).

هضم روده‌ای

ناپدید شدن روده‌ای پروتئین خام و اسیدهای آمینه، تعیین‌شده به روش آزمایشگاهی (Gargallo *et al.*, 2006)، در جدول ۴ ارائه شده است. ناپدید شدن روده‌ای پروتئین خام تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد. اما تفاوت‌های معنی‌داری در درصد ناپدید شدن تک تک اسیدهای آمینه ضروری به‌جز ترئونین و تیروزین بین تیمارهای آزمایشی مشاهده شد. به‌طور نمونه درصد ناپدید شدن هیستیدین (۷۷/۲۷)، لیزین (۷۲/۶۸) و فنیل آلانین (۶۹/۲۵) در تیمار سوم کمترین بود و در مورد لیزین بالاترین نرخ (۸۸/۸۶) مربوط به تیمار چهارم بود ($P < 0.01$). سال‌هاست که متیونین محافظت‌شده برای تغذیه در نشخوارکنندگان در دسترس است (Overton *et al.*, 1998; Patton *et al.*, 2010) و اجازه

در مورد میزان اسیدهای آمینه قابل جذب در روده ناشی از پروتئین عبوری، به جز در مورد لیزین، گلايسين و اسيد آسپارتیک تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۵). سطح لیزین عرضه شده در روده توسط بخش RUP تیمار چهار تفاوت معنی داری ($P < 0.04$) نسبت به دیگر تیمارها داشت که نشان دهنده مؤثر بودن فرآوری با زایلوز در محافظت از این اسید آمینه بود. فرآوری گرمایی مرطوب موجب افزایش قابلیت جذب اسیدهای آمینه آسپارتیک و گلايسين در روده شد. کل اسیدهای آمینه قابل جذب در روده که توسط پروتئین عبوری تیمار فرآوری شده به صورت مرطوب تأمین شده از لحاظ عددی بیشترین بود اما این تفاوتها معنی دار نبود. مقادیر به دست آمده برای اسیدهای آمینه قابل جذب کنجاله سویای بدون فرآوری در روده کمتر از میزان گزارش شده توسط Mjoun *et al.* (2010) بود. البته این محققان از روش گردآوری نمونه ها در انتهای دستگاه گوارش برای تعیین قابلیت هضم روده ای استفاده کردند. به دلیل کمبود منابع امکان مقایسه میزان به دست آمده برای دیگر تیمارها با نتایج دیگر پژوهش ها وجود نداشت.

تنظیم بسیار دقیق جیره ها را برای آن می دهد اما فناوری تولید لیزین محافظت شده از تخریب شکمبه ای مانند متیونین موفق نبوده است (Wu, 2012). لذا برای افزایش هضم روده ای لیزین، تیمار فرآوری با زایلوز می تواند مورد توجه باشد. همچنین فرآوری سبب کاهش معنی دار هضم روده ای فنیل آلانین ($P < 0.01$)، والین و متیونین شد ($P < 0.05$). فرآوری با زایلوز در تیمار چهار موجب کاهش معنی دار هضم روده ای والین و آلانین شد ($P < 0.05$). فرآیند گرمایی قابلیت تجزیه پروتئین را در شکمبه، با تغییر ساختار پروتئین ها و به وسیله تشکیل پیوندهای عرضی پروتئین- کربوهیدرات (واکنش های میلارد) و پروتئین- پروتئین، کاهش می دهد (NRC, 2001). Cleale *et al.* (1987) اثبات کردند که واسطه های واکنش میلارد پیش از همپار کردن (ایزومریزاسیون) برای گوسفندان به کلی در دسترس هستند، لذا فرآوری با هدف تولید این واسطه ها در تغذیه گاوهای شیری به شکلی که اسیدهای آمینه را از تخمیر در شکمبه محافظت کرده و در روده قابل هضم باشد یکی از مطلوب ترین حالتها برای متخصصان تغذیه است. به دلیل کمبود منابع در این مورد امکان مقایسه با نتایج دیگر تحقیقات وجود نداشت.

جدول ۳. ناپدید شدن پروتئین خام و اسیدهای آمینه کنجاله سویا پس از ۱۶ ساعت نگهداری (درصدی از ماده خوراکی اولیه)
Table 3. Ruminal degradation of CP and AA of soybean meal after 16 h of ruminal incubation¹ (% of original feed)

Item	Treatments				SEM	P-value
	SE	MH	DH	XH		
CP	50.81 ^a	33.28 ^b	34.34 ^b	32.25 ^b	3.16	<0.01
EAA ²						
Arginine	38.12 ^a	30.89 ^b	35.56 ^{ab}	32.06 ^{ab}	1.68	0.05
Histidine	38.53 ^a	30.47 ^b	35.82 ^{ab}	30.16 ^b	2.07	0.04
Isoleucine	34.29 ^a	24.09 ^b	32.05 ^{ab}	24.73 ^b	3.25	0.05
Leucine	32.90 ^a	24.67 ^{ab}	33.07 ^a	23.06 ^b	3.20	0.04
Lysine	36.35 ^a	30.57 ^{ab}	36.27 ^a	25.63 ^b	2.92	0.02
Methionine	33.23 ^a	28.05 ^{ab}	32.55 ^a	25.75 ^b	1.80	0.02
Threonine	34.84	28.80	34.42	29.27	1.62	0.22
Valine	35.83 ^a	24.98 ^c	32.89 ^{ab}	27.10 ^{bc}	2.51	0.03
Phenylalanine	32.56 ^a	26.22 ^{ab}	32.39 ^a	21.85 ^b	3.24	0.06
NEAA ³						
Alanine	35.45 ^a	28.22 ^b	33.38 ^{ab}	28.78 ^b	1.76	0.05
Glycine	35.03 ^{ab}	35.79 ^a	30.12 ^b	29.86 ^b	1.57	0.06
Serine	36.61 ^a	29.10 ^b	34.28 ^{ab}	29.10 ^b	1.89	0.05
Tyrosine	35.48 ^a	23.84 ^b	31.07 ^{ab}	27.56 ^{ab}	2.48	0.08
Aspartic acid	36.76 ^a	25.08 ^b	32.32 ^{ab}	26.75 ^{ab}	2.67	0.11
Glutamic acid	39.73 ^a	30.53 ^{bc}	36.12 ^{ab}	28.89 ^c	2.46	0.01

۱. تیمارهای آزمایشی شامل ۱) کنجاله سویای روغن کشی شده به روش حلالی و بدون فرآوری (SE)، ۲) کنجاله فرآوری شده با اضافه کردن ۲۵ درصد وزنی آب و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (MH)، ۳) کنجاله گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (DH)، ۴) کنجاله فرآوری شده با افزودن ۳ مول زایلوز به ازای هر مول لیزین و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (XH) بودند.

۲ و ۳. اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری

abc میانگین ها در یک سطر با حرف های غیر همسان تفاوت معنی داری با یکدیگر دارند ($P < 0.05$)

¹: Treatment concluded 1) Solvent-Extracted SBM (SE), 2) Meal processed by adding Moisture (25% water) and Heated at 150 ° C for 30 minutes (MH), 3) Dry Heated at 150 ° C for 30 minutes (DH), and 4) meal melted Xylose by adding 3 moles per mole of lysine and Heated at 150 ° C for 30 minutes (XH).

^{2,3}: Essential and None Essential Amino Acids.

ab: Means within a row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

جدول ۴. تأثیر روش‌های مختلف فرآوری کنجاله سویا بر درصد ناپدید شدن روده‌ای پروتئین خام و اسیدهای آمینه که به روش آزمایشگاهی اندازه‌گیری شده است (درصدی از RUP)

Table 4. Effects of different methods of soybean meal treatment on intestinal disappearance of CP and AA *in vitro* (% RUP) treatment

Item	Treatments ¹				SEM	P-value
	SE	MH	DH	XH		
CP	79.08	84.12	80.16	82.71	1.68	0.94
EAA (%)						
Arginine	87.14	84.48	82.89	83.64	0.93	0.93
Histidine	82.93 ^{ab}	86.74 ^a	77.27 ^b	82.51 ^{ab}	1.95	0.02
Isoleucine	82.18 ^a	78.51 ^a	76.69 ^{ab}	70.60 ^b	2.42	0.03
Leucine	82.91 ^a	78.55 ^{ab}	71.56 ^c	73.44 ^{bc}	2.56	0.001
Lysine	79.21 ^b	75.21 ^b	72.68 ^b	88.86 ^a	3.55	0.002
Methionine	80.08 ^a	76.15 ^b	81.05 ^a	77.45 ^b	2.47	0.03
Threonine	77.49	73.57	74.52	79.22	1.31	0.24
Valine	82.16 ^a	79.74 ^{ab}	77.15 ^{ab}	70.36 ^b	2.55	0.14
Phenylalanine	85.83 ^a	75.44 ^b	69.25 ^b	74.46 ^b	3.47	0.01
NEAA (%)						
Alanine	78.30 ^a	76.25 ^{ab}	75.94 ^{ab}	66.89 ^b	2.54	0.07
Glycine	76.01 ^b	77.25 ^{ab}	83.81 ^a	75.14 ^b	1.97	0.08
Serine	81.84 ^a	79.59 ^{ab}	70.13 ^b	75.28 ^{ab}	2.58	0.11
Tyrosine	77.80	80.44	74.10	78.31	1.32	0.66
Aspartic acid	86.62 ^{ab}	94.64 ^a	86.81 ^{ab}	79.04 ^b	3.18	0.05
Glutamic acid	89.77 ^a	86.21 ^{ab}	81.56 ^b	88.39 ^a	1.80	0.06

۱. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) کنجاله سویای روغن‌کشی‌شده به روش حلالی و بدون فرآوری (SE)، ۲) کنجاله فرآوری‌شده با اضافه کردن ۲۵ درصد وزنی آب و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (MH)، ۳) کنجاله گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (DH)، ۴) کنجاله فرآوری‌شده با افزودن ۳ مول زایلوز به ازای هر مول لیزین و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (XH) بودند. در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه بودند.

ab: میانگین‌ها در یک سطر با حرف‌های غیرهمسان تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P < 0.05$)

1: Treatment concluded: 1) Solvent-Extracted SBM(SE), 2) Meal processed by adding Moisture (25% water) and Heated at 150 °C for 30 minutes (MH), 3) Dry Heated at 150 °C for 30 minutes (DH), and 4) meal melted Xylose by adding 3 moles per mole of lysine and Heated at 150 °C for 30 minutes (XH).
ab: Means within a row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

جدول ۵. برآورد اسیدآمینه قابل جذب در روده که توسط پروتئین عبوری کنجاله سویا فراهم می‌شود

Table 5. Estimated intestinally absorbable AA supplied by the RUP of soybean meal

AA (g/kg CP) ²	Treatments ¹				SEM	P-value
	SE	MH	DH	XH		
EAA ³						
Arginine	16.24	20.24	18.53	17.50	0.76	0.45
Histidine	7.38	8.25	7.43	8.01	0.21	0.74
Isoleucine	11.71	12.90	11.63	11.33	0.35	0.77
Leucine	18.03	19.90	17.32	18.42	0.54	0.80
Lysine	16.77 ^b	15.89 ^b	18.04 ^b	23.74 ^a	1.77	0.01
Methionine	7.70	8.05	7.71	7.99	0.39	0.38
Threonine	8.04	8.69	8.97	8.83	0.21	0.86
Valine	11.46	12.33	11.07	11.04	0.30	0.82
Phenylalanine	10.61	10.89	10.76	12.32	0.40	0.70
NEAA ⁴						
Alanine	9.87	11.01	9.61	10.39	0.26	0.47
Glycine	9.63 ^b	10.78 ^b	14.83 ^a	13.89 ^a	1.24	<0.01
Serine	12.33	13.36	12.47	13.50	0.30	0.67
Tyrosine	6.11	6.99	6.45	6.46	0.18	0.84
Aspartic acid	29.05 ^b	38.41 ^a	30.65 ^b	29.29 ^b	2.22	0.01
Glutamic acid	44.91	50.50	42.78	49.09	1.80	0.40
Total AA ⁵	220.49	248.2	233.91	242.47	6.02	0.70

۱. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) کنجاله سویای روغن‌کشی‌شده به روش حلالی و بدون فرآوری (SE)، ۲) کنجاله فرآوری‌شده با اضافه کردن ۲۵ درصد وزنی آب و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (MH)، ۳) کنجاله گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (DH)، ۴) کنجاله فرآوری‌شده با افزودن ۳ مول زایلوز به ازای هر مول لیزین و گرما داده شده در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (XH) بودند.

ab: میانگین‌ها در یک سطر با حرف‌های غیرهمسان تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P < 0.05$)

۲. اسیدآمینه قابل جذب در روده که توسط پروتئین عبوری کنجاله سویا فراهم شده =

$(\text{غلظت اسیدآمینه در خوراک اولیه}) \times (\text{درصد ناپدید شدن روده‌ای}) \times (\text{درصد تجزیه در شکمبه پس از ۱۶ ساعت} - ۱۰۰)$

۳. مجموع اسیدهای آمینه ضروری Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr and Val

۴. مجموع اسیدهای آمینه غیرضروری Ala, Asp, Glu, Gly, Ser and Tyr

۵. مجموع اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری

1. Treatment concluded: 1) Solvent-Extracted SBM (SE), 2) Meal processed by adding Moisture (25% water) and Heated at 150 °C for 30 minutes (MH), 3) Dry Heated at 150 °C for 30 minutes (DH), and 4) meal melted Xylose by adding 3 moles per mole of lysine and Heated at 150 °C for 30 minutes (XH).

2. Absorbable AA supplied by RUP is defined as $(100 - \% \text{ rumen degradability at 16 h}) \times (\% \text{ intestinal disappearance in situ}) \times \text{AA concentrations in the feed}/10$.

3. Sum of Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, and Val.

4. Sum of Ala, Asp, Glu, Gly, Ser, and Tyr.

5. Total AA = essential AA + nonessential AA.

ab: Means within a row with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

بهبتری نشان داد و فرآوری با زایلوز بر افزایش زیست‌فراهمی اسیدآمینه محدودکننده لیزین تأثیر معنی‌داری نشان داد. این نتایج همچنین نشان می‌دهد که ترکیب اسیدآمینه‌ای پروتئین عبوری کنجاله سویا و فرآورده‌های آن با پروتئین خوراک اولیه متفاوت است.

نتیجه‌گیری

کنجاله سویای استخراج‌شده به روش حلالی به دلیل داشتن بخش پروتئین محلول بیشتر و سرعت تخریب شکمبه‌ای بالاتر، تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام بالاتری نسبت به فرآورده‌های تیمار شده نشان داد. در کل فرآوری گرمایی مرطوب نسبت به خشک عملکرد

REFERENCES

1. AOAC. (2006). Official Methods of Analysis. 18th ed. *Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, VA.
2. Borucki Castro, S. I., Phillip, L. E., Lapierre, H., Jardon, P. W. & Berthiaume, R. (2007). Ruminant Degradability and Intestinal Digestibility of Protein and Amino Acids in Treated Soybean Meal Products. *Journal of Dairy Science*, 90, 810-822.
3. Calsamiglia, S. & Stern, M. D. (1995). A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *Journal Animal Science*, 73, 1459-1465.
4. Cleale, R. M., Klopfenstein, T. J., Britton, R. A., Satterlee, L. D. & Lowry, S. R. (1987). Induced non-enzymatic browning of soybean meal. I. Effects of factors controlling non-enzymatic browning on in vitro ammonia release. *Journal of Animal Science*, 65(5), 1312-1318.
5. Crooker, B. A., Clark, J. H., Shanks, R. D. & Fahey Jr, G. C. (1987). Effects of ruminal exposure on the amino acid profile of feeds. *Canadian Journal of Animal Science*, 67(4), 1143-1148.
6. Erasmus, L. J., Botha, P. M., Cruywagen, C. W., & Meissner, H. H. (1994). Amino Acid Profile and Intestinal Digestibility in Dairy Cows of Rumen-Undegradable Protein from Various Feedstuffs. *Journal of dairy science*, 77(2), 541-551.
7. European Commission. (1998). Establishing community methods of analysis for the determination of amino acids, crude oils and fats, and olaquinox in feedingstuffs and amending directive 71/393/EEC. Commission directive 98/64/EC.
8. FDA (U.S. Food and Drug Administration). (2004). CVM and ruminant feed (BSE) inspections. Rule 21 CFR, part 589. 2000. Code of Federal Regulations. Center for Veterinary Medicine, FDA, Washington, DC. <http://www.fda.gov/cvm/RuminantFeed>
9. Finley, J. W. (1985). Reducing variability in amino acid analysis. Pages 15–31 in *Digestibility and Amino Acid Availability in Cereals and Oilseeds*. J.W. Finley and D. T. Hopkins, ed. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN.
10. Doepel, L., Hewage, I. I. & Lapierre, H. (2016). Milk protein yield and mammary metabolism are affected by phenylalanine deficiency but not by threonine or tryptophan deficiency. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 3144-56.
11. Gargallo, S., Calsamiglia, S. & Ferret, A. (2006). A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. *Journal of animal science*, 84(8), 2163-2167.
12. Gerrard, J. A. (2002). Protein-protein cross linking in food: Methods, consequences, applications. *Trends Food Science Technology*, 13, 391-399.
13. Harstad, O. M. & Prestlücken, E. (2000). Effective rumen degradability and intestinal indigestibility of individual amino acids in solvent-extracted soybean meal (SBM) and xylose-treated SBM (Soypass©) determined in situ. *Animal Feed Science Technology*, 83, 31-47.
14. Ipharraguerre, I. R., Clark, J. H. & Freeman, D. E. (2005). Rumen fermentation and intestinal supply of nutrients in dairy cows fed rumen-protected soy products. *Journal of Dairy Science*, 88, 2879-2892.
15. Kim, C.-H., Choung, J.-J. & Chamberlain, D. G. (2001a). Responses of milk production to the intravenous infusion of amino acids in dairy cows given diets of grass silage and cereal-based supplements. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85, 293-300.
16. Lobley, G. E. (2002). Protein turnover-What does it mean for animal production? Pages 1–15 in Proc. Symp. *Amino Acids: Milk, Meat, and More*. H. Lapierre and D. R. Ouellet, ed. Can. Soc. Anim.Sci., Quebec, Canada
17. Liu, K. (1999). Chemistry and nutritional value of soybean components. Pages 25–114 in *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*. Monsanto, ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD
18. Maxin, G., Ouellet, D. R. & Lapierre, H. (2013). Ruminant degradability of dry matter, crude protein, and amino acids in soybean meal, canola meal, corn, and wheat dried distiller's grains. *Journal of Dairy Science*, 96, 5151-5160.

19. Mjoun, K., Kalscheur, K. F., Hippen, A. R. & Schingoethe, D. J. (2010). Ruminant degradability and intestinal digestibility of protein and amino acids in soybean and corn distillers grains products. *Journal of Dairy Science*, 93, 4144-4154
20. Nocek, J. E. (1985). Evaluation of specific variables affecting in situ estimates of ruminal dry matter and protein digestion. *Journal of Animal Science*, 60, 1347-1358.
21. NRC. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. National Research Council, National Academies Press, Washington, DC
22. Ørskov, E. R. & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agriculture Science*, 92, 499-503.
23. 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.
24. 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.
25. Paz, H. A., Klopfenstein, T. J., Hostetler, D., Fernando, S. C. & Kononoff, P. J. (2014). Ruminant degradation and intestinal digestibility of protein and amino acids in high-protein feedstuffs commonly used in dairy diets. *Journal of Dairy Science*, 97, 6485- 6498
26. Prestlücken, E. & Rise, O. (2003). Protein and amino acid digestibility in dairy cows measured with mobile nylon bags recovered in ileum or in faeces. *Acta Agric. Scand. Sect. A Animal Science*, 53, 11-20.
27. Richardson, C. R. & Hatfield, E. E. (1978). The limiting amino acid in growing cattle. *Journal of Animal Science*, 46, 740-745.
28. Yu, P. (2011). Dry and moist heating-induced changes in protein molecular structure, protein subfraction, and nutrient profiles in soybeans. *Journal of dairy science*, 94(12), 6092-6102.
29. Satter, L. D. (1986). Protein supply from undegraded dietary protein. *Journal of Dairy Science*, 69, 2734-2749.
30. Schwab, C. G. (2010). Balancing diets for amino acids: *Nutritional, environmental and financial implications*. Pages 1-13 in proc. Tri –State Dairy Nutri. Conf., Ft. Wayne. IN. The Ohio State University, Columbus.
31. Sniffen, C. J., O'Connor, J. D., Van Soest, P. J., Fox, D. G. & Russell, J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein system availability. *Journal of Animal Science*, 70, 3562-3577.
32. Tice, E. M., Eastridge, M. L. & Firkins, J. L. (1993). Raw soybeans and roasted soybeans of different particle sizes. 1. Digestibility and utilization by lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 76, 224-235.
33. Titgemeyer, E. C. & Merchen, N. R. (1990b). The effect of abomasal methionine supplementation on nitrogen retention of growing steers post-ruminally infused with casein or nonsulfur-containing amino acids. *Journal of Animal Science*, 68, 750-757.
34. Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V. & Varvikko, T. (1999). Responses of dairy cows fed grass silage diets to abomasal infusions of histidine alone or in combinations with lysine and methionine. *Journal of Dairy Science*, 82, 2674-2685.
35. Van Duinkerken, G., Blok, M. C., Bannink, A., Cone, J. W., Dijkstra, J., Van Vuuren, M. & Tamminga, S. (2011). Update of the Dutch protein evaluation system for ruminants: The DVE/OEB2010 system. *Journal of Agriculture Science*, 149, 351-367.
36. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
37. Van Straalen, W. M., Odinga, J. J. & Mostert, W. (1997). Digestion of feed amino acids in the rumen and small intestine of dairy cows measured with nylon-bag techniques. *British Journal of Nutrition*, 77, 83-97.
38. Varvikko, T. (1986). Microbially corrected amino acid composition of rumen undegraded feed protein and amino acid degradability in the rumen of feeds enclosed in nylon bags. *British Journal of Nutrition*, 56, 131-140.
39. Volden, H. & Larsen, M. (2011). Digestion and metabolism in the gastrointestinal tract. Pages 59–80 in *NorFor-The Nordic Feed Evaluation System*. H. Volden, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
40. Windschitl, P. M. & Stern, M. D. (1988). Evaluation of calcium lignosulfonate-treated soybean meal as a source of rumen protected protein for dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 71, 3310-3322.
41. Wu, Z., Bernard, J. K., Eggleston, R. B. & Jenkins, T. C. (2012). Ruminant escape and intestinal digestibility of ruminally protected lysine supplements differing in oleic acid and lysine concentrations. *Journal of Dairy Science*, 95, 2680-2684.