

Evaluación *in vitro* de aminoácidos lisina y metionina con y sin protección

M Duque, R R Noguera y M Olivera¹

Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias – GRICA. Medellín, Colombia.

monicadu82@gmail.com

¹ *Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación Biogénesis. Medellín, Colombia*

Resumen

Con el propósito de evaluar la protección de los aminoácidos sintéticos lisina y metionina se realizó una fermentación ruminal *in vitro* donde se determinaron los parámetros de degradabilidad ruminal, producción de gas y la liberación de nitrógeno amoniacal.

El porcentaje de degradación de la MS y la liberación del amoniac fueron mucho mayor con la urea comparada con los AA los cuales no difieron entre sin o con protección.

Palabras claves: amoniac, degradación ruminal, fermentación, grasa, urea

Evaluation *in vitro* of amino acids lysine and methionine with and without protection against ruminal degradation

Abstract

With the purpose to evaluate the rumen protección of the synthetic amino acids (AA) lysine and methionine, an *in vitro* rumen fermentation was performed where the parameters of ruminal degradability, gas production and release of ammonia were determined compaaared with urea as the N source.

The DM degradability and release of ammonia were much higher with urea compared with the AA which did not differ between protected and unprotected sloures of the two AA.

Key words: ammonia, fermentation, rumen degradation, urea

Introducción

La optimización en la utilización de la proteína es importante para aumentar la eficiencia en la producción de leche y minimizar la liberación de nitrógeno (N) al medio ambiente. En los rumiantes, los aminoácidos que llegan al intestino delgado para cubrir los requerimientos del animal proceden de 3 fuentes: Proteína microbiana, proteína endógena y proteína no degradable en rumen (PNDR). La proteína microbiana es sintetizada a partir de amonio y péptidos que proceden de la degradación de la proteína consumida que llega al rumen. La proteína microbiana que sale del rumen es digerida y absorbida como aminoácidos en el intestino delgado. Se ha establecido que esta proteína es de alta calidad porque contiene una alta proporción de aminoácidos esenciales y un adecuado balance cuando es comparada con la composición de la proteína del músculo y la leche (NRC 2001).

La proteína endógena procede de descamaciones de piel, enzimas, jugos gástricos, etc. La proteína de origen dietario que no es degradada en el rumen (PNDR) entra al intestino delgado, donde es digerida y proporciona aminoácidos esenciales que pueden ser usados para completar y llenar los requerimientos de aminoácidos para el animal (NRC 2001). La calidad de la proteína dietaria que escapa de la degradación ruminal es importante en el suministro de aminoácidos (AA) esenciales adicionales para completar los requerimientos de los animales, sin embargo es insuficiente.

Dos de los aminoácidos esenciales, lisina y metionina son considerados co-limitantes para el crecimiento y síntesis de leche en diferentes tipos de dietas (Socha et al 2005) debido a que la mayoría de los AA de las materias primas de los suplementos son rápidamente degradados por los microorganismos del rumen antes de su absorción a nivel intestinal. Diversas investigaciones se han desarrollado con el fin de encontrar tecnologías adecuadas para proteger aminoácidos como metionina (Met) y lisina (Lys) (Patton 2010), las cuales buscan una mayor precisión en las formulaciones para el ganado de leche.

Estudios in vivo han presentado resultados variables a la suplementación con estos dos aminoácidos (Doepel et al 2004). En algunos trabajos realizados suplementando estos dos aminoácidos no se han encontrado efectos en la producción de leche y producción de proteína (Kröber et al 2000, Liu et al 2000, Ouellet et al 2003, Chung et al 2006). Sin embargo, otros autores han encontrado que la suplementación dietaria con aminoácidos protegidos deficientes en la ración tienen el potencial de incrementar la producción de leche (Robinson et al 1995; Wang et al 2010) y los contenidos de proteína y grasa (Sevi et al 1998, Xu et al 1998, Robinson 2010; Křížová et al 2010), y sus efectos solamente son observados cuando la resistencia a la degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal son altas (Bach y Stern 2000, Rossi et al 2003). En este sentido, tanto la degradabilidad como la digestibilidad intestinal deben ser cuantificadas para determinar el grado de protección y la disponibilidad de las fuentes de aminoácidos, haciendo necesario el

establecimiento de metodologías adecuadas para tal propósito. El objetivo de este trabajo fue evaluar la técnica *in vitro* de producción de gases y la liberación de nitrógeno amoniacal como herramienta para determinar el grado de protección ruminal de los aminoácidos metionina y lisina en rumiantes.

Materiales y métodos

Localización

Este ensayo fue desarrollado en el Laboratorio NUTRILAB - GRICA, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias, ubicado en la Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Tratamientos

Se utilizaron dos aminoácidos Lys y Met con y sin protección como fuente de nitrógeno, las cuales fueron protegidas con jabones cálcicos, y almidón de yuca como fuente de energía para el crecimiento microbiano (Mould et al 2004). La técnica de encapsulación de AA con lípidos (grasas y aceites), a menudo están en combinación con materiales inorgánicos, estabilizantes y agentes suavizantes. Los aminoácidos evaluados fueron provistos por la empresa Nutraceutika- Nutrición funcional Ltda (carrera 42 # 53-183 Itagüí, Antioquia, Colombia). Sobre las muestras de aminoácidos fueron determinadas las concentraciones de materia seca a 65° C (MS) y proteína cruda (PC) por el método Kjeldahl (AOAC 2002) (Tabla 1).

Tabla 1. Materia seca y proteína cruda de las fuentes de nitrógeno evaluadas

Tratamiento [#]	Materia seca total, %	Proteína cruda, % de la MS
Lys	95.3	71.1
LysP	96.5	51.4
Met	99.0	53.5
MetP	98.0	36.5
Urea	99.7	287
Almidón	85.1	0.0

[#]Lys: Lisina sin protección, Met: Metionina sin protección, LysP: Lisina protegida, MetP: Metionina con protección

Los microorganismos ruminales para su crecimiento requieren nitrógeno y energía de forma simultánea. Como se observa en la Tabla 1, la fuente de energía para los microorganismos ruminales es el almidón, el cual no aporta nitrógeno al medio. La fuente de nitrógeno esta representada por las fuentes de AA que se evaluaron. En este contexto, la degradación del almidón esta condicionada a la disponibilidad del nitrógeno aportado por los AA.

Los tratamientos experimentales para evaluar la eficacia del proceso de protección de los aminoácidos fueron:

- Lys: Almidón + Lisina sin protección
- LysP: Almidón + Lisina protegida
- Met: Almidón + Metionina sin protección
- MetP: Almidón + Metionina protegida
- LysPMetP: Almidón + Lisina protegida y metionina protegida
- Urea: Almidón + Urea

En cada frasco de incubación se pesó 1 g de almidón de yuca y cantidades variables de cada una de las fuentes de AA y urea de tal manera que se garantizara un aporte de N total de 0.016 g como sugerido por Mould et al (2004) (Tabla 2). En el tratamiento LysPMetP el N fue aportado en una relación 3:1 Lys: Met como sugieren muchos autores que consideran que esta relación es adecuada para que se produzca una mayor producción de proteína láctea (Bach and Stern 2000, Bueno et al 2003, Rossi et al 2003, Wu et al 2012).

Tabla 2. Materia seca y proteína cruda incubada en cada uno de los tratamientos

Tratamiento#	Almidón, g	AA/urea, g	MS, g	PC, g	PC, % de MS
Met	1	0.19	1.19	0.1	8.4
MetP	1	0.27	1.27	0.1	7.9
Lys	1	0.14	1.14	0.1	8.8
LysP	1	0.19	1.19	0.1	8.4
LysPMetP	1	0.213	1.21	0.1	8.2
Urea	1	0.034	1.03	0.1	9.7

#Lys: Lisina sin protección, Met: Metionina sin protección, LysP: Lisina protegida, MetP: Metionina con protección; LysMetP: Mezcla de metionina y lisina protegida en una relación 3:1

Preparación del medio

Fue preparada una solución tampón de acuerdo con los procedimientos recomendados por McDougall (1948). Un día antes del inicio del experimento, la solución fue preparada con 9.80 g/L de NaHCO₃, 4.65 g/L de Na₂HPO₄ 2H₂O, 0.57 de KCl, 0.47 g/L de NaCl, 0.12 gr/L MgSO₄.7H₂O y 0.05 g/L de CaCl₂ .2H₂O. El medio fue agitado para permitir la mezcla completa de las soluciones y saturado con CO₂ por dos horas, posteriormente fue almacenado a 39° C .

Recolección de inóculo

El líquido ruminal fue colectado a las 6:00 am a partir de tres vacas Holstein fistuladas en el rumen. El líquido ruminal se retiró manualmente de los

diferentes estratos en el rumen y fue almacenado en recipientes térmicos previamente calentados con agua a 40 °C. Después de la colecta, el líquido ruminal fue llevado al laboratorio y filtrado a través de paños de algodón. La parte líquida obtenida en este proceso fue colocada en un elermeyer, continuamente saturada con CO₂ a una temperatura constante de 39 °C (Duque et al 2009).

Preparación de los frascos de incubación

La producción de gas fue determinada por la técnica *in vitro* semi-automática descrita por Mauricio et al (1999). Para seguir este protocolo de incubación, fueron utilizados frascos de vidrio con capacidad de 100 ml, en donde fue adicionado 1.0 g de almidón de yuca y 0.016 g de nitrógeno, siendo este aportado por las diferentes fuentes (aminoácidos con o sin protección o por la urea).

En cada frasco se adicionó 5 ml de líquido ruminal y 45 ml de la solución tampón. Los frascos fueron sellados con un tapón de caucho, agitados manualmente y transferidos a una estufa de ventilación forzada a 39 °C, siendo este primer momento, el tiempo cero de incubación.

Degradación in vitro de la MS

Para estudiar la cinética de degradación de la MS de los tratamientos, los frascos de vidrio fueron retirados del proceso de incubación en los horarios 2, 4, 8, 12, 24 y 30 horas. El residuo de la incubación fue centrifugado por 5 minutos a 2500 rpm, posteriormente el sobrenadante fue tomado para determinar el contenido de nitrógeno amoniacal y el residuo sólido fue dejado en el tubo falcón de peso conocido inicialmente. Los tubos falcón fueron secados a 65° C por 48 horas y pesados para determinar la desaparición de la MS.

Liberación de nitrógeno amoniacal

Para determinar la liberación del nitrógeno amoniacal, se tomó en un tubo 25 ml del líquido sobrenadante, y fue adicionado 5 ml de CaCl₂ al 25% y 2 g de MgO comercial. Posteriormente, se procedió a realizar la destilación y titulación de la muestra, obteniendo como resultado la cantidad de N.

Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la degradación de la MS y liberación de nitrógeno amoniacal a través del tiempo fue realizado un análisis de medidas repetidas en el tiempo con ayuda del procedimiento PROC MIXED y LSMEANS de SAS (2002).

Para estimar los parámetros de degradación fue utilizado el procedimiento NLIN de SAS (Rossi et al 2003). Los datos fueron ajustados al modelo propuesto por Ørskov y McDonald (1979):

$$D = a + b (1 - \exp^{-c \cdot t})$$
, donde:

D = degradabilidad ruminal de la fracción b en el tiempo t ,

a = fracción soluble que es completamente degradada en el rumen,

b = fracción potencialmente degradable en el rumen,

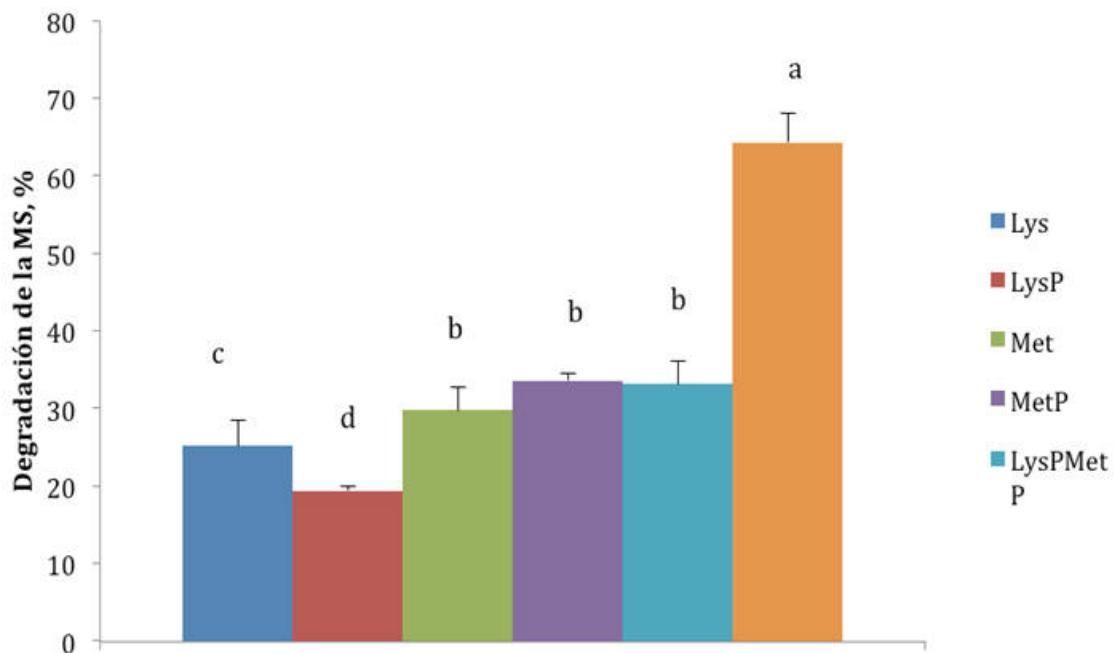
c = es la tasa constante de degradación de la fracción b

Para separar los medios fue utilizada la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Resultados

Degradación de la MS

El mayor porcentaje de degradación se registró en el tratamiento con urea (Figura 1). Esto indica que las fuentes de AA aportaron limitada cantidad de nitrógeno al medio, restringiendo la actividad microbiana reflejada en los bajos porcentajes de degradación de la MS.



La mayor degradación potencial se registró para el tratamiento con urea (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de degradación de la MS

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	Degradabilidad potencial
Lys	7.12 ^a	30.0 ^c	0.029 ^{bc}	37.1 ^c
LysP	7.44 ^a	27.7 ^c	0.024 ^c	35.1 ^c
Met	7.64 ^a	41.3 ^b	0.031 ^{abc}	49.0 ^b
MetP	7.69 ^a	43.7 ^b	0.036 ^{ab}	51.4 ^b
LysPMetP	7.16 ^a	48.3 ^b	0.024 ^c	55.5 ^b
Urea	0.16 ^b	86.7 ^a	0.041 ^a	86.8 ^a

^{abc} medios en una misma línea sin letras en común indican valores diferentes al $p < 0.05$.

a: fracción rápidamente degradable, *b*: fracción de lenta degradación, *a+b*: potencial de degradación,

c: tasa constante de degradación de la fracción *b*, fracción indigestible: $100-(a+b)$

Liberación de nitrógeno amoniacal

La liberación del nitrógeno amoniacal fue mucha mas alta con urea comparada con los AA sin o con protección (Figura 2). Esto concuerda con la mayor degradación de la MS a las 24 horas pos-incubación en este mismo tratamiento. Las fuentes de AA con y sin protección liberaron semejantes cantidades de nitrógeno amoniacal evidenciando que el método de protección no tuvo el efecto esperado y que el paso limitante por parte de los microorganismos para utilizar estas fuentes de nitrógeno fue la desaminación.

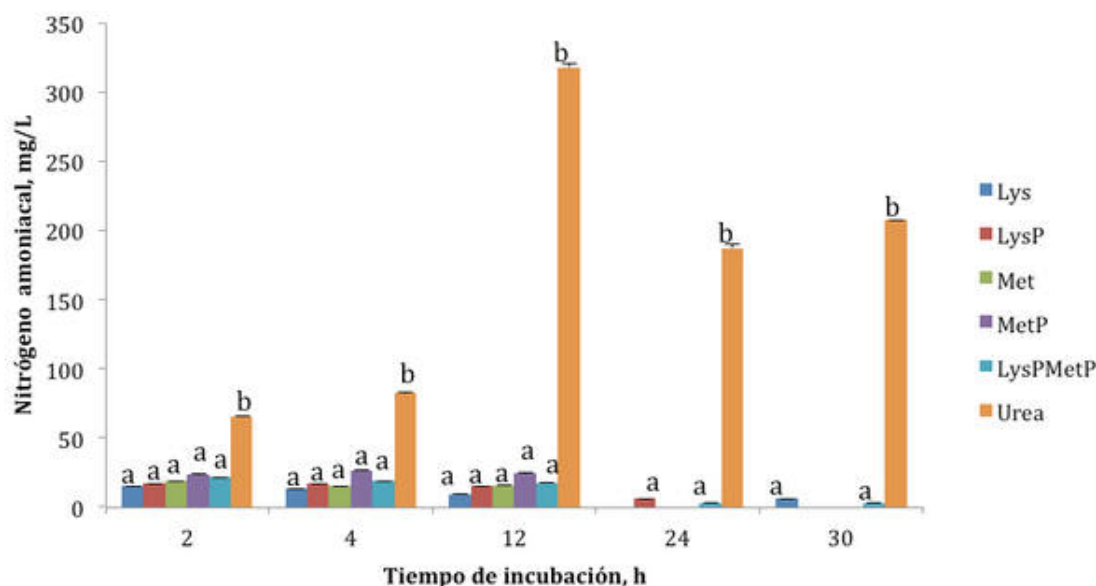


Figura 2. Efecto de AA con y sin protección sobre la liberación de N amoniacal *in vitro*. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencia significativa entre tratamientos en un mismo horario de incubación.

Discusión

Las fuentes de lisina y metionina protegidas (LysP y MetP) tuvieron una dinámica de degradación igual a la observada con sus homólogas sin protección (Lys y Met). Esto indica que aún sin protección los amino ácidos sintéticos lisina y metionina tiene baja degradabilidad por parte de los microorganismos ruminales.

El número de microorganismos en el rumen esta determinado por la tasa de digestión de los carbohidratos y la cantidad de proteína o nitrógeno disponible en el fluido ruminal. El amonio es el principal producto de la degradación de la proteína (sea esta suministrada como NNP o AA) y el mayor precursor de la proteína microbiana (Blümmel et al 1999, Broderick et al 2010). En el tratamiento de urea el crecimiento de los microorganismos no fue limitado por la disponibilidad de nitrógeno. En las Figuras 1 y 2 claramente se observa que la mayor degradación del almidón se corresponde con una mayor disponibilidad de nitrógeno amoniacal en el medio. Por tanto, las bajas degradaciones de la MS observadas en los restantes tratamientos son atribuidas al limitado aporte de nitrógeno por parte de las fuentes evaluadas.

Tradicionalmente se asume que los AA de la dieta son extensamente degradados en el rumen. Este hecho junto con los altos requerimientos de AA limitantes en animales de alta producción ha llevado a pensar que su protección de la degradación ruminal es necesaria para incrementar la cantidad de AA que llega al duodeno. Sin embargo, diferentes investigaciones muestran que importantes cantidades del requerimiento diario de AA puede ser cubierto dando AA sin protección. Velle et al (1997) evaluaron en vacas no lactantes la digestibilidad aparente de 18 AA, suministrados en cuatro dosis (75, 150, 300 y 600 mmol/día). En este experimento las tasas de degradación difirieron entre AA, indicando que las desaminasas microbianas tienen marcada especificidad por el tipo de AA. Para el caso de la metionina las desaminasas microbinas pueden ser inhibidas por la liberación de azufre.

Cottle y Velle (1989) evaluaron la degradación y el flujo de AA sin protección en el rumen de tres ovejas canuladas y encontraron que dosis de 15 g/día, permiten un flujo de 4.3 g de lisina y metionina, lo que representa aproximadamente el 30 y 70% de los requerimientos diarios de estos AA, respectivamente. Estos resultados sugieren que importantes proporciones del requerimiento de AA puede ser cubierto dando fuentes sin protección.

Volden et al (1998) evaluaron la degradación ruminal de dosis crecientes de lisina, metionina y treonina en seis vacas lactantes. Estos autores observaron una disminución lineal en la degradación ruminal y un incremento significativo en las cantidades de AA que escapan del rumen con el incremento en la dosificación. Los valores medios de escape ruminal para los AA treonina, metionina y lisina fueron 16.7, 22.1 y 20.5%, respectivamente. Considerando el alto precio de las fuentes protegidas de AA (cuatro a cinco

veces el de las fuentes no protegidas) y la baja tasa de degradación de la metionina, Mbanzamihiigo et al (1997) sugieren que las fuentes no protegidas sean incrementadas un 43% de la dosis recomendada de AA para obtener los mismos resultados de las fuentes protegidas.

Conclusiones

- En una fermentación ruminal *in vitro*, los aminoácidos sintéticos lysina y metionina tuvieron una muy baja degradabilidad por parte de los micro-organismos ruminales, similar a lo que se observó con los mismos aminoácidos supuestamente protegidos contra la degradación ruminal.

Agradecimientos

A la Universidad de Antioquia por la financiación, proyecto CODI 20113014 y sostenibilidad al grupo Biogénesis 2013-2014; y a Colciencias por la beca doctoral del primer autor de este artículo.

Bibliografía

AOAC 2002 Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA

Bach A, Stern M 2000 Measuring resistance to ruminal degradation and bioavailability of ruminally protected methionine. *Animal Feed Science and Technology* 84, 23-32 http://ac.els-cdn.com/S0377840100001139/1-s2.0-S0377840100001139-main.pdf?_tid=cda14ffa-a560-11e4-820b-00000aab0f26&acdnat=1422279771_f0e6197f44972e1e9eaa9d7b7991fc4a

Blümmel M, Aiple KP, Steingass H, Becker K 1999 A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation *in vitro* in feedstuffs of widely differing quality. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 81, 157-167 <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1046/j.1439-0396.1999.813205.x/asset/j.1439-0396.1999.813205.x.pdf?v=1&t=i5dwhvhl&s=f0e3f16bede2d4931913b13bd9d826b89561275b>

Broderick G, Huhtanen P, Ahvenjärvi S, Reynal S, Shingfield K 2010 Quantifying ruminal nitrogen metabolism using the omasal sampling technique in cattle- A meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 93, 3216-3230 [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(10\)00331-0/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(10)00331-0/pdf)

Bueno A, Martínez G, Bárcena J, Landois L, Sánchez-Torres M, García C, Oseguera J 2003 Degradabilidad ruminal *in situ* e *in vitro* de la metionina protegida. *Técnica Pecuaria en México* 41, 91-103 <http://revistas.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarías/article/view/1283/1278>

Cottle D J, Velle W 1989 Degradation and outflow of amino acids from the rumen of sheep, *British Journal of Nutrition* 61, 397-408. <http://rnd.edpsciences.org/articles/rnd/pdf/2002/07/R2601Froidmont.pdf>

- Chung Y H, Bateman H G, Williams C C, Stanley C C, Gantt D T, Braud T W, Southern L L, Ward J D, Hoyt P G, Sod G A 2006** Effects of methionine and lysine on fermentation *in vitro* and *in vivo*, nutrient flow to the intestine, and milk production. *Journal of Dairy Science* 89, 1613-1620 [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(06\)72228-7/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(06)72228-7/pdf)
- Doepel L, Pacheco D, Kennelly J, Hanigan M, López L, Lapierre H. 2004.** Milk protein synthesis as a function of amino acid supply. *J. Dairy Sci.* 87: 1279-1297 <http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302%2804%2973278-6/pdf>
- Duque M, Noguera R, Restrepo L 2009** Efecto de la adición de urea protegida y sin protección sobre la cinética de degradación *in vitro* del pasto estrella (*Cynodon nlemfluensis*) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). *Livestock Research for Rural Development* 21: article 58. <http://www.lrrd.org/lrrd21/4/duqu21058.htm>
- Křížová L, Třináctý J, Svobodová J, Richter M, Černý V, Jarošová A 2010** Effect of supplemental rumen-protected lysine, methionine or both added to diet of lactating dairy cows on milk fatty acids profile. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 58, 87-94 <http://acta.mendelu.cz/pdf/actaun201058010087.pdf>
- Kröber T F, Kreuzer M, Senn M, Langhans W, Sutter F 2000** Lactational and metabolic effects in cows of lysine and methionine added to a ration deficient according to the I.N.R.A. method. *Archiv für Tierernährung* 53 (4), 375-394
- Liu C, Schingoethe D J, Stegeman G A 2000** Corn distillers grains versus a blend of protein supplements with or without ruminally protected amino acids for lactating cows. *J Dairy Sci.* 83 (9), 2075-2084 [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(00\)75089-2/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(00)75089-2/pdf)
- Mauricio R, Mould F, Dhanoa M S, Owen E, Channa K S, Theodorou M K 1999** A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology* 79, 321-330 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840199000334>
- Mbanzamihigo L, Vandycke E, Demeyer D I 1997** Degradation of methionine by rumen contents *in vitro* and efficiency of its protection. *Animal Feed Science and Technology* 67, 339–347.
- McDougall E I 1948 Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemistry Journal* 70: 99-109 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1274641&blobtype=pdf>
- Mould F L, Kliem K, Morgan R 2004** Ruminal degradation of amino acids assessed using a complement *in vitro* technique. *ADSA St Louis, 25-29 July 2004 Journal of Dairy Science* 87 (supplement 1): 163
- NRC 2001** Nutrient requirement of dairy cattle, National Academy Press, Washington, DC.
- Ørskov E R y Mcdonald I 1979** The estimate of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science (Cambridge)* 92: 499-503.
- Ouellet D R, Lapierre H, Chiquette J 2003** Effects of corn silage processing and amino acid supplementation on the performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86 (11), 3675-3684 [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(03\)73973-3/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(03)73973-3/pdf)
- Patton R 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 [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(10\)00201-8/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(10)00201-8/pdf)

Robinson P 2010 Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livestock Science* 127, 115-126 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141309003345>

Robinson P, Fredeen A, Chalupa W, Julien W, Sato H, Fujieda T, Suzuki H 1995 Ruminally protected lysine and methionine for lactating dairy cows fed a diet designed to meet requirements for microbial and post-ruminal protein. *Journal of Dairy Science* 78, 582-594 [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(95\)76669-3/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(95)76669-3/pdf)

Rossi F, Maurizio M, Francesco M, Giovanna C, Gianfranco P 2003 Rumen degradation and intestinal digestibility of rumen protected amino acids: comparison between in situ and in vitro data. *Animal Feed Science and Technology* 108, 223-229 http://ac.els-cdn.com/S0377840103001317/1-s2.0-S0377840103001317-main.pdf?_tid=41936ae8-a565-11e4-9d7b-0000aacb360&acdnat=1422281683_3a48a7482dd92f0473903aad118bbf28

SAS 2002 Statistical analysis system. SAS/STAT User's Guide: release 9.0 SAS Institute Inc. Cary, N. C. USA.

Sevi A, Rotunno T, Di Caterina R, Muscio A 1998 Rumen-protected methionine or lysine supplementation of Comisana ewes' diets: effects on milk fatty acid composition. *Journal of Dairy Research* 65, 413-422.
http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FDAR%2FDAR65_03%2FS0022029998002945a.pdf&code=0d888638f953cebd559d97c60a9e146d

Socha M, Putnam D, Garthwaite B, Whitehouse N, Kierstead N, Schwab C, Ducharme G, Robert J 2005 Improving Intestinal Amino Acid Supply of Pre- and Postpartum Dairy Cows with Rumen-Protected Methionine and Lysine. *Journal of Dairy Science* 88, 1113-1126. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(05\)72778-8/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(05)72778-8/pdf)

Velle W, Sjaastad Ø V, Aulie A, Grønset D, Feigenwinter K and Framstad T 1997 Rumen escape and apparent degradation of amino acids after individual intraruminal administration to cows. *Journal of Dairy Science* 80:3325–3332.

Volden H., Velle W, Harstad O, Aulie A, Sjaastad O 1998 Apparent ruminal degradation and rumen escape of lysine, methionine and threonine administered intraruminally in mixtures to high yielding cows. *Journal of Animal Science* 76, 1232-1240. <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/pdfs/76/4/1232?search-result=1>

Wang C, Liu H, Wang Y, Yang Z, Liu J, Wu Y, Yan T, Ye H 2010 Effects of dietary supplementation of methionine and lysine on milk production and nitrogen utilization in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 3661–3670. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(10\)00386-3/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(10)00386-3/pdf)

Wu Z, Bernard J K, Eggleston R B, Jenkins T 2012 Ruminal escape and intestinal digestibility of ruminally protected lysine supplements differing in oleic acid and lysine concentrations. *Journal of Dairy Science* 95, 2680-2684. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(12\)00235-4/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(12)00235-4/pdf)

Xu S, Harrison J, Chalupa W, Sniffen C, Julien W, Sato H, Fujieda T, Watanabe K, Ueda T, Suzuki H 1998 The effect of ruminal bypass lysine and methionine on milk yield and composition of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 81, 1062-1077. [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(98\)75668-1/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(98)75668-1/pdf)