



شرکت مرغ نوجان

تامین مواد اولیه و ضروری خوراک دام و طیور

MorgheNojan.Com

Info@MorgheNojan.Com

۰۲۶ - ۳۴۳۹۰۳۵۱ - ۶



گروه علمی شرکت مرغ نوجان

اثرات متفاوت ایزومرهای متیونین در جوجه‌های گوشتی تحت شرایط تنش گرمایی

چکیده

در این مطالعه، تاثیر ایزومرهای متیونین (دی و ال) بر روی عملکرد رشد، سطح متابولیت‌های خون، قابلیت هضم مواد مغذی، ریخت‌شناسی روده، و وضعیت پوستی بالشتک پا در جوجه‌های گوشتی در معرض تنش حرارتی حاد مورد بررسی قرار گرفت. ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی به شکل تصادفی در یک آزمایش فاکتوریل ۲×۲ شامل دو تیمار جیره (دی - متیونین در برابر ال - متیونین) و دو شرایط حرارتی محیطی (محیط خنثی حرارتی در برابر تنش حرارتی حاد) اختصاص داده شدند. ایزومرهای متیونین بر اساس فرمولاسیون به جیره‌ها اضافه شدند. از روز ۱۴ جوجه‌ها در ۳۳ °C به مدت ۵ ساعت در معرض تنش حرارتی قرار گرفتند. متوسط افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل غذایی پرندگان تغذیه شده با ال - متیونین از روز تولد تا روز ۲۱ بیشتر از پرندگانی بود که با دی - متیونین تغذیه شده بودند ($P < 0.05$). تنش حرارتی، افزایش وزن و خوراک مصرفی جوجه‌های گوشتی را در ۲۱ روزگی کاهش داد ($P < 0.05$). علاوه، سطح نیتروژن اوره خون پرندگان در معرض تنش حرارتی حاد در روز ۱۴ و ۲۱ بیشتر از گروه خنثی بود ($P < 0.05$). بدون در نظر گرفتن شرایط دمایی محیطی، در روز ۱۴ پرورش، جوجه‌هایی که از مکمل ال - متیونین تغذیه کرده بودند، پرزهای بلندتری نسبت به جوجه‌های تغذیه شده با دی - متیونین داشتند ($P < 0.05$). تنش حرارتی قابلیت هضم مواد مغذی جوجه‌های گوشتی را در روز ۱۴ و ۲۱ پرورش کاهش داد ($P < 0.01$). آسیب حاد پوستی بالشتک پا در جوجه‌های گوشتی که از دی - متیونین تغذیه کرده بودند نسبت به جوجه‌های تغذیه شده با ال - متیونین مشاهده شد ($P < 0.05$). نتیجه کلی، مکمل کردن جیره با ال - متیونین در دوره آغازین باعث بهبود عملکرد رشد، جلوگیری از کاهش رشد و کاهش وقوع آسیب پوستی بالشتک پا در جوجه‌هایی که در معرض تنش حرارتی حاد قرار داشتند، گردید.

واژه‌های کلیدی: تنش حرارتی حاد، جوجه گوشتی، قابلیت هضم، عملکرد رشد، ایزومرهای متیونین

مقدمه

متیونین اولین اسید آمینه ضروری محدود کننده برای جوجه‌های گوشتی است که از جیره‌های حاوی ذرت و کنجاله سویا مصرف می‌کنند و مشخص شده که تاثیر مستقیم بر روی تولید آنها دارد (Goulart *et al.*, 2011; Farkhoy *et al.*, 2012). چندین مطالعه به اهمیت ال - متیونین در جوجه‌های گوشتی و نقش آن بر روی عملکرد رشد نظیر افزایش رشد، پر و پاسخ ایمنی اشاره نموده‌اند (Xie *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2015). متیونین مصنوعی به تناوب در قالب دی - ال - متیونین (حاوی ۵۰٪ ال - متیونین و ۵۰٪ دی - متیونین) یا محلول مایع ۲- هیدروکسی - ۴- (متیل تیو) - بوتانوثیوئیک اسید به جیره غذایی طیور اضافه می‌شود (Shen *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). طیور توانایی استفاده هر دو نوع ایزومر و آنالوگ‌های متیونین برای ساخت پروتئین را دارند، که این کار را از طریق مسیر منحصر بفرد آنزیمی در کبد و کلیه انجام می‌دهند و طی آن دی - متیونین را به ال - متیونین تبدیل می‌کنند (Baker, 2006; Thwaites and Anderson, 2007, Shen *et al.*, 2015). دی - آمینو اسید اکسیداز، که ایزومر دی یا دی - آنالوگ را به ال - ایزومر تبدیل می‌کند، در کبد و کلیه به مقدار فراوان وجود دارد (Bauriedel, 1963). اما، ساخت دی - آمینو اسید اکسیداز بطور معنی داری در حیوانات جوان پائین است (D'Aniello *et al.*, 1993). بنابراین، عملکرد رشد و تکامل دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره مکمل شده با ال - متیونین بایستی بهتر از جیره مکمل شده با دی - متیونین باشد. مطالعات قبلی عملکرد رشد طیور تغذیه شده با جیره‌های حاوی دی - ال - متیونین، ال - متیونین، و متیونین هیدروکسی آنالوگ را مقایسه نموده‌اند (Shen *et al.*, 2015; Esteve-Garcia and Khan, 2018). اما هیچیک از این مطالعات بطور جداگانه اثرات دی - متیونین و ال - متیونین بر روی عملکرد رشد و پاسخ دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی را بررسی نکرده‌اند.

هر دو ایزومر متیونین، مسیرهای وابسته به سدیم و بدون سدیم برای عبور از دیواره دستگاه گوارش حیوان را دنبال می‌کنند (Knight *et al.*, 1994; Soriano and García *et al.*, 1998). جذب از طریق مسیر بدون واسطه سدیم در طی تنش حرارتی تغییر یافته، در نتیجه دی - متیونین نسبت به ال - متیونین کمتر جذب می‌شود. متعاقباً، تبدیل دی - متیونین به ال - متیونین در شرایطی که پرنده تحت تنش حرارتی است، توأم با از دست دادن انرژی خواهد بود (Knight *et al.*, 1994). لذا، ال - متیونین مزیت رقابتی در طی تنش حرارتی برای جوجه‌های گوشتی دارد. نشان داده شده که متیونین جیره غذایی خاصیت التیام زخم (Perez-Tamayo and Ihnen, 1953) و ارتباط با ناراحتی پوستی بالشتک پا (Murillo and Jensen, 1976; Shepherd and Fairchild, 2010) در طیور دارد. اما، شواهد در خصوص تاثیر ایزومرهای متیونین بر روی زخم‌های ناحیه پوست بالشتک پا محدود است.

بنابراین، هدف از این مطالعه، بررسی پاسخ‌های متفاوت ال - متیونین و دی - متیونین بر روی عملکرد رشد، قابلیت هضم مواد مغذی، و آسیب پوستی ناحیه بالشتک پا در جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی بود.

مواد و روش‌ها

پروتکل آزمایشی برای این مطالعه توسط کمیته اخلاق حیوانات دانشگاه ملی چانگ نام مورد تأیید قرار گرفت (Protocol No. CNU - 00779).

طرح آزمایشی و مدیریت

۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی یکروزه راس، از جوجه کشی دریافت و بطور تصادفی در قالب یک آزمایش فاکتوریل ۲×۲ با شش تکرار به واحدهای آزمایشی اختصاص داده شدند. فاکتورها شامل دو ایزومر متیونین (دی - متیونین در برابر ال - متیونین) و دو شرایط حرارتی محیطی (محیط خنثی حرارتی در برابر تنش حرارتی حاد) بودند. ده قطعه جوجه گوشتی با میانگین وزن بدن $47/5 \pm 0/2$ گرم (میانگین \pm خطای معیار میلدگین) در هر پن یا واحد آزمایشی (۰/۳۵ متر \times ۰/۵۵ متر \times ۰/۸۵ متر) بر روی کف‌های سیمی پرورش داده شدند. به دلیل محدودیت فضا جهت سهولت در تحقیق، آزمایش در دو دوره زمانی متوالی با دو شرایط محیطی

حرارتی متفاوت با یک روش کاملاً یکسان انجام شد (۱۲۰ جوجه گوشتی در هر دوره).

جیره‌های آزمایشی به شکل آزادانه به مدت ۵ هفته با استفاده از دانخوری ناودانی فلزی به پرندگان داده شدند. در سراسر آزمایش، جوجه‌های گوشتی بصورت آزادانه از طریق آبخوری‌های قطره چکانی دسترسی به آب آشامیدنی تمیز داشتند تمام عملیات مدیریتی بر اساس کتابچه راهنمای مدیریتی جوجه گوشتی راس اجرا شد (Avigen, 2014a).

جیره‌های آزمایشی

یک جیره پایه بر اساس ذرت، کنجاله سویا و جو فرموله شد (جدول ۱) تا احتیاجات مواد مغذی پرندگان را بر اساس مشخصات تغذیه‌ای راس ۳۰۸ دقیقاً یا بیشتر از آن تامین نماید (Avigen, 2014b). جیره فرموله شده بدون افزودن متیونین کریستاله مخلوط شد تا یک جیره پایه که کمبود متیونین دارد، تهیه شود.

جیره‌های آزمایشی با افزودن جداگانه ایزومرهای دی وال متیونین به جیره‌های پایه فاقد متیونین تهیه شدند. جیره‌ها فاقد هرگونه ضد میکروب محرک رشد یا جایگزین این ترکیبات بودند. در هنگام مخلوط کردن جیره‌های تیمارها، ۰/۳٪ اکسید کروم (Cr2O3: > 99.9%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) به عنوان یک نشانگر غیر مستقیم برای آنالیز قابلیت هضم به جیره‌ها اضافه شد. پس از مخلوط کردن جیره‌ها، نمونه‌هایی از آنها برای تجزیه شیمیایی تهیه گردید.

جدول ۱- ترکیب جیره‌های آزمایشی (گرم در هر کیلوگرم، بر اساس as-fed)

ترکیبات جیره	۱-۳ هفتگی	۴-۵ هفتگی
جو	۲۳/۸۵	-
ذرت	۳۵/۱۲	۶۳/۷۲
کنجاله سویا	۳۵	۳۱/۵
روغن گیاهی	۱/۳۸	۰/۵۸
سنگ آهک	۱/۲۷	۰/۹۶
مونوکلسیم فسفات	۱/۸۵	۱/۷۰
نمک یددار	۰/۲۶	۰/۳۰
مکمل ویتامینی - معدنی ^۱	۰/۳۰	۰/۴۰
لیزین هیدروکلراید	۰/۳۴	۰/۲۰
ال-آرژنین	۰/۱۳	۰/۱۷
دی یا ال متیونین	۰/۲۵	۰/۱۸
ترئونین	۰/۱۳	۰/۱۵
والین	۰/۱۲	۰/۱۴
مقادیر محاسبه شده		
انرژی قابل متابولیسم، کیلوکالری بر کیلوگرم	۳۰۵۰	۳۱۵۰
پروتئین خام %	۲۲	۲۰
کلسیم %	۱	۰/۸۵
فسفر قابل دسترس %	۰/۵۰	۰/۴۵
لیزین %	۱/۴۴	۱/۲۱
متیونین %	۰/۵۶ ^۲	۰/۴۸ ^۳
متیونین + سیستئین %	۰/۹۳	۰/۸۲
ترئونین %	۰/۹۲	۰/۸۸
تریپتوفان %	۰/۲۷	۰/۲۳
والین %	۱/۱	۱/۰۳
آرژنین %	۱/۵	۱/۴۰

۱- هر کیلوگرم جیره حاوی:

Fe (FeSO4·H2O), 80 mg; Zn (ZnSO4·H2O), 80 mg; Mn (MnSO4·H2O) 80 mg; Co (CoSO4·H2O) 0.5 mg; Cu (CuSO4·H2O) 10 mg; Se (Na2SeO3) 0.2 mg; I, (Ca(IO3)·2H2O) 0.9 mg; Vitamin A, 24,000 IU; Vitamin D3, 6,000 IU; Vitamin E, 30 IU; Vitamin K, 4 mg; Thiamin, 4 mg; Riboflavin, 12 mg; Pyridoxine, 4 mg; Folic acid, 2 mg; Biotin, 0.03 mg; Vitamin B8, 0.06 mg; Niacin, 90 mg; Pantothenic acid, 30 mg

۲- متیونین اجزاء - متیونین سنتتیک = ۴۴/۵ : ۵۵/۵

۳- متیونین اجزاء - متیونین سنتتیک = ۳۷/۵ : ۶۲/۵

پروتکل تنش حرارتی

در گروه کنترل خنثی حرارتی، درجه حرارت محیطی از روز اول الی سوم $30 \pm 1^\circ\text{C}$ بود و سپس بتدریج کاهش یافت بطوریکه در زمان ۱۴ روزگی پرندگان، دما $25 \pm 1^\circ\text{C}$ بود. پس از آن در سرتاسر آزمایش درجه حرارت در $25 \pm 1^\circ\text{C}$ باقی ماند. بطور مشابه، در گروه تیمار تنش حرارتی حاد، درجه حرارت محیطی از روز اول الی سوم $30 \pm 1^\circ\text{C}$ بود و سپس بتدریج کاهش یافت بطوریکه در زمان ۱۴ روزگی پرندگان، دما $25 \pm 1^\circ\text{C}$ بود. در روز ۱۴، جوجه‌های گوشتی به شکل زیر تحت تنش حرارتی قرار گرفتند. درجه حرارت محیط (25°C) طی دو ساعت افزایش یافت (هر ساعت 4°C افزایش) تا رسیدن به دمای 33°C (70% رطوبت). بدنال آن، درجه حرارت برای مدت ۳ ساعت در محدوده $33 \pm 0/5^\circ\text{C}$ نگهداری شد و بتدریج تا درجه حرارت محیط (25°C) کاهش یافت. پس از آن، درجه حرارت محیط ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) تا پایان آزمایش حفظ شد. درجه حرارت عمق بدن جوجه‌های گوشتی در طی دوره تنش حرارتی حاد (شروع، ۲ ساعت، و ۵ ساعت) با قرار دادن دماسنج در مقعد پرنده اندازه‌گیری شد (FlashCheck® tip probe thermometer, Weber Scientific, Hamilton, NJ, USA).

اندازه‌گیری‌ها

در روز اول آزمایش، وزن بدن جوجه‌های گوشتی رکوردبرداری شد (بر اساس پن). متعاقباً، وزن کشی بدن به شکل هفتگی تا پایان آزمایش صورت گرفت.

افزایش وزن روزانه از روی وزن بدن محاسبه شد. مصرف خوراک هر پن به شکل هفتگی محاسبه شد. خوراک مصرفی و ضریب تبدیل غذائی بر اساس تلفات تصحیح و محاسبه شد.

در پایان آزمایش، بطور تصادفی ۳۰ قطعه جوجه گوشتی از هر تیمار (۵ پرنده از هر پن) برای مشاهده احتمالی آسیب پوستی بالشتک در هر دو پا جدا و مورد بررسی قرار گرفتند. به ضایعات تا ۵ امتیاز داده شد، امتیاز از ۰ (بدون ضایعات) تا ۴ (ضایعات خیلی حاد) براساس توصیف (Butterworth, 2013) جمع‌آوری نمونه

نمونه‌ها در روزهای ۲۱، ۲۵ و ۳۵ آزمایش جمع‌آوری شدند. یک پرنده از هر قفس در یک زمان (۱۲ پرنده از هر تیمار) برای جمع‌آوری نمونه انتخاب شدند. قبل از کشتار بدون درد جوجه‌های گوشتی، نمونه‌های خون بوسیله سرنگ از رگ بال گرفته و به لوله‌های حاوی EDTA انتقال داده شدند (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, USA). نمونه‌های خون جمع‌آوری شده، بلافاصله برای جداسازی پلاسما به آزمایشگاه منتقل شدند. جوجه‌های گوشتی از طریق جابجائی مهره‌های گردن کشتار و سپس سرخرگ کاروتید و سیاهرگ گردنی آنها بریده و خون از بدن آنها تخلیه شد. پس از کشتار و جداسازی ایلتوم از دستگاه گوارش، برش‌های رودهای صورت گرفت. ایلتوم از ناحیه‌ای از روده کوچک که زائده مکل آغاز می‌شد تا محل اتصال به سکوم در نظر گرفته شد (Incharoen *et al.*, 2010). نمونه‌های جداشده (به اندازه ۳ سانتی‌متر) در بافر نمکی فسفات و در یخ قرار گرفتند (PBS, pH 7.4) و سپس تا زمان تهیه اسلاید میکروسکوپی در فرمالدئید ۱۰٪ نگهداری شدند.

بقایای هضمی بخش ایلتوم به آرامی به ظرف پلاستیکی دارای برچسب انتقال و بلافاصله در دمای 20°C - تا زمان آنالیز نگهداری شدند.

آماده‌سازی نمونه و آنالیز آزمایشگاهی

نمونه‌های خون در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C سانتریفوژ (Micro 12, Hanil Science Co. Ltd., Korea) و پلاسما آنها جداسازی شد. میزان نیتروژن اوره خون (BUN) و غلظت کراتینین با استفاده از دستگاه تمام اتوماتیک آنالیزر ۷۰۲۰ هیتاچی ساخت کشور ژاپن، اندازه‌گیری شدند. بطور خلاصه، سطح BUN با استفاده از روش کینتیک آنزیمی اوره‌آز (Morishita *et al.*, 1997) و غلظت کراتینین پلاسما با استفاده از روش jaffe اندازه‌گیری شدند (Whiting, 2006).

نمونه‌های بافتی ایلتومی ثابت شده در فرمالدئید برای آماده‌سازی مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های بافت ایلتومی حلقوی شکل، برش داده شدند و آب آنها جدا و در موم پارافین قرار گرفتند. شش برش عرضی (۴-۶ میکرومتر) از هر کدام با میکروتوم صورت گرفت، سپس با همتاکسلیلین و ائوزین رنگ آمیزی و در زیر اسلایدهای شیشه‌ای قاب سازی شدند. شاخص‌های هیستولوژی با استفاده از نرم‌افزار (Version: 4.20; NIS Elements, NIS-Elements Viewer) و انرژی (Nikon, Tokyo, Japan) و با میکروسکوپ اینورت (نیکون) اندازه‌گیری شدند. ارتفاع و عمق ۱۰ پرز که بخوبی آماده‌سازی شده بودند اندازه‌گیری و برای آنالیز مورد استفاده قرار گرفتند.

محتویات هضمی جمع‌آوری شده ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای 55°C خشک و نمونه‌ها با الک قطر ۰/۷۵ میلی‌متر آسیاب شدند (ZM 200 Ultra-Centrifugal Mill, Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Germany). میزان ماده خشک، پروتئین خام (N×6.25, macro-Kjeldahl) و انرژی خام نمونه‌های آسیاب شده بر اساس استاندارد AOAC (1995) مورد آنالیز قرار گرفتند. همچنین غلظت اکسید کروم در نمونه‌ها اندازه‌گیری شدند (Fenton and Fenton, 1979). قابلیت هضم ایلتومی با استفاده از روش Huang *et al.* (2005) اندازه‌گیری شد.

{(ماده مغذی در جیره × نشانگر در محتویات هضمی) / (ماده مغذی در محتویات هضمی × نشانگر در جیره)} - ۱ = ضریب قابلیت هضم ظاهری

محاسبات و آنالیز آماری

نتایج در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از مدل خطی معمولی (GLM) و تجزیه واریانس دوطرفه (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS مورد آنالیز قرار گرفتند (Version 21; IBM SPSS 2012). پن‌ها به عنوان واحد آزمایشی برای عملکرد رشد مورد استفاده قرار گرفتند. جوجه‌های گوشتی انتخاب شده جهت وقوع آسیب پوستی ناحیه بالشتک پا، شاخص‌های خونی، مورفولوژی روده و قابلیت هضم مواد مغذی در نظر گرفته شدند. تیمارهای غذائی (ایزومرهای متیونین) و شرایط تنش حرارتی به عنوان دو اثر اصلی در نظر گرفته شدند. وقوع آسیب پوستی ناحیه بالشتک پا در مقیاس چندجمله‌ای رکوردبرداری و سپس به شکل دو جمله‌ای تغییر داده شد. در این امتیازبندی امتیاز بالشتک پا طبقه بندی شد بصورت: ۱ (بدون آسیب: امتیاز ۱)، ۲ (آسیب اولیه: امتیاز ۱ و ۲)، و ۳ (آسیب شدید: امتیاز ۳ و ۴). اطلاعات پاسخ مستقیم جیره با استفاده از آزمون χ^2 آنالیز شد (Martins *et al.*, 2016). میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند متغیره توکی با نرم‌افزار SPSS (Version 21; IBM SPSS 2012) هنگامیکه اثر تیمار معنی‌دار بود ($P < 0.05$) با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

مشاهدات ما نشان از له زدن زیاد، پراکندگی نامتعارف در قفس، و دمای بالای مقعدی بود ($P < 0.05$; Table 2) که نشان دهنده این است که جوجه های گوشتی با موفقیت تحت تاثیر تنش حرارتی قرار گرفته‌اند.

جدول ۲- تاثیر افزودن ایزومرهای متیونین جیره غذایی و مدت زمان تنش حرارتی بر روی درجه حرارت مقعد جوجه‌های گوشتی^۱

Item	Start (25°C)		2 h (33°C)		5 h (33°C)		SEM ²	P-value		
	L- Methionine	D- Methionine	L- Methionine	D- Methionine	L- Methionine	D- Methionine		Time ³	Diet ⁴	Time× Diet
Temperature, °C	41.22	41.34	41.61	41.55	41.48	41.41	0.027	0.001	0.984	0.305

¹ Values are the mean of six replicates per treatment.² Pooled standard error of mean³ Time of the heat stress (0 h, 2 h, and 5 h)⁴ Dietary methionine isomersجدول ۳- تاثیر افزودن ایزومرهای متیونین جیره غذایی و مدت زمان تنش حرارتی بر عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی^۱

Item	Acute heat stress		Thermo-neutral control		SEM ²	P-value		
	L- Methionine	D- Methionine	L- Methionine	D- Methionine		HS ³	Diet ⁴	HS×Diet
<i>Avg. daily gain, g</i>								
Day 7	22.75	21.80	23.09	22.46	0.24	0.320	0.121	0.736
Day 14	50.85	48.32	49.88	49.68	0.66	0.883	0.313	0.389
Day 21	71.42	67.69	74.53	74.37	1.02	0.026	0.351	0.391
Day 28	76.48	74.82	85.47	84.09	1.20	0.001	0.533	0.954
Day 35	74.35	69.65	71.70	71.54	2.25	0.934	0.595	0.620
Day 1-21	48.34	45.93	49.16	48.84	0.29	0.004	0.029	0.088
Day 22-35	75.41	72.23	78.59	77.82	1.19	0.080	0.414	0.617
Day 1-35	59.17	56.46	60.93	60.43	0.51	0.011	0.134	0.296
<i>Avg. daily feed intake, g</i>								
Day 7	25.8	24.8	25.2	24.7	0.24	0.491	0.156	0.598
Day 14	67.6	67.2	67.9	67.6	0.78	0.828	0.794	0.965
Day 21	103.7	102.1	115.4	115.1	1.55	0.001	0.758	0.822
Day 28	131.6	129.1	132.3	132.2	1.81	0.602	0.716	0.743
Day 35	127.0	123.0	126.3	125.6	2.14	0.824	0.595	0.703
Day 1-21	65.7	64.7	69.5	69.1	0.45	0.001	0.445	0.703
Day 22-35	129.3	126.1	129.3	128.9	1.33	0.594	0.501	0.598
Day 1-35	91.2	89.2	93.4	93.1	0.65	0.029	0.385	0.554
<i>Feed conversion ratio, g/g</i>								
Day 7	1.13	1.14	1.09	1.10	0.01	0.077	0.233	0.621
Day 14	1.33	1.39	1.36	1.37	0.01	0.864	0.214	0.266
Day 21	1.45	1.51	1.55	1.55	0.02	0.026	0.282	0.390
Day 28	1.73	1.73	1.55	1.58	0.03	0.006	0.770	0.841
Day 35	1.72	1.78	1.79	1.80	0.04	0.617	0.686	0.773
Day 1-21	1.30	1.35	1.33	1.34	0.01	0.289	0.048	0.143
Day 22-35	1.72	1.76	1.67	1.69	0.03	0.235	0.625	0.845
Day 1-35	1.47	1.51	1.47	1.48	0.01	0.465	0.303	0.513

¹ Values are the mean of six replicates per treatment.² Pooled standard error of mean³ Heat stress condition (acute heat stress vs thermo-neutral control)⁴ Dietary methionine isomers