مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۴، شماره ۳، ۱۳۹۲ (۳۰۴-۲۹۳)

تعیین زیست فراهمی متیونین گیاهی بر اساس عملکرد رشد و پاسخ ایمنی جوجه‌های گوشتی

شیلا هادی‌نیا[1]، محمود شیوازاد[2] و حسین مروج[3]*
۱، ۲ و ۳، دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۸ - تاریخ تصویب: ۹۲/۴/۸)

چکیده

تعداد۱۶۰ قطعه جوجه نر(راس ۳۰۸) در سن ۴ روزگی در قالب طرح کاملاً تصادفی به ۸ تیمار و ۴ تکرار برای هر تیمار در قفس‌های آزمایشی تقسیم شدند. جیره‌های آزمایشی شامل: تیمار ۱: جیره پایه بدون متیونین افزودنی (شاهد)، تیمار ۲: جیره پایه + ۰/۰۶، تیمار ۳: جیره پایه + ۰/۱۱، تیمار ۴: جیره پایه + ۰/۱۷درصد متیونین سنتتیک، تیمار ۵: جیره پایه+ ۰/۰۶، تیمار ۶: جیره پایه + ۰/۱۱، تیمار ۷: جیره پایه + ۰/۱۷، تیمار ۸: جیره پایه +۰/۲۲درصد متیونین گیاهی بودند. در سنین ۲۸ و ۴۲ روزگی به منظور ارزیابی پاسخ سیستم ایمنی ازتست آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن گلبول قرمز گوسفند (SRBC) و تست ایمنی ۱-کلرو ۲و۳ دی نیترو بنزن (DNCB) استفاده شد. تابعیت چندگانه نمایی و چندگانه خطی برای تعیین کارایی زیستی متیونین گیاهی نسبت به متیونین سنتتیک بر پایه عملکرد رشد و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی به کار گرفته شد. نتایج آزمایش نشان داد افزایش وزن و خوراک مصرفی جوجه‌های گوشتی بدون در نظر گرفتن نوع منبع متیونین دریافتی نسبت به جیره پایه بهبود یافت. نتایج سیستم ایمنی در سن ۲۸ روزگی پاسخ معنی‌داری را نشان نداد (p>۰/۰۵) درحالیکه در سن ۴۲ روزگی، جوجه‌های گوشتی تحت تاثیر سطوح افزایشی منابع متیونین قرار گرفتند. زیست فراهمی متیونین گیاهی نسبت به متیونین سنتتیک طبق روش Weight to Weight (وزنی) و یا Product to Product(محصول) ۵۵٪ برای افزایش وزن، ۷۱٪ برای خوراک مصرفی، ۷۸٪ برای ضریب تبدیل غذایی، ۶۷٪ برای پاسخ سیستم ایمنی SRBC و۷۰٪ برای پاسخ سیستم ایمنی DNCB در سن ۴۲ روزگی می‌باشد. لذا با توجه به نتایج آزمایش به نظر می‌رسد امکان جایگزینی متیونین با منشاء گیاهی با متیونین سنتتیک (متیونین ساخته شده با فرآورده‌های نفتی) وجود داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: جوجه گوشتی، متیونین گیاهی، زیست فراهمی، تابعیت چندگانه

مقدمه

متیونین بعنوان اسیدآمینه محدود کننده در جیره طیور مطرح می‌شود. متیونین رایج مورد استفاده در صنعت طیور متیونین سنتتیک (DL-Met) و متیونین مایع (MHA-FA) می‌باشد.در آزمایشات مختلفی کارایی زیستی متیونین مایع نسبت به متیونین سنتتیک تعیین شده‌است (Thomaset al., 1991; Van Weerden et al., 1992; Esteve-Garcia & Austic 1993). برای تعیین کارایی زیستی یک ماده آزمایشی نسبت به ماده استاندارد دو روش مقایسه Equimolar (هم مول) و

* نویسنده مسئول: حسین مروج تلفن: ۰۲۶۱-۲۲۴۸۰۸۲ E-mail: hmoraveg@ut.ac.ir

Weight to Weight (وزنی) یا Product to Product (محصول) وجود دارد و نتایج به دست آمده با هر دو روش صحیح می‌باشند، اگرچه روش تابعیت انجام شده برای این دو روش یکسان می‌باشد، اما نتایج تابعیت این دو روش دقیقاً یکسان نیستند (Hoehler et al., 2005b). امروزه بیشترین منبع متیونینی که مورد استفاده قرار می‌گیرد متیونین سنتتیک می‌باشد. در زمینه استفاده از متیونین سنتتیک مشکلاتی وجود دارد از جمله اینکه متیونین سنتتیک از آکرولین، متیل مرکاپتان و هیدروژن سیانید که از پیش‌سازهای نفت هستند مشتق می‌شود لذا با تغییر قیمت پیش‌سازهایی مثل آکرولین و متیل مرکاپتان یا نفت قیمت این اسیدآمینه نیز در معرض تغییر قرار می‌گیرد (Figge et al., 2010). امروزه مصرف کنندگان گوشت طیور تمایل به مصرف محصولات با منشا گیاهی دارند. لذا به نظر می‌رسد پیدا کردن یک منبع جایگزین برای متیونین ضروری می‌باشد. در این بین منبع جدید و گیاهی از متیونین در صنعت خوراک طیور مطرح شده‌است که لازم است کارایی زیستی این منبع گیاهی جدید با متیونین سنتتیک مقایسه شود. منبع گیاهی متیونین از ۴ نوع گیاه تشکیل شده‌است. گیاهان تشکیل دهنده آن به نام‌های *andrographis paniculata ,asparagus racemosus, zea mays, ocimum sanctum,* می‌باشند. لذا هدف این آزمایش تخمین کارایی زیستی متیونین گیاهی نسبت به متیونین سنتتیک بر پایه محصول و با در نظر گرفتن عملکرد رشد و سیستم ایمنی هومورال (SRBC) و سلولی (DNCB) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش تعداد ۱۶۰ قطعه جوجه نر چهار روزه سویه راس ۳۰۸ به ۸ تیمار و ۴ تکرار برای هر تیمار و ۵ جوجه در هر تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی در واحدهای آزمایشی (قفس) توزیع شدند. جوجه‌های گوشتی با جیره‌های آزمایشی بر پایه ذرت و کنجاله سویا (جدول ۱) و سطوح افزایش تدریجی از هریک از دو منبع متیونین گیاهی (با خلوص متیونین: ۱۲/۶ و متیونین+ سیستئین: ۱۶/۹٪) و متیونین سنتتیک (۹۸٪ خلوص) (جدول۲) مطابق مواد مغذی مورد نیاز توصیه شده توسط کتابچه راهنمای پرورشی سویه راس ۳۰۸ تغذیه شدند. متیونین گیاهی استفاده شده در این آزمایش تولید شرکت Arosol- کشور هند[1] می‌باشد. گیاهان تشکیل دهنده آن به نام‌های *andrographis paniculata ,asparagus racemosus, zea mays, ocimum sanctum,* (ذرت) می‌باشند. آنالیز شیمیایی مربوط به متیونین گیاهی طبق روش AOAC (2003)۹۸۲/۳۰ انجام شد. در طول ۴ روز اول دمای سالن ۳۴°C بود سپس به تدریج با افزایش سن کاهش یافت، تا اینکه به ۲۲°C رسید. برنامه نوردهی در سه روز اول دائم و بعد از آن تا ۲۳ ساعت در شبانه روز تثبیت گردید. در مدت آزمایش آب و غذا به صورت آزاد در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت. واکسیناسیون پرندگان طبق برنامه واکسیناسیون اداره دامپزشکی منطقه صورت گرفت. وزن و خوراک مصرفی جوجه‌های گوشتی در انتهای دوره اندازه‌گیری شد و افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی محاسبه شد.

تیتر آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن گلبول قرمز گوسفند (SRBC)

برای تهیه سوسپانسیون تزریقی SRBC، خونگیری از سیاهرگ گردنی گوسفند با استفاده از سرنگ‌های حاویEDTA ضد انعقاد انجام گردید.گلبول‌های قرمز گوسفند سه بار توسط بافر سالین فسفات (Phosphate) Buffered Salin شستشو داده شدند و سپس سوسپانسیون ۱٪ SRBC آماده گردید (Baradaran & Munns & Lamont, 1991; Farid Hosseini, 1992). در این آزمایش از اریتروسیت‌های گوسفند به عنوان آنتی‌ژن تحریک کننده سیستم ایمنی هومورال استفاده گردید. برای ارزیابی پاسخ ایمنی جوجه‌های مورد آزمایش، گلبول‌های قرمز گوسفندی SRBC را به به میزان ۰/۲ سی‌سی در سن ۲۱ و ۳۵ روزگی به دو پرنده از هر تکرار از طریق عضله سینه تزریق و هفت روز بعد از همین پرندگان از طریق ورید بال خونگیری به عمل آمد و ۱۶ ساعت پس از انعقاد خون، سرم نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جداسازی گردید. سپس اندازه‌گیری تیتر آنتی SRBC تام، آنتی‌بادی مقاوم به ۲- مرکاپتو اتانول (IgG) و آنتی‌بادی حساس به

1. Methorganic (Herbal Methionine)

۲-مرکاپتو اتانول (IgM) انجام شد (Vander, 1980). داده‌ها بر اساس Log 2 گزارش شدند.

جدول ۱- مشخصات جیره آزمایشی استفاده شده طی سه دوره پرورش

اجزای جیره (٪)	جیره آغازین	جیره رشد	جیره پایانی
ذرت	۴۹/۸۶	۶۲/۳۰	۶۸/۵۰
کنجاله سویا (۴۴٪)	۳۱/۵۱	۲۲/۰۸	۱۶/۵۳
کنجاله کانولا	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰	۱۰/۰۰
روغن گیاهی	۳/۷۱	۱/۳۷	۰/۹۹
دی کلسیم فسفات	۱/۹۴	۱/۶۲	۱/۴۹
پودر صدف	۱/۵۲	۱/۲۳	۱/۲۰
نمک	۰/۴۳	۰/۴۲	۰/۳۷
مکمل ویتامینی[1]	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۰
مکمل معدنی[2]	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۳۰
لایزین کلراید	۰/۲۹	۰/۲۷	۰/۲۴
ترئونین	۰/۱۴	۰/۱۱	۰/۰۸
ترکیبات مواد مغذی شده:			
انرژی متابولیسمی(کیلوکالری بر کیلوگرم)	۲۹۵۰	۲۹۵۰	۳۰۰۰
پروتئین خام٪	۲۰/۹۴	۱۷/۹۵	۱۶/۰۸
کلسیم٪	۱/۰۲	۰/۸۴	۰/۸۰
فسفر قابل استفاده٪	۰/۴۹	۰/۴۲	۰/۳۹
سدیم٪	۰/۱۹	۰/۱۸	۰/۱۶
متیونین٪	۰/۳۱	۰/۲۸	۰/۲۶
میتونین+سیستئین٪	۰/۷۷	۰/۶۸	۰/۶۱
لیزین٪	۱/۲۴	۱/۰۳	۰/۸۸
ترئونین٪	۰/۸۱	۰/۶۸	۰/۶۱

۱. مقدار ویتامین‌ها در هر کیلوگرم جیره: ویتامین A: ۹۰۰۰ واحد بین المللی، کوله کلسیفرول: ۲۰۰۰ واحد بین المللی، ویتامین E: ۱۸ واحد بین‌المللی، منادیون ۲ میلی‌گرم، تیامین: ۱/۸ میلی‌گرم، ریبوفلاوین: ۶/۶ میلی‌گرم،نیاسین: ۳۰ میلی‌گرم، پانتوتنیک اسید: ۲۵ میلی‌گرم، پیریدوکسین: ۲/۹ میلی‌گرم، فولاسین: ۱ میلی‌گرم، ویتامین B12: ۰/۰۱۵ میلی‌گرم،کولین: ۵۰۰ میلی‌گرم و آنتی اکسیدان: ۱ میلی‌گرم.

۲. مکمل‌معدنی در هر کیلوگرم جیره: مس (سولفات مس): ۱۰ میلی‌گرم، ید (یدات کلسیم): ۰/۹۹ میلی گرم، آهن: (سولفات آهن): ۵۰ میلی‌گرم، منگنز (اکسید منگنز): ۹۹ میلی‌گرم، سلنیوم (سدیم سلنیت): ۰/۲ میلی‌گرم و روی (اکسید روی): ۸۴ میلی گرم.

جدول۲- تیمارهای آزمایشی بر اساس مقادیر مازاد متیونین سنتتیک (DL-Met) و متیونین گیاهی (H-Met) نسبت به تیمار شاهد (جیره پایه).

تیمار	منبع متیونین*	سطوح اضافه شده (درصد)			مقادیر کمبود (-) و ازدیاد (+) منابع متیونین***		
		آغازین	رشد	پایانی	کل دوره**	آغازین	رشد	پایانی
۱	جیره پایه	۰/۳۱	۰/۲۸	۰/۲۶	-	-۰/۱۵	-۰/۱۱	-۰/۱۰
۲	DL-Met	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۵	۰/۰۶	-۰/۰۸	-۰/۰۵	-۰/۰۵
۳	DL-Met	۰/۱۵	۰/۱۱	۰/۱۰	۰/۱۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۴	DL-Met	۰/۲۲	۰/۱۷	۰/۱۴	۰/۱۷	+۰/۰۷	+۰/۰۶	+۰/۰۴
۵	H-Met	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۵	۰/۰۶	-۰/۰۸	-۰/۰۵	-۰/۰۵
۶	H-Met	۰/۱۵	۰/۱۱	۰/۱۰	۰/۱۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۷	H-Met	۰/۲۲	۰/۱۷	۰/۱۴	۰/۱۷	+۰/۰۷	+۰/۰۶	+۰/۰۴
۸	H-Met	۰/۲۹	۰/۲۳	۰/۱۹	۰/۲۲	+۰/۱۴	+۰/۱۲	+۰/۰۹

* DL-Met= متیونین سنتتیک، H-Met= متیونین گیاهی

** میانگین سطوح افزودنی منابع متیونین در دوره‌های آغازین، رشد و پایانی با در نظر گرفتن روزهای آزمایشی هر دوره.

*** متیونین مورد نیاز بر اساس کاتالوگ راس ۰/۴۶، ۰/۳۹ و ۰/۳۶درصد به ترتیب برای دوره‌های آغازین، رشد و پایانی می‌باشد.

پاسخ سیستم ایمنی به محلول ۱-کلرو ۲-۳-دی نیترو بنزن (DNCB)

به‌منظور انجام این آزمایش در سنین ۲۸ و ۴۲ روزگی یک پرنده از هر تکرار انتخاب شد و ۰/۲۵ سی سی محلول DNCB (۱۰ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر) در ناحیه راست بدن (محل اتصال ران و سینه) تزریق شد و در ناحیه چپ، محلول فاقد DNCB به عنوان شاهد تزریق شد. به منظور بررسی میزان واکنش ضخامت پوست با استفاده از کولیس دیجیتالی ضخامت پوست قبل‌از تزریق، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق اندازه‌گیری شد. میانگین افزایش ضخامت پوست در هر پرنده از اختلاف ضخامت قبل و بعد از تزریق بدست آمد (پاسخ التهابی). (Tiwary & Goel, 1985; Shivachandra et al., 2003).

محاسبه زیست فراهمی و آنالیز آماری

Hoehler et al. (2005a) اثبات کردند که تابعیت نمایی روشی مناسب برای تخمین زیست فراهمی منابع متیونین می‌باشد. لذا داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SAS (1990) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه و چهار سطح متیونین سنتتیک و گیاهی به ترتیب، چهار تکرار و پنج جوجه در هر تکرار با مدل چندگانه نمایی و چندگانه خطی بر اساس روش Weight to Weight (وزنی) یا Product to Product (محصول) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد و معنی‌داری آماری در$p<۰/۰۵$ بررسی شد. افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی بوسیله تابعیت چندگانه نمایی که توسط Littellet al. (1997) پیشنهاد شده‌است طبق این معادله و با استفاده از Proc nonlinear آنالیز شدند:

$$y= a+ b \times (1- e^{c_1 \times x_1 + c_2 \times x_2})$$

y= معیار عملکرد، a= عرض از مبداء (عملکرد پرنده با جیره پایه)،b= پاسخ مجانب،a+b= مجانب (حداکثر سطح عملکرد)، c_1= ضریب شیب برای متیونین سنتتیک، c_2= ضریب شیب برای متیونین گیاهی، x_1 و x_2سطوح متیونین سنتتیک و گیاهی به ترتیب می‌باشند.

طبق پیشنهاد Littellet al. (1997) مقدارکارایی زیستی متیونین گیاهی نسبت به متیونین سنتتیک با تقسیم ضریب شیب متیونین گیاهی به ضریب شیب متیونین سنتتیک بدست می‌آید (c_2/c_1). خوراک مصرفی، پاسخ ایمنی SRBC و DNCB بوسیله رگرسیون چندگانه خطی که توسط Littellet al. (1997) پیشنهاد شده‌است و با استفاده از Proc Glm طبق معادله زیر انجام شد:

$$Y= b_0+b_1x_1+b_2x_2$$

y= معیار عملکرد، b_0= عرض از مبداء (عملکرد پرنده با جیره پایه)، b_1=شیب خط متیونین سنتتیک، b_2= شیب خط متیونین گیاهی، x_1 و x_2 سطوح متیونین سنتتیک و گیاهی به ترتیب می‌باشند.

طبق پیشنهاد Littellet al. (1997) مقدار کارایی زیستی متیونین گیاهی نسبت به متیونین سنتتیک با تقسیم شیب خط متیونین گیاهی به شیب خط متیونین سنتتیک بدست می‌آید (b_2/b_1).

نتایج و بحث

عملکرد رشد

با توجه به عدم وجود تلفات در طول دوره آزمایش مقایسه‌ای در این خصوص صورت نگرفت. نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که افزایش وزن جوجه‌های تغذیه شده با تیمارهای حاوی منابع متیونین نسبت به جوجه‌هایی که از جیره پایه (تیمار شاهد) تغذیه کرده بودند به طور معنی‌داری بهبود یافت ($p<۰/۰۵$). با درنظر گرفتن خوراک مصرفی کل دوره، بیشترین خوراک مصرفی با سطح ۰/۱۷٪ متیونین سنتتیک و سطح ۰/۲۲٪ متیونین گیاهی مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) و کمترین خوراک مصرفی متعلق به پرندگان تغذیه شده با جیره پایه و سطح ۰/۰۶ ٪ متیونین گیاهی بود. خوراک مصرفی فاکتور مهمی است که سنتز پروتئین‌های بدن را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Kita et al., 1996a,b). کمبود متیونین منجر به کاهش خوراک مصرفی جوجه‌های گوشتی به علت عدم تعادل اسیدهای آمینه می‌شود (Bunchasak & Keawarun, 2006). از آنجایی که وظیفه اصلی متیونین شرکت در ساخت پروتئین می‌باشد، در سطوح پایین متیونین، این اسیدآمینه به منظور تولید سیستئین بکار می‌رود لذا وظیفه اصلی آن دچار اختلال می‌شود. نتایج این آزمایش با نتایج حاصل از تحقیقات Bunchasak et al. (2006) هماهنگ است. این محققین نشان دادند مکمل سازی جیره با متیونین منجر به بهبود رشد و افزایش خوراک مصرفی می‌شود.

با در نظر گرفتن افزایش وزن کل دوره، بیشترین افزایش وزن با سطح ۰/۱۱ ٪ متیونین سنتتیک و ۰/۱۷ ٪ متیونین گیاهی حاصل شد که این سطوح با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p>۰/۰۵$) و کمترین افزایش وزن متعلق به تیمار شاهد و تیمار پنج (حاوی سطح ۰/۰۶ ٪ متیونین گیاهی) بود که این دو تیمار با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p>۰/۰۵$) (جدول ۳). همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که مصرف متیونین سنتتیک مازاد نیز منجر به کاهش وزن جوجه‌های گوشتی می‌شود. کمبود متیونین منجر به کاهش خوراک مصرفی

جوجه‌های گوشتی و در نتیجه کاهش وزن آنها به علت عدم تعادل اسیدهای آمینه می‌شود (Bunchasak & Keawarun, 2006). برخی تحقیقات نشان می‌دهد متابولیسم متیونین از مسیر دیگری غیر از مسیر تولید S-آدنوزیل متیونین موجب تبدیل متیونین به فرم کتو آنالوگ آن و سپس دکربوکسیله شدن آن به ۳-متیل-تیو پروپیونات می‌شود که این محصول منجر به کاهش وزن می‌شود (Miester, 1965; Benevenga, 1974). با در نظر گرفتن ضریب تبدیل غذایی کل دوره، بهترین ضریب تبدیل غذایی با توجه به افزایش وزن بدست آمده با افزودن سطح ۰/۱۱٪ متیونین سنتتیک و سطح ۰/۱۷٪ متیونین گیاهی حاصل شد. تغییرات ضریب تبدیل غذایی تحت تاثیر دو عامل موثر در آن، خوراک مصرفی و افزایش وزن می‌باشد. نتایج حاصل از ضریب تبدیل غذایی در این آزمایش با نتایج حاصله از تحقیقات Chattopadhyay et al. (2006) در تضاد است. این محققین گزارش نمودند تفاوت معنی‌داری بین سطوح مشابه متیونین سنتتیک و گیاهی وجود ندارد.

جدول ۳- عملکرد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف متیونین سنتتیک و متیونین گیاهی در دوره آزمایشی (۴-۴۲ روزگی)

تیمار	منبع متیونین	سطوح اضافه شده (٪)	BWG[1]	FI[2]	FCR[3]
۱	جیره پایه	-	۲۱۳۲/۶۷^{d}	۳۷۲۰/۱۱^{d}	۱/۷۴^{b}
۲	سنتتیک	۰/۰۶	۲۳۵۶/۹۳^{c}	۴۱۳۱/۸۸^{c}	۱/۷۵^{b}
۳	سنتتیک	۰/۱۱	۲۴۹۰/۷۵^{a}	۴۳۹۴/۷۶^{b}	۱/۷۶^{b}
۴	سنتتیک	۰/۱۷	۲۴۶۵/۶۲^{b}	۴۶۴۳/۴۸^{a}	۱/۸۸^{a}
۵	گیاهی	۰/۰۶	۲۲۴۵/۴۹^{d}	۳۷۳۶/۹۱^{d}	۱/۶۶^{c}
۶	گیاهی	۰/۱۱	۲۳۵۲/۴۷^{c}	۴۱۴۶/۵۴^{c}	۱/۷۶^{b}
۷	گیاهی	۰/۱۷	۲۴۷۶/۴۵^{ab}	۴۴۰۷/۲۵^{b}	۱/۷۸^{b}
۸	گیاهی	۰/۲۲	۲۴۶۳/۸۷^{b}	۴۶۸۶/۳۱^{a}	۱/۹۰^{a}
P Value			<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
SEM			۸/۱۷	۲۲/۸۶	۰/۰۱

۱. افزایش وزن (گرم).Body Weight Gain (BWG)

۲. میانگین خوراک مصرفی (گرم). Feed Intake (FI)

۳. ضریب تبدیل غذایی (گرم خوراک مصرفی به گرم افزایش وزن روزانه. Feed Conversion Ratio (FCR)

a-dوجود حروف غیر مشابه در اعداد هر ستون نمایانگر وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

پاسخ سیستم ایمنی

همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده‌است نتایج این آزمایش در ۲۸ روزگی نشان داد که پاسخ سیستم ایمنی به روش SRBC تحت تاثیر سطوح مختلف متیونین سنتتیک و گیاهی قرار نگرفت (p>۰/۰۵). این نتایج با نتایج حاصله از تحقیقات Swain & Johri (2000) که گزارش کردند متیونین اضافی و کمبود متیونین در جیره‌ها تولید اولیه آنتی‌بادی‌ها در جوجه‌های گوشتی را تحت تاثیر قرار نمی‌دهند هماهنگ است. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود نتایج این آزمایش در سن ۴۲ روزگی نشان داد که در پاسخ ثانویه به تست ایمنی به روشSRBC (IgG+IgM)، ایمنوگلوبین‌های G وM تحت تاثیر سطوح مختلف متیونین سنتتیک و گیاهی قرار گرفتند (p<۰/۰۵). بیشترین میزان IgM و IgG مربوط به سطح ۰/۱۱٪ متیونین سنتتیک و سطح ۰/۱۷٪ متیونین گیاهی می‌باشد و این سطوح اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. کمترین میزان IgM و IgG مربوط به تیمار یک که حاوی جیره پایه می‌باشد و سطح ۰/۰۶٪ متیونین گیاهی می‌باشد و این سطوح اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. نتایج این آزمایش با نتایج آزمایشات Tsiagbe et al., (1987) مطابقت دارد آنها گزارش کردند مکمل‌سازی جیره با متیونین موجب افزایش پاسخ آنتی‌بادی‌های ثانویه به SRBC می‌شود که با مجموع سطوح IgM و IgG قابل اندازه‌گیری می‌باشد. همان‌طور که در جدول ۶ نشان داده شده‌است نتایج آزمایش در ۲۸ روزگی نشان می‌دهد که پاسخ اولیه به تست ایمنی DNCB تحت تاثیر سطوح مختلف متیونین سنتتیک و گیاهی قرار نگرفت (p>۰/۰۵). در حالیکه همان‌طور که در جدول ۷ نشان داده شده‌است نتایج این آزمایش در ۴۲ روزگی نشان داد که پاسخ ثانویه به تست ایمنی DNCB تحت تاثیر سطوح مختلف متیونین سنتتیک و گیاهی قرار

گرفت (p<۰/۰۵). بیشترین پاسخ به DNCB، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق، با سطوح۰/۱۱، ۰/۱۷٪ متیونین سنتتیک و ۰/۱۷ و ۰/۲۲٪ متیونین گیاهی حاصل شد که این سطوح با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند (p>۰/۰۵).

جدول ۴- اثر سطوح مختلف متیونین سنتتیک و متیونین گیاهی بر تیتر هماگلوتیناسیون علیه آنتی‌ژن گلبول قرمز گوسفند (SRBC) در سن ۲۸ روزگی

تیمار	منابع متیونین	سطوح اضافه شده (٪)	تیتر هماگلوتیناسیون (Log2) IgM	IgG
۱	-	-	۲/۴۶	۱/۸۵
۲	سنتتیک	۰/۰۵	۲/۵۴	۱/۸۷
۳	سنتتیک	۰/۱۰	۲/۵۴	۱/۹۸
۴	سنتتیک	۰/۱۴	۲/۴۷	۱/۹۴
۵	گیاهی	۰/۰۵	۲/۴۸	۱/۸۶
۶	گیاهی	۰/۱۰	۲/۵۱	۱/۹۰
۷	گیاهی	۰/۱۴	۲/۵۵	۱/۹۷
۸	گیاهی	۰/۱۹	۲/۵۴	۱/۹۱
P Value			۰/۴۴	۰/۲۵
SEM	-		۰/۱۰	۰/۱۱

جدول ۵- اثر سطوح مختلف متیونین سنتتیک و متیونین گیاهی بر تیتر هماگلوتیناسیون علیه آنتی‌ژن گلبول قرمز گوسفند (SRBC) در سن ۴۲ روزگی

تیمار	منابع متیونین	سطوح اضافه شده (٪)	تیتر هماگلوتیناسیون (Log 2) IgM	IgG
۱	-	-	۲/۳۴^{d}	۳/۹۴^{e}
۲	سنتتیک	۰/۰۵	۲/۴۳^{c}	۴/۰۳^{d}
۳	سنتتیک	۰/۱۰	۲/۵۴^{a}	۴/۱۵^{a}
۴	سنتتیک	۰/۱۴	۲/۵۳^{ab}	۴/۱۳^{bc}
۵	گیاهی	۰/۰۵	۲/۳۴^{d}	۳/۹۴^{e}
۶	گیاهی	۰/۱۰	۲/۴۳^{c}	۴/۰۲^{d}
۷	گیاهی	۰/۱۴	۲/۵۴^{a}	۴/۱۴^{ab}
۸	گیاهی	۰/۱۹	۲/۵۲^{b}	۴/۱۲^{c}
P Value			<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
SEM	-		۰/۰۰۳	۰/۰۰۴

$^{a-e}$وجود حروف غیر مشابه در اعداد هر ستون نمایانگر وجود اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

DNCB موجب افزایش حساسیت پوست می‌شود و به‌عنوان میانجی‌گر سلولی درنظر گرفته می‌شود. مکانیسم عمل DNCB بدین صورت است که با پروتئین‌های پوستی مختلف می‌تواند کمپلکس و پیوندهای کووالانسی تشکیل دهد و به عنوان فاکتور ایمنی فعالیت کند(Zhang et al., 2009). DNCB باعث تغییر ماکرومولکول‌ها می‌شود و موجب فعالیت سلول‌های آنتی‌ژنی موجود در محل مثل سلول‌های لانگرهانس پوستی، سلول‌های دندریتی پوستی و ماکروفاژها و فعال‌سازی سلول‌های Tمی‌شود (Watanabe et al., 2002). تقریباً ۲۴ ساعت بعد از تزریق DNCB ماکروفاژها در محل تزریق انباشته می‌شوند که در ایجاد تورم شرکت می‌نمایند (Tuckermann et al., 2007).

هموسیستئین، گلوتاتیون و تائورین از محصولات نهایی متابولیسم اسیدآمینه‌های گوگرددار هستند (Grimble, 2006). مشخص شده متیونین علاوه بر ساخت پروتئین بعنوان پیش‌ساز گلوتاتیون نیز بکار می‌رود که تری‌پپتیدی است که در کاهش اکسیژن فعال نقش ایفا می‌کند و بدین صورت از سلول‌ها در مقابل اکسیداسیون محافظت می‌کندکه نقش آن در کاهش اکسیژن فعال می‌تواند در بهبود ایمنی موثر باشد (Kalbande et al., 2009). تائورین فراوان‌ترین ترکیب نیتروژنی آزاد در سلول‌ها می‌باشد، همچنین بعنوان ثابت

نگهدارنده غشا و تنظیم‌کننده جریان کلسیم می‌باشد و بدین وسیله ثبات سلول‌ها را کنترل می‌کند (Grimble, 2006). همچنین نشان داده شده‌است که تائورین دارای خاصیت‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم‌کننده آزادسازی سیتوکینازهای پیش‌تورمی در همسترها، خرگوش‌ها و انسان‌ها می‌باشد (Kontny et al., 2000).گزارش شده‌است که تائورین از کاهش تعداد سلول‌های T هنگام مواجه شدن با پیری ممانعت می‌کند و موجب بهبود پاسخ‌های تکثیری سلول‌های T در موش‌های جوان و مسن می‌شود (Grimble, 1996).

جدول ۶- اثر سطوح مختلف متیونین سنتتیک و متیونین گیاهی بر ایمنی سلولی بررسی شده بوسیله حساسیت پوستی به DNCB در سن ۲۸ روزگی

تیمار	منابع متیونین	سطوح اضافه شده (٪)	افزایش ضخامت پوست بهDNCB (٪)	
			۲۴ ساعت[1]	۴۸ ساعت
۱	-	-	۰/۸۳	۰/۰۸
۲	سنتتیک	۰/۰۵	۰/۸۳	۰/۰۸
۳	سنتتیک	۰/۱۰	۰/۸۴	۰/۰۹
۴	سنتتیک	۰/۱۴	۰/۸۴	۰/۰۸
۵	گیاهی	۰/۰۵	۰/۸۳	۰/۰۸
۶	گیاهی	۰/۱۰	۰/۸۳	۰/۰۸
۷	گیاهی	۰/۱۴	۰/۸۴	۰/۰۹
۸	گیاهی	۰/۱۹	۰/۸۴	۰/۰۹
P Value			۰/۴۶	۰/۷۶
SEM	-		۰/۰۰۵	۰/۰۰۴

[1] ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق

Chiou et al., (2000) گزارش نمودند که گیاه موجود در متیونین گیاهی به نام *Andrographolide* از *paniculata andrographis* مشتق می‌شود که دارای خواص دارویی است ومانع از فعالیت لیپوپلی‌ساکاریدهایی می‌شود که منجر به تولید نیتریک اکساید (NO) در سلول‌های ماکروفاژ می‌گردد. *Andrographolide* با سرکوب تولید سیگنال‌های خارج سلولی مرتبط با پروتئین کینازهای ۱ و ۲، تولید بیش از حد عامل نکروز کننده تومور- آلفا (TNF-α) و اینترلوکین ۱۲ (IL-12) را سرکوب می‌کند (Qin et al., 2006).

جدول ۷- اثر سطوح مختلف متیونین سنتتیک و متیونین گیاهیبر ایمنی سلولی بررسی شده بوسیله حساسیت پوستی به DNCB در سن ۴۲ روزگی

تیمار	منابع متیونین	سطوح اضافه شده (٪)	افزایش ضخامت پوست بهDNCB (٪)	
			۲۴ ساعت[1]	۴۸ ساعت
۱	-	-	۰/۹۸[b]	۰/۱۶[b]
۲	سنتتیک	۰/۰۵	۰/۹۹[b]	۰/۱۷[b]
۳	سنتتیک	۰/۱۰	۱/۲۳[a]	۰/۲۸[a]
۴	سنتتیک	۰/۱۴	۱/۲۳[a]	۰/۲۷[a]
۵	گیاهی	۰/۰۵	۰/۹۹[b]	۰/۱۶[b]
۶	گیاهی	۰/۱۰	۰/۹۹[b]	۰/۱۷[b]
۷	گیاهی	۰/۱۴	۱/۲۳[a]	۰/۲۸[a]
۸	گیاهی	۰/۱۹	۱/۲۳[a]	۰/۲۷[a]
P Value			<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
SEM	-		۰/۰۰۳	۰/۰۰۳

[1] ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق

عامل نکروز کننده تومور- آلفا و اینترلوکین ۱۲ دوتا از میانجی‌گرهای عمده ایجاد تورم هستند که بوسیله ماکروفاژها ترشح می‌شوند. عامل نکروز کننده تومور- آلفا باعث ترشح سیتوکینازها مثل اینترلوکین ۱، اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۱۰ و فعال سازی سلول‌های T می‌شود (Locksley et al., 2001).

از طرفی اینترلوکین ۱۲باعث فعال‌سازی سلول‌های تورمی مثل سلول‌های T و سلول‌های کشنده طبیعی می‌شود (Trinchieri, 2003). افزایش بیش از اندازه عامل نکروز کننده تومور- آلفاو اینترلوکین ۱۲ با گسترش بعضی از بیماری‌ها مرتبط است (Locksley et al., 2001). همچنین تولید بیش از اندازه عامل نکروز

کننده تومور- آلفا موجب آسیب‌های بافتی می‌شود (Pasparakis et al., 1996). لـذا به‌نظر می‌رسـد کـه متیونین گیاهی باداشتن گیاه *paniculata andrographis* می‌تواند در بهبود سیستم ایمنی نقش داشته باشد.

کارایی زیستی متیونین گیاهی نسبت به متیونین سنتتیک

طبق نتایج تجزیه تابعیت، جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با متیونین سنتتیک عملکرد بهتری نسبت به جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با متیونین گیاهی داشتند. زیست فراهمی متیونین گیاهی نسبت به متیونین سنتتیک بر اساس روش Weight to Weight (وزنی) یا Product to Product (محصول) در کل دوره پرورشی با در نظر گرفتن افزایش وزن، خوراک مصرفی و ضریب تبدیل غذایی به ترتیب ۵۵٪، ۷۱٪ و ۷۸٪ (شکل ۱) و برای پاسخ‌های ایمنی SRBC و DNCB به ترتیب ۶۷ و ۷۰٪ می‌باشد (شکل ۲ و ۳).

به طور میانگین زیست فراهمی متیونین گیاهی با در نظر گرفتن عملکرد رشد کل دوره و پاسخ‌های ایمنی به ترتیب ۶۷ و ۶۹ ٪ می‌باشد (جدول ۸).

جدول ۸- کارایی زیستی متیونین گیاهی نسبت به متیونین سنتتیک بر اساس عملکرد رشد و پاسخ‌های ایمنی

	عملکرد رشد (۴-۴۲ روزگی)			پاسخ‌های ایمنی			
	BWG[1]	FI[2]	FCR[3]	SRBC[4]		DNCB[5]	
				ایمنوگلوبولین G	ایمنوگلوبولین M	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
کارایی	۵۵	۷۱	۷۸	۶۷	۶۷	۶۹	۷۰
کارایی موثر	۵۵		۷۸	۶۷		۷۰	
میانگین		۶۷			۶۹		
میانگین کلی				۶۸			

۱. افزایش وزن (گرم).Body Weight Gain (BWG)

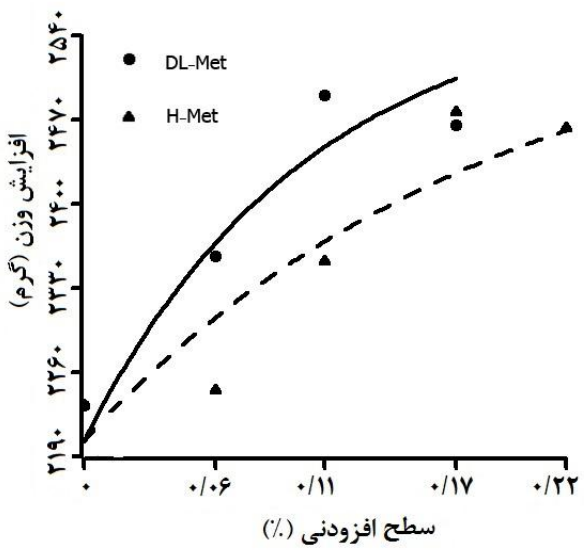
۲. میانگین خوراک مصرفی (گرم).Feed Intake (FI)

۳. ضریب تبدیل غذایی (گرم خوراک مصرفی به گرم افزایش وزن روزانه. Feed Conversion Ratio (FCR)

۴. تیتر آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن گلبول قرمز گوسفند (SRBC)

۵. پاسخ سیستم ایمنی به محلول ۱-کلرو ۲-۳-دی نیترو بنزن (DNCB)

(a)



$Y= ۲۲۰۲/۷+ ۳۷۴/۸ (۱-e^{-(۹/۶۴x_۱+۵/۳۳ x_۲)})$

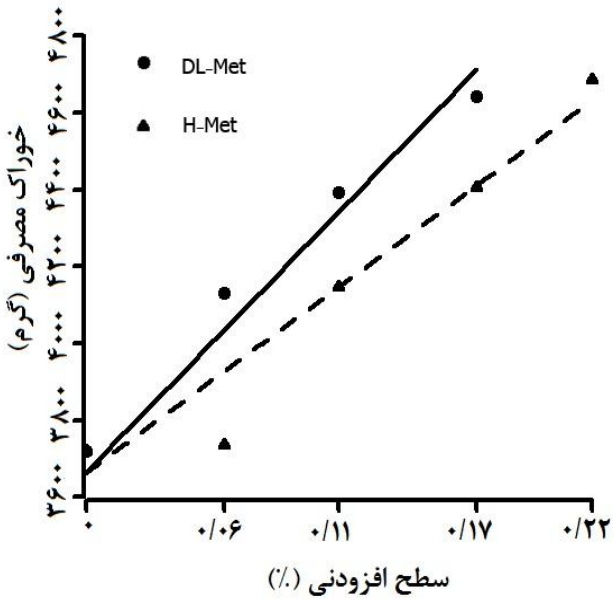
سودمندی نسبی:

DL-Met ($x_۱$) = ٪۱۰۰

H-Met ($x_۲$) = ٪۵۵ (۴۰-۷۱)*

R^2=٪۸۴

(b)



$Y= ۳۶۶۳/۰۱+ (۶۱۷۲/۷۱x_۱+ ۴۴۰۰/۷۲x_۲)$

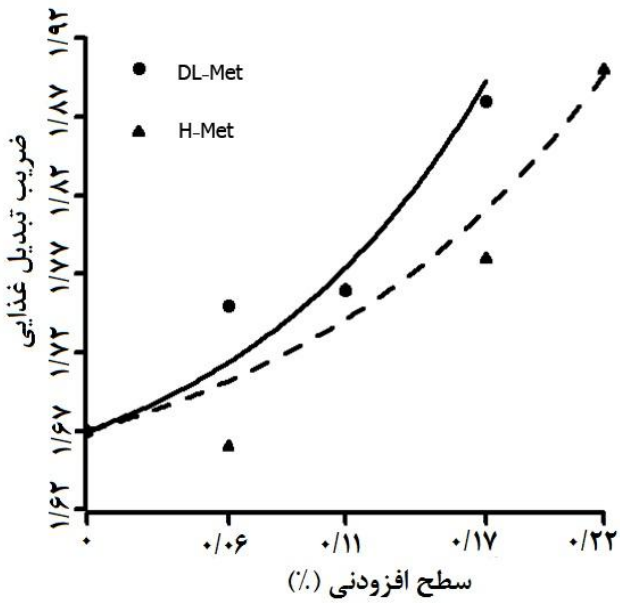
سودمندی نسبی:

DL-Met ($x_۱$) = ٪۱۰۰

H-Met ($x_۲$) = ٪۷۱ (۶۳-۷۹)*

R^2= ٪۹۳

(c)



$Y= ۱/۶۷- ۰/۰۶ (۱-e^{(۹/۱۳x_۱+۷/۱۱ x_۲)})$

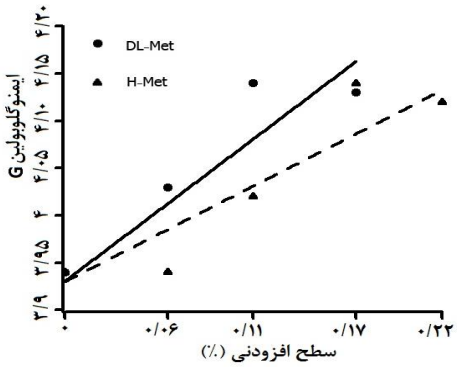
سودمندی نسبی:

DL-Met ($x_۱$) = ٪۱۰۰

H-Met ($x_۲$) = ٪۷۸ (۷۰-۸۶)*

R^2= ٪۸۵

شکل ۱- کارآیی زیستی متیونین گیاهی (H-Met) نسبت به متیونین سنتتیک (DL-Met) براساس افزایش وزن روزانه (a) بر حسب گرم، افزایش خوراک مصرفی روزانه (b) بر حسب گرم و ضریب تبدیل غذایی (c) در جوجه‌های گوشتی در دوره پرورشی (۴-۴۲ روزگی سن). سطح صفر نشان دهنده تیمار یک (شاهد) می‌باشد. *مقادیر موجود در پرانتز نشان دهنده فاصله اطمینان ٪۹۵ می‌باشد.



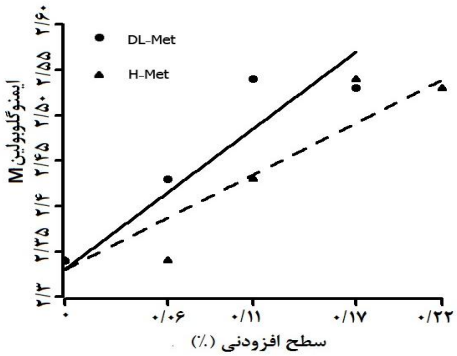
$Y= ۳/۹۳+ (۱/۳۷x_1+ ۰/۹۲x_2)$

سودمندی نسبی:

DL-Met ($x_۱$) = ٪۱۰۰

H-Met ($x_۲$) = ٪۶۷ (۶۰-۷۴)*

R^2= ٪۸۰



$Y= ۲/۳۳+ (۱/۴۱x_1+ ۰/۹۵x_2)$

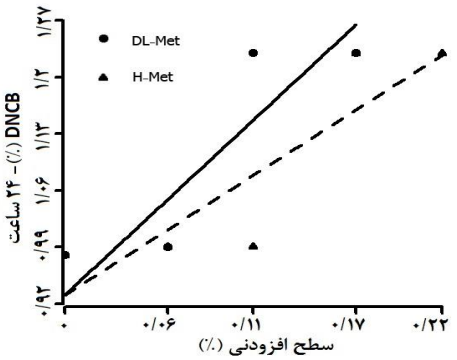
سودمندی نسبی:

DL-Met ($x_۱$) = ٪۱۰۰

H-Met ($x_۲$) = ٪۶۷ (۶۰-۷۴)*

R^2= ٪۸۱

شکل ۲) کارایی زیستی متیونین گیاهی (H-Met) نسبت به متیونین سنتتیک (DL-Met) بر اساس ایمنوگلوبولین G و ایمنوگلوبولین M در جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی. سطح صفر نشان دهنده تیمار یک (شاهد) می‌باشد. *مقادیر موجود در پرانتز نشان دهنده فاصله اطمینان ۹۵٪ می‌باشد.



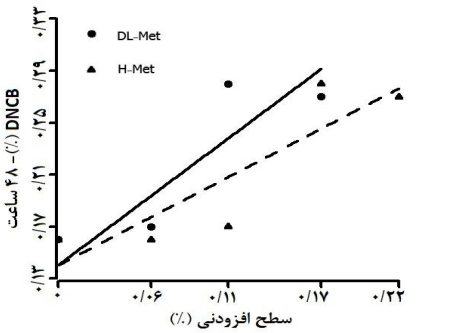
$Y= ۰/۹۳+ (۱/۹۷x_1+ ۱/۳۵x_2)$

سودمندی نسبی:

DL-Met ($x_۱$) = ٪۱۰۰

H-Met ($x_۲$) = ٪۶۹ (۵۷-۸۱)*

R^2= ٪۷۸



$Y= ۰/۱۴+ (۰/۸۹x_1+ ۰/۶۲x_2)$

سودمندی نسبی:

DL-Met ($x_۱$) = ٪۱۰۰

H-Met ($x_۲$) = ٪۷۰ (۵۷-۸۳)*

R^2= ٪۷۷

شکل ۳) کارایی زیستی متیونین گیاهی (H-Met) نسبت به متیونین سنتتیک (DL-Met) بر اساس پاسخ جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی به محلول DNCB، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تزریق. سطح صفر نشان دهنده تیمار یک (شاهد) می‌باشد. *مقادیر موجود در پرانتز نشان دهنده فاصله اطمینان ۹۵٪ می‌باشد.

از آنجایی‌که فرم پلیمری در مقایسات کارایی زیستی مواد مغذی تاثیر گذار می باشد (Okuno et al., 1989)، این احتمال وجود دارد که فرم پلیمری متیونین گیاهی به مقدار کمتری نسبت به فرم پلیمری متیونین سنتتیک جذب بدن شود که یکی از دلایل کارایی کمتر متیونین گیاهی نسبت به متیونین سنتتیک می‌باشد. دلیل دیگر این است که احتمالاً متیونین سنتتیک به علت دارا بودن انتقال دهنده‌هایی با تمایل و سرعت بالاتر نسبت به متیونین گیاهی بیشتر جذب بدن پرنده شود.

هزینه اقتصادی

نتایج این آزمایش نشان داد که سطح ۰/۱۱ ٪ متیونین سنتتیک و سطح ۰/۱۷٪ متیونین گیاهی اختلاف معنی‌داری باهم ندارند و بیشترین افزایش وزن و بهترین عملکرد تولیدی با این سطوح حاصل می‌شود. بنابراین، می‌توان محاسبه کرد که متیونین گیاهی باید ۱/۵۵ برابر متیونین سنتتیک مورد استفاده قرار گیرد تا همان پاسخ را ایجاد نماید. ازاینرو قیمت متیونین گیاهی باید ۴۵٪ متیونین سنتتیک در نظر گرفته شود تا استفاده از آن در جیره جوجه‌های گوشتی مقرون به‌صرفه باشد.

REFERENCES

1. Baradaran, H. & Farid Hosseini, V. R. (1992). Paractical immunology. Razavi cultural foundation. Second edition. (In farsi).
2. Benevenga, N. I. (1974). Toxicities of methionine and other amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 2-9.
3. Bunchasak, C. & Keawarun, N. (2006). Effect of methionine hydroxyl analog-free acid on growth performance and chemical composition of liver of broiler chicks fed a corn-soybean based diet from 0 to 6 weeks of age. *Animal Science Journal*, 77, 95-102.
4. Bunchasak, C., Sooksridang, T. & Chaiyapit, R. (2006). Effect of adding methionine hydroxy analogue as methionine source at the commercial requirement recommendation on production performance and evidence of ascites syndrome of male broiler chicks fed corn-soybean based. *International Journal of Poultry Science*, 5, 744-752.
5. Chattopadhyay, K., Mondal, M.K. & Roy, B. (2006). Comparative Efficacy of DL-Methionine and Herbal Methionine on Performance of Broiler Chicken. *International Journal of Poultry Science*, 5, 1034-1039.
6. Chiou, W. F., Chen, C. F. & Lin, J. J. (2000). Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. *British Journal of Pharmacology*, 129, 1553-1560.
7. Esteve-Garcia, E., Austic, R. E. (1993). Intestinal absorption and renal excretion of dietary methionine sources by the growing chicken. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 4, 576–587.
8. Figge, R., Soucaile, P. & Bestel-corre, G. (2010). Producing methionine without n-acetyle-methionine. United States Patent, No.0047879 AI.
9. Grimble, R. F. (2006). The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *The Journal of Nutrition*, 136, 16660S-1665S.
10. Grimble, R. F. (1996). Theory and efficacy of antioxidant therapy. Current Opinion in Critical Care, 2, 260–6.
11. Hoehler, D., Lemme, A., Jensen, S. K. & Vieira, S. L. (2005a). Relative effectiveness of methionine sources in diets for broiler chickens. *Applied Poultry Research*, 14, 679–693.
12. Hoehler, D., Lemme, A., Roberson, K. & Turner, K. (2005b). Impact of methionine sources on performance in turkeys. Applied Poultry Research, 2005b, 14, 296–305.
13. Kalbande, V. H., Ravikanth, K., Maini, S. & Rekhe, D. S. (2009). Methionine supplementation option in poultry. *International Journal of Poultry Science*, 8, 588-591.
14. Kita, K., Matsunami, S. & Okumura, J. (1996a). Relationship of protein synthesis to mRNA levels in the muscle of chicks under various nutritional conditions. *Journal of Nutrition*, 126, 1827–1832.
15. Kita, K., Matsunami, S. & Okumura, J. (1996b). Relationship of protein synthesis to mRNA levels in the liver of chicks under various nutritional conditions. *Journal of Nutrition*, 126, 1610–1617.
16. Kontny, E., Szczepanska, K., Kowalczewski, J., Kurowska, M., Janicka, I., Marcinkiewicz, J., Maslinski, W. (2000). The mechanism of taurine chloramine inhibition of cytokine (interleukin-6, interleukin-8) production by rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes. *Arthritis Rheumatism*, 43, 2169–77.
17. Littell, R. C., Henry, P. R., Lewis, A. J. & Ammerman, C. B. (1997). Estimation of relative bioavailability of nutrients using SAS procedures. *Animal Science*, 75, 2672–2683.

18. Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.*Cell*, 104, 487-501.
19. Meister, A. (1965). Intermediary metabolism of the amino acids. Biochemistry of Amino Acids, 785. Academic Press, New York, London.
20. Methorganic (Herbal Methionine) Retrieved November 12, 2010, from http://www.veterinaryindia.net/poultry.html.
21. Munns, P. L., & S. J. Lamont. (1991). Research note: Effects age and Immunization interval on the immunity response T-cell dependent and T-cell independent antigens in chickens. *Poultry Science*, 70, 2371-2374.
22. Okuno, Y., Matsuda, A., Morimoto H. & Takagi, H. (1989). Biological efficacy of liquid methionine hydroxy analogue free acid in 7–18-day-old and 42–54-day-old broilers. *Japan Poultry Science Association Autumn Meeting*. Kagawa.
23. Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. & Kollias, G. (1996). Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *The Journal of Experimental Medicine*, 184, 1397-1411.
24. Qin, L. H., Kong, L., Shi, G. J., Wang, Z. T. & Ge, B. X. (2006). Andrographolide Inhibits the Production of TNF-a and Interleukin-12 in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages: Role of Mitogen-Activated Protein Kinases. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29, 220-224.
25. Shivachandra, S. B., Sah, R. L., Singh, S. D., Kataria, J. M. & Manimaran, K. (2003). Immunosuppression in broiler chicks fed aflatoxin and inoculated with fowl adenovirus serotype-4 (FAV-4) associated with hydropericardium syndrome. Veterinary Research Communications, 27, 39–51.
26. Swain, B. K. & Johri, T. S. (2000). Effect of supplemental methionine, choline and their combinations on the performance and immune response of broilers. *British Poultry Science*,41, 83-88.
27. Thomas, O. P, Tamplin, C., Crissey, S. D., Bossard, E., Zuckerman, A. (1991). An evaluation of methionine hydroxy analog free acid using a nonlinear (exponential) bioassay. *Poultry Science*, 70, 605–610.
28. Tiwary, B. K., & Goel. M. C. (1985). Contact sensitivity to DNCB in normal and cell mediated immunity deficient chickens: In vivo detection and correlation with lymphocyte transformation and graft versus host reaction. Veterinary. *Immunology and Immunopathology*, 8, 329–339.
29. Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.*Nature Reviews Immunology*, 2, 133-146.
30. Tsiagbe, V. K., Cook, M. E., Harpera, A. E. & Sunde, M. L. (1987). Enhanced immune responses in broiler chicks fed methionine supplemented diets. *Poultry Science*, 66, 1147-1154.
31. Tuckermann, J. P., Kleiman, A., Moriggl, R., Spanbroek, R. & Neumann, A. (2007). Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007: 117: 1381–1390.
32. Vander, x. i. j. p. p. (1980). Genetic Analysis of the humoral immune response of white leghorn chicks. *Poultry Science*, 59, 1363-1369.
33. van Weerden, E. J., Schutte, J. B, Bertram, H. L. (1992). Utilization of the polymers of methionine hydroxy analogue free acid (MHA-FA) in broiler chicks. *Archives Geflügelk*, 56, 63–68.
34. Watanabe, H., Unger, M., Tuvel, B., Wang, B. & Sauder, D. N. (2002). Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22, 407–412.
35. Zhang, E. Y., Chen, A. Y. & Zhu, B. T. (2009). Mechanism of dinitrochlorobenzene-induced dermatitis in mice: Role of specific antibodies in pathogenesis. *Plos One*, 4: e7703. doi:10.1371.