

**Original Research Paper****Effect of different levels of processed soybean meal on PRSS1 gene expression in broiler chicks****Arsalan Nabati ¹, Mohammad Chamani ^{1*}, Farhad Froudi ², Ali Asghar Sadeghi ¹, Mehdi Amin Afshar ¹**¹Department of Animal science, Science and research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran²Department of Animal science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran**Key Words**Feed efficiency
PRSS1
Soy
Poultry**Abstract**

Introduction: The presence of a protein source with a high content of amino acids is very important in poultry nutrition. This experiment was performed to investigate the effect of two levels of processed soybean meal on PRSS1 gene expression in the broiler chickens.

Materials & Methods: For this purpose, the effect of cooking and extruding on the quality of soybean meals was investigated in the first experiment. Samples were prepared from a uniform shipment and different heat treatments were performed using a cooking pot. **Results:** Based on the results of the first experiment, soybean meals processed at 90 ° C showed a better characteristic and were selected for *in vivo* experiment (Second experiment). A total of 560 Ross 308 broiler chickens were randomly divided into 7 different groups. The first group considered as control (C) which received a basal diet containing corn and a common soybean meal. The groups S1, G1, and F1 received diets containing 2.5% of processed soybean meal in the initial, growth, and the entire experimental period respectively. Groups S2, G2, and F2 received diets containing 5% of processed soybean meal in the initial, growth, and the entire experimental period, respectively. In order to evaluate the gene expression, the chicks were slaughtered and the pancreatic sample of each chick was isolated and sent to the laboratory to evaluate the trypsin gene expression. Gene expression was evaluated according to the company recommendations. The results of this experiment showed that processed soybean meal increased the expression of PRSS1 gene compared to the control group ($p < 0.05$). Moreover, the expression level of the PRSS1 gene in groups F2 and G2 was higher than control ($p < 0.05$).

Conclusion: Based on the results of this study, cooking and extruding of soybean meal at 90 °C, had a significant effect on decreasing the inhibitory content of trypsin. This may lead to reduce the content of this inhibitor to less than the poultry desired level.

* Corresponding Author's email: m.chamani@srbiau.ac.ir

Received: 31 October 2021; Reviewed: 4 December 2021; Revised: 5 January 2022; Accepted: 8 March 2022

(DOI): [10.22034/AEJ.2022.328140.2749](https://doi.org/10.22034/AEJ.2022.328140.2749)

مقاله پژوهشی

اثر سطوح مختلف کنجاله سویای فرآوری شده بر بیان ژن PRSS1 در جوجه های گوشتی

ارسلان نباتی^۱، محمد چمنی^{۱*}، فرهاد فرودی^۲، علی اصغر صادقی^۱، مهدی امین افشار^۱^۱ گروه علوم دامی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران^۲ گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

بازدهی خوراک
PRSS1
سویا
طیور

مقدمه: وجود یک منبع پروتئینی با محتوای بالای اسیدهای آمینه از اهمیت فراوانی در تغذیه طیور برخوردار است. این آزمایش به منظور بررسی اثر دو سطح مختلف کنجاله سویای فرآوری شده بر بیان ژن PRSS1 در جوجه های گوشتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش ها: به این منظور در مرحله اول تأثیر عامل پخت و اکسترودر کردن بر خصوصیات کیفی کنجاله سویا انجام شد. نمونه ها از یک محموله یکنواخت تهیه و تیمارهای مختلف حرارتی با استفاده از دیگ پخت انجام شد.

نتایج: براساس نتایج حاصله، کنجاله سویای فرآوری شده در درجه حرارت ۹۰ درجه سلسیوس به عنوان نمونه مورد نظر جهت آزمایش درون تنی (In vivo) شد. برای انجام آزمایش درون تنی، پانصد و شصت جوجه گوشتی راس ۳۰۸ به صورت تصادفی در ۷ تیمار قرار گرفتند. گروه شاهد (C) که جیره پایه حاوی ذرت و کنجاله سویای متداول را دریافت کرد. گروه های S1، G1 و F1، جیره حاوی ۲/۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده را به ترتیب در دوره آغازین، رشد و کل دوره دریافت کردند. گروه های S2، G2 و F2، جیره حاوی ۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده را به ترتیب در دوره آغازین، رشد و کل دوره دریافت کردند. به منظور بررسی بیان ژن در بافت پانکراس در پایان دوره آزمایش، پس از کشتار جوجه ها، قطعه هایی از پانکراس هر جوجه جدا شده و جهت ارزیابی بیان ژن تریپسین به آزمایشگاه ارسال شدند. نتایج این آزمایش نشان داد که سطوح مختلف کنجاله سویای فرآوری شده، بیان ژن PRSS1 را در گروه های مصرف کننده سویای فرآوری شده در مقایسه با گروه سویای خام افزایش داد ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که گروه F1 در مقایسه با گروه شاهد نرخ بیان ژن بالاتری را داشتند ($p < 0.05$). هم چنین، سطح بیان ژن PRSS1 در گروه های F2 و G2 در مقایسه با گروه شاهد بیش تر بود ($p < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: براساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، کنجاله سویای فرآوری شده در درجه حرارت ۹۰ درجه سلسیوس به عنوان نمونه مورد نظر جهت آزمایش ها درون تنی انتخاب شد. هم چنین اعمال حرارت ۹۰ درجه سلسیوس بر روی کنجاله سویا تأثیر چشمگیری بر محتوی بازدارنده تریپسین داشت و توانست محتوی این بازدارنده را به کم تر از حد مطلوب برای مصرف طیور برساند.

مقدمه

Parsons، گزارش کردند که فرآوری خوراک می‌تواند به افزایش قابلیت هضم، جذب مواد مغذی و سرعت رشد طیور کمک کند (۹). چندین مطالعه نشان داده است که جایگزینی جزئی یا کلی SBM با کنجاله سویای حرارت دیده باعث بهبود عملکرد رشد، فعالیت آنزیم گوارشی و مورفولوژی روده جوجه گوشتی می‌شود (۱۰). اکستروژن کردن با تخریب و حذف بازدارنده‌های غذایی، بهبود قابل توجهی در عملکرد و راندمان مصرف خوراک پرندگان تغذیه شده را سبب می‌شود. در مطالعه‌ای Mojarrad و همکاران، گزارش کردند که وزن نهایی جوجه‌های دریافت کننده سویای حرارت دیده ۱۰/۴۳ درصد بالاتر از جوجه‌های تغذیه شده با سویای خام بود. هم چنین ضریب تبدیل جوجه‌های دریافت کننده سویای حرارت دیده ۲۰/۳۰ درصد کم تر از گروه شاهد بود. این محققان کاهش ترکیبات ضد مغذی و بهبود انرژی قابل هضم را طی فرآوری سویا، دلیل بهبود عملکرد عنوان نمودند (۱۱). هم چنین Jahanian و Rasouli، گزارش نمودند که جایگزینی کامل کنجاله سویای جیره با کنجاله اکستروژن شده، باعث بهبود عملکرد رشد شد. این محققین در آزمایش دیگر خود توانستند میزان پروتئین جیره را با استفاده از کنجاله سویای اکستروژن شده تا ۹ درصد کاهش دهند، بدون آن که تأثیر منفی بر مولفه‌های عملکردی ایجاد شود (۱۲). بر اساس بررسی‌های انجام شده به نظر می‌رسد مطالعات بسیار اندکی در ارتباط با اثر منابع پروتئینی بر بیان ژن PRSS1 در طیور وجود دارد. در مطالعات مختلف با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی گزارش شده است که مسئول بیان تریپسینوژن است که در دئودنوم تبدیل به فرم فعال تریپسین شده و فعالیت پروتئازی خود را آغاز می‌کند. هم چنین به نظر می‌رسد فرآوری منابع سویا در جیره طیور بر میزان بیان ژن تریپسینوژن اثر مستقیمی داشته باشد؛ بنابراین، هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر سطوح مختلف کنجاله سویای فرآوری شده بر بیان ژن PRSS1 در جوجه‌های گوشتی بود.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول: اکستروژن کردن دانه‌های کامل سویا: برای این منظور مطالعه تأثیر عامل پخت و اکستروژن کردن بر خصوصیات کیفی کنجاله سویای متداول، نمونه‌هایی از یک محموله یکنواخت تهیه و تیمارهای مختلف حرارتی با استفاده از دیگ پخت (LK 1605-2, Amandus Kahl GmbH & Co. KG, Reinbeck, Germany) بر روی آن اعمال شد. تیمارهای آزمایشی شامل: گروه اول: دمای خروجی از دیگ پخت صفر درجه سلسیوس، گروه دوم: دمای خروجی از دیگ پخت ۶۰ درجه سلسیوس، گروه سوم: دمای خروجی از دیگ پخت ۷۵ درجه سلسیوس و گروه چهارم: دمای خروجی از دیگ پخت ۹۰ درجه سلسیوس بودند. پس از مرحله پخت،

جوجه‌های گوشتی برای به حداکثر رساندن رشد، نیاز به سطوح بالای پروتئین خام و اسیدهای آمینه دارند. بنابراین وجود یک منبع پروتئینی با محتوای بالای اسیدهای آمینه از اهمیت فراوانی در خوراک آن‌ها برخوردار است، منابع مختلفی جهت تأمین پروتئین و اسیدهای آمینه مورد نیاز پرندگان مطرح شده و استفاده می‌شود که یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین این منابع، کنجاله سویا است. کنجاله سویا محصول جانبی استخراج روغن از دانه سویا، متداول‌ترین منبع پروتئین گیاهی در صنایع خوراک طیور است. از لحاظ میزان پروتئین خام و ترکیب اسیدهای آمینه نیز کنجاله سویا شرایط مناسبی را برای تغذیه طیور دارا می‌باشد. به عبارتی، الگوی اسیدهای آمینه موجود در پروتئین کنجاله سویا از انطباق بالایی با الگوی آمینواسیدی محصولات طیور برخوردار است (۱). از سوی دیگر، اگرچه سویا به عنوان یک منبع پروتئینی در نظر گرفته می‌شود، اما این محصول حاوی مقادیر بالای انرژی نیز می‌باشد. به گونه‌ای که غلظت انرژی متابولیسمی کنجاله سویا ۱۱ تا ۲۵ درصد بیش تر از سایر کنجاله‌های دانه‌های روغنی می‌باشد که این اختلاف ناشی از محتوای کم تر فیبر این ترکیب است (۲). هم چنین انواع مختلفی از عوامل ضد تغذیه‌ای در کنجاله سویا وجود دارند که در فرآیندهای عادی هضم و جذب اختلال ایجاد می‌کنند و تأثیرات منفی بر سلامت حیوانات دارند (۳). علاوه بر این موارد، سویا حاوی غلظت‌های بالاتر کربوهیدرات‌ها می‌باشد که عمدتاً از الیگوساکاریدها و پلی ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای تشکیل شده است (۴) وجود فاکتورهای ضد تغذیه‌ای در سویا سبب بروز مشکل‌های مختلفی نظیر هایپرپلازی پانکراس، ایجاد تغییرات در بافت روده، اختلال در سیستم ایمنی سلولی و هومورال، سندروم نشت روده‌ای و جراحات کبدی و کلیوی و در نهایت تأخیر رشد می‌شود (۵). هم چنین محتوای مواد ضد تغذیه‌ای کنجاله سویا ممکن است روی خصوصیات روده کوچک تأثیر بگذارد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی به ویژه در مرحله آغازین را کاهش دهد (۶). از طرف دیگر بازدارنده‌های پروتئازی موجود در کنجاله سویا نسبت به حرارات ناپایدار بوده و در اثر حرارت دادن دانه، فعالیت آن‌ها به راحتی از بین می‌رود. دامنه تخریب فعالیت بازدارنده تریپسین، به دما، زمان اعمال حرارت، اندازه ذرات و میزان رطوبت کنجاله سویا بستگی دارد (۱). هم چنین، روش‌های مختلف پردازش خوراک، به ویژه ترکیبی از گرما و فشار، فعالیت مهارکننده تریپسین را کاهش می‌دهد و بنابراین ارزش غذایی مواد خوراکی مربوطه را افزایش می‌دهد (۷). یکی از عملیات حرارتی موثر جهت حذف مهارکننده‌های تریپسین، سیستم اکستروژن شامل دمای بالا و فشار زیاد برای مدت زمان کوتاه است (۸). در مطالعه‌ای Batal و

شدند. جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف کنجاله سویای فرآوری شده بودند و هر گروه یکی از تیمارهای آزمایشی را دریافت کرد. جیره‌ها براساس احتیاجات غذایی سویه راس ۳۰۸ و با نرم‌افزار AminoFeed فرموله شدند (۱۵). همه جیره‌ها از نظر انرژی و پروتئین مشابه بوده و آب و غذا به صورت آزاد در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت. جوجه‌ها با جیره‌های آزمایشی از سن ۱ تا ۴۲ روزگی طی ۲ دوره آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی) تغذیه شدند. گروه‌های آزمایشی شامل: گروه شاهد (C) که جیره پایه حاوی ذرت و کنجاله سویای متداول را دریافت کرده و جیره غذایی آن‌ها فاقد کنجاله سویای فرآوری شده بود. گروه S1 که جیره حاوی ۲/۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده به صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول را در دوره آغازین دریافت کردند. گروه G1 که جیره حاوی ۲/۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده را به صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول در دوره رشد دریافت کردند. گروه F1 که جیره حاوی ۲/۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده را به صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول در کل دوره پرورش (آغازین و رشد) دریافت کردند. گروه S2 که جیره حاوی ۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده به صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول در دوره آغازین دریافت کردند. گروه G2 که جیره حاوی ۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده به صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول در دوره رشد دریافت کردند. گروه F2 که جیره حاوی ۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده به صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول در کل دوره پرورش (آغازین و رشد) دریافت کردند. تهویه سالن آزمایش با استفاده از ۲ هواکش انجام می‌گرفت. برای روشنایی سالن‌ها، از لامپ‌های ۶۰ وات استفاده گردید که از طول و عرض، ۳ متر با یکدیگر فاصله داشتند. برای گرمایش سالن، از یک جت هیتر استفاده شد و دمای سالن تحقیقاتی با استفاده از یک ترموستات و دو دماسنج، مورد کنترل دقیق قرار گرفت. درجه حرارت سالن در هفته اول پرورش در حدود ۳۲ درجه سلسیوس تنظیم گردید و به تدریج دما تا ۲۴-۲۳ درجه سلسیوس کاهش داده شد. رطوبت سالن نیز در دوره پرورش حدود ۶۵-۵۵ درصد بود. در ۳ روز اول ورود جوجه‌ها، نور دائم و از روز چهارم به بعد در طول شبانه روز، ۲۳ ساعت روشنایی و ۱ ساعت تاریکی اعمال شد. به علاوه در بدو ورود جوجه‌ها آب حاوی مکمل معدنی و ویتامینی در دسترس آن‌ها قرار داده شد. ترکیب جیره‌های غذایی در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. جیره‌های آزمایشی در هر یک از مراحل پرورش از لحاظ کلیه مواد مغذی مشابه بودند. قبل از تنظیم جیره‌های آزمایشی، کلیه مواد خوراکی اصلی، از لحاظ ترکیب شیمیایی پایه، شامل ماده خشک، خاکستر، پروتئین خام، چربی خام و فیبر خام مورد آنالیز قرار گرفتند و در تنظیم جیره‌های آزمایشی، از اعداد حاصله که شاخص دقیق‌تری از مواد خوراکی موجود در جیره غذایی بودند، استفاده گردید.

فرآیند اکستروژن کردن در دمای 150 ± 2 درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه با استفاده از اکسترودر (Amandus Kahl, Expander, OEE) (32, GmbH & Co., KG, Germany) ۴۵۰ rpm تک محور با سرعت ۱۰ سانتی متر انجام شد. مرحله آخر نیز شامل خشک کردن و آسیاب نمودن کنجاله سویا بود.

آنالیز کیفی کنجاله سویای متداول و کنجاله سویای فرآوری شده
محتوی بازدارنده تریپسین: به منظور تعیین محتوی بازدارنده تریپسین، کنجاله سویای متداول و فرآوری شده با استفاده از آسیاب به ذراتی با قطر ۰/۲ mm تبدیل شد. سپس چربی نمونه‌ها با استفاده از اتر به طور کامل حذف گردیده و محتوی بازدارنده تریپسین با استفاده از هیدروکسید سدیم ۰/۱ مولار و در pH بین ۸/۴-۱۰ به مدت ۳ ساعت در دمای محیط استخراج گردید. بازدارنده تریپسین با استفاده از α -N-بنزوئیل-DL-آرژینین-p-نیتروآنالید به عنوان سوبسترای اصلی اندازه‌گیری گردید (۱۳).

شاخص اوره‌آز: به منظور ارزیابی شاخص فعالیت اوره‌آز ابتدا محلول‌های بافر اوره و بافر فسفات تهیه شده و pH هر دو بافر در ۷ تنظیم گردید. بعد از تهیه محلول‌های بافر، ۰/۲ گرم از نمونه‌ها به داخل لوله تست ریخته و ۱۰ میلی لیتر از محلول بافر اوره به آن اضافه گردید. این محلول به نام نمونه تست شناخته می‌شود. بعد از ۵ دقیقه ۰/۲ گرم از نمونه‌ها به داخل لوله دیگری ریخته و ۱۰ میلی لیتر از محلول بافر فسفات به آن اضافه شد. این محلول‌ها، به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری (۳۰ درجه سلسیوس) قرار داده شده و اختلاف بین pH محلول بافر فسفات و اوره اندازه‌گیری شده و به عنوان شاخص فعالیت اوره‌آز محاسبه می‌گردد (۱۴).

شاخص تفرق پروتئین: در این آزمایش، ۲۰ گرم از نمونه‌های سویای اکستروژن شده در ۱۵۰ میلی لیتر آب مخلوط شده و به اندازه ۱۰ دقیقه با دور بالای مخلوط کن (۸۵۰۰ دور در دقیقه) مخلوط شدند. بعد از این مرحله، مایع فوقانی موجود در بشر فیلترشده و نیترژن این مایع (معرف پروتئین محلول) از طریق روش کج‌لدال تعیین و در ۶/۲۵ ضرب شد تا میزان پروتئین خام به دست آید. میزان پروتئین خام نمونه سویای اولیه را نیز از طریق روش کج‌لدال به دست آورده و از تقسیم پروتئین خام محلول فیلتر شده به پروتئین خام کنجاله سویای اولیه، شاخص تفرق پروتئین به دست آمد. براساس نتایج حاصله، کنجاله سویای فرآوری شده در درجه حرارت ۹۰ درجه سلسیوس به عنوان نمونه مورد نظر جهت آزمایش‌ها in vivo انتخاب و اثر سطوح مختلف کنجاله سویا بر بیان ژن PRSS1 در جوجه‌های گوشتی با استفاده از این نمونه انجام گردید.

آزمایش دوم: اثر سطوح مختلف کنجاله سویا بر بیان ژن PRSS1
گروه‌های آزمایشی: تعداد ۵۶۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ وزن‌کشی شده و به صورت تصادفی به ۷ گروه آزمایشی با ۴ تکرار تقسیم شدند، به طوری که هر تکرار شامل ۲۰ قطعه جوجه بود. هر تکرار در پن‌هایی در ابعاد ۱×۲ و بر روی بستر کاه گندم جا داده

جدول ۱: ترکیب جیره پایه مورد استفاده در دوره آغازین (۲۱-۱ روزگی)

اجزای خوراک (%)	C	S1	G1	F1	S2	G2	F2
ذرت	۵۵/۳۰	۵۵/۳۰	۵۵/۳۰	۵۵/۳۰	۵۵/۳۰	۵۵/۳۰	۵۵/۳۰
سویا	۳۹	۳۶/۵	۳۹	۳۶/۵	۳۴	۳۹	۳۴
دایجستا	۰	۲/۵	۰	۲/۵	۵	۰	۵
روغن گیاهی	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷
دی ال متیونین	۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۶	۰/۲۶
ال لایزین	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
ال ترئونین	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳
دی کلسیم فسفات	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۱/۹
کربنات کلسیم	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷
نمک	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲
جوش شیرین	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۲۴
مکمل ویتامینه و معدنی	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
کولین کلراید	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵
آنالیز خوراک مصرفی							
انرژی متابولیسمی (kcal/kg)	۲۹۰۰	۲۹۰۰	۲۹۰۰	۲۹۰۰	۲۹۰۰	۲۹۰۰	۲۹۰۰
پروتئین (%)	۲۲	۲۲	۲۲	۲۲	۲۲	۲۲	۲۲
لایزین (%)	۱/۲۶۷	۱/۲۶۷	۱/۲۶۷	۱/۲۶۷	۱/۲۶۷	۱/۲۶۷	۱/۲۶۷
متیونین (%)	۰/۵۸۵	۰/۵۸۵	۰/۵۸۵	۰/۵۸۵	۰/۵۸۵	۰/۵۸۵	۰/۵۸۵
متیونین+سیستین (%)	۰/۹۲۳	۰/۹۲۳	۰/۹۲۳	۰/۹۲۳	۰/۹۲۳	۰/۹۲۳	۰/۹۲۳
ترئونین (%)	۰/۸۵۶	۰/۸۵۶	۰/۸۵۶	۰/۸۵۶	۰/۸۵۶	۰/۸۵۶	۰/۸۵۶
کلسیم (%)	۰/۸۹۴	۰/۸۹۴	۰/۸۹۴	۰/۸۹۴	۰/۸۹۴	۰/۸۹۴	۰/۸۹۴
فسفر (%)	۰/۴۴۷	۰/۴۴۷	۰/۴۴۷	۰/۴۴۷	۰/۴۴۷	۰/۴۴۷	۰/۴۴۷

* پرمیکس ویتامین تأمین شده به ازای هر کیلوگرم حاوی ۴۴۰۰۰۰ واحد ویتامین A، ۱۸۰۰۰۰۰ واحد ویتامین D3، ۲۶۰۰۰ واحد ویتامین E، ۱۲۰۰ میلی گرم ویتامین K، ۶/۸ میلی گرم کوپالامین، ۱۰۰۰ میلی گرم تیامین، ۲۶۰۰ میلی گرم ریبوفلاوین، ۷۲۰۰ میلی گرم اسید پانتوتنیک، ۲۴۰۰۰ میلی گرم نیاسین، ۱۲۸۰ میلی گرم پیریدوکسین، ۸۰ میلی گرم بیوتین، ۷۶۰ میلی گرم اسید فولیک و پرمیکس مینرال تأمین شده به ازای هر کیلوگرم حاوی ۴۸۰۰۰ میلی گرم منگنز، ۸۰۰۰ میلی گرم آهن، ۶۴۰۰ میلی گرم مس، ۵۰۰ میلی گرم ید، ۱۲۰ میلی گرم سلنیوم و ۴۴۰۰۰ میلی گرم روی

جدول ۲: ترکیب جیره پایه مورد استفاده در دوره رشد (۲۲-۴۲ روزگی)

اجزای خوراک (%)	C	S1	G1	F1	S2	G2	F2
ذرت	۶۵/۵	۶۵/۵	۶۵/۵	۶۵/۵	۶۵/۵	۶۵/۵	۶۵/۵
سویا	۲۹	۲۹	۲۶/۵	۲۶/۵	۲۹	۲۴	۲۴
دایجستا	۰	۰	۲/۵	۲/۵	۰	۵	۵
روغن گیاهی	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۱/۹
دی ال متیونین	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲
ال لایزین	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴
ال ترئونین	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۰۴
دی کلسیم فسفات	۱/۶	۱/۶	۱/۶	۱/۶	۱/۶	۱/۶	۱/۶
کربنات کلسیم	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰/۶
نمک	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
جوش شیرین	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل ویتامینه و معدنی	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
کولین کلراید	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵
آنالیز خوراک مصرفی							
انرژی متابولیسمی (kcal/kg)	۳۰۰۰	۳۰۰۰	۳۰۰۰	۳۰۰۰	۳۰۰۰	۳۰۰۰	۳۰۰۰
پروتئین (%)	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸
لایزین (%)	۱/۰۳	۱/۰۳	۱/۰۳	۱/۰۳	۱/۰۳	۱/۰۳	۱/۰۳
متیونین (%)	۰/۴۹۲	۰/۴۹۲	۰/۴۹۲	۰/۴۹۲	۰/۴۹۲	۰/۴۹۲	۰/۴۹۲
متیونین+سیستین (%)	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۷۸
ترئونین (%)	۰/۷۱۷	۰/۷۱۷	۰/۷۱۷	۰/۷۱۷	۰/۷۱۷	۰/۷۱۷	۰/۷۱۷
کلسیم (%)	۰/۷۵۷	۰/۷۵۷	۰/۷۵۷	۰/۷۵۷	۰/۷۵۷	۰/۷۵۷	۰/۷۵۷
فسفر (%)	۰/۳۷۸	۰/۳۷۸	۰/۳۷۸	۰/۳۷۸	۰/۳۷۸	۰/۳۷۸	۰/۳۷۸

* پرمیکس ویتامین تأمین شده به ازای هر کیلوگرم حاوی ۴۴۰۰۰۰ واحد ویتامین A، ۱۸۰۰۰۰۰ واحد ویتامین D3، ۲۶۰۰۰ واحد ویتامین E، ۱۲۰۰ میلی گرم ویتامین K، ۶/۸ میلی گرم کوپالامین، ۱۰۰۰ میلی گرم تیامین، ۲۶۰۰ میلی گرم ریبوفلاوین، ۷۲۰۰ میلی گرم اسید پانتوتنیک، ۲۴۰۰۰ میلی گرم نیاسین، ۱۲۸۰ میلی گرم پیریدوکسین، ۸۰ میلی گرم بیوتین، ۷۶۰ میلی گرم اسید فولیک و پرمیکس مینرال تأمین شده به ازای هر کیلوگرم حاوی ۴۸۰۰۰ میلی گرم منگنز، ۸۰۰۰ میلی گرم آهن، ۶۴۰۰ میلی گرم مس، ۵۰۰ میلی گرم ید، ۱۲۰ میلی گرم سلنیوم و ۴۴۰۰۰ میلی گرم روی

برنامه واکسیناسیون با توجه به توصیه دامپزشک و آلوده بودن منطقه پرورش اجرا شد (جدول ۳).

جدول ۳: برنامه واکسیناسیون جوجه‌های گوشتی در دوره پرورش

نوع واکسن	سن تجویز	روش واکسیناسیون
نیوکاسل B1	۷ روزگی	آشامیدنی
برونشیت	۱۱ روزگی	آشامیدنی
گامبرو	۱۲ روزگی	آشامیدنی
نیوکاسل	۱۵ روزگی	آشامیدنی
گامبرو	۲۰ روزگی	آشامیدنی
نیوکاسل	۲۳ روزگی	آشامیدنی

پرندگان بعد از سن ۲۳ روزگی هیچ‌گونه واکسنی دریافت نکردند. جهت مصرف بهتر واکسن‌های آشامیدنی حدود دو ساعت قبل از تجویز آن‌ها، آب آشامیدنی جوجه‌ها قطع می‌شد و سپس محلول واکسن و آب در اختیار جوجه‌ها قرار می‌گرفت. به مدت ۱۲ ساعت قبل و بعد از هر واکسیناسیون نیز محلول مولتی اسید آمینه به آب آشامیدنی اضافه می‌شد.

بیان ژن آنزیم PRSS1 در بافت پانکراس: در این پژوهش، بیان

ژن تریپسین در پایان دوره پرورش اندازه‌گیری شد. به منظور نرمال کردن داده‌های مربوط به ژن هدف، بتا اکتین (ACTB) به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد. انتخاب این ژن به آن دلیل بود که مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که بیان این ژن در شرایط مختلف محیطی ثابت است (۱۶). همان‌طور که از معنی واژه مشخص است، مفهوم Real-time PCR مشاهده لحظه به لحظه یک فرآیند می‌باشد. در این سیستم تشخیصی، یک ماده فلوروسنت در طی واکنش، متناسب با میزان محصولات هر سیکل، آزاد شده و نهایتاً میزان فلوروسنت آن توسط یک آشکارساز شناسایی و ثبت می‌شود (۱۷). به منظور بررسی بیان ژن در بافت پانکراس در پایان دوره آزمایش، قطعه‌های کوچکی از مکان مشخص در بافت پانکراس هر جوجه (به منظور همسان بودن محل نمونه‌برداری) توسط تیغ سترون (استریل) شده، جدا شده و به در محلول RNA Later ساخت شرکت کیاژن GmbH، آلمان قرار گرفت. بعد از خروج بافت هر نمونه، به سرعت درون لوله‌های میکرو فیوژ محتوی ۵۰۰ میکرولیتر محلول RNA Later قرار گرفت. بعد از اتمام نمونه‌برداری از حیوانات، با رعایت نکات مربوط به دما و زمان نگهداری نمونه‌ها، به آزمایشگاه فرستاده شده و در دمای -80°C تا

هنگام انجام آزمایش RT-PCR و اندازه‌گیری بیان ژن تریپسین نگهداری شدند. برای استخراج RNA قطعه‌های کوچکی از بافت پانکراس هر جوجه توسط تیغ سترون (استریل) شده، جدا شده و به سرعت درون تانک نیتروژن مایع قرار داده شد. استخراج RNA کل از ۱۰۰ میلی گرم بافت پانکراس و بنا بر دستور کار کیت ترایزول شرکت سینا ژن صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و دستگاه طیف سنج نوری (اسپکتوفوتومتر) ارزیابی شد. برای ساخت (سنتر) cDNA از مستر میکس لیوفیلیزه بایونیر- کره جنوبی استفاده شد. بدین منظور میزان ۱۰ پیکومول آغازگر تصادفی هگزامر به همراه ۲ میکرولیتر RNA استخراج به میکروتوب‌های حاوی مسترمیکس اضافه شد و در نهایت حجم نهایی مواد افزوده شده به میکروتوب‌ها توسط آب RNase free به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از تهیه مخلوط کامل، ساخت cDNA در شرایط دمای ۱۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه و دمای ۹۰ درجه سلسیوس برای پنج دقیقه قرار گرفت. پس از ساخت، cDNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. هم چنین کیفیت cDNA ساخته شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد. برای بررسی بیان ژن هدف و مرجع از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد که ویژگی‌های آن‌ها در جدول زیر آمده است. در روش تعیین کمی بیان ژن تصحیح تغییر آزمایشی ضروری است. برای این منظور، از یک ژن کنترل داخلی، β -actin در سن ۴۲ روزگی استفاده شد. برای واکنش Real time-PCR از مسترمیکس Q-RT-PCR شرکت سیناژن استفاده شد. برای هر نمونه در هر تیوپ چهار میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین، یک میکرولیتر از هر آغازگر رفت با غلظت پنج پیکومول، یک میکرولیتر cDNA ساخت شده و سه میکرولیتر آب DNase free اضافه شد که در کل حجم نهایی هر ریزلوله به ده میکرولیتر رسید. برای هر نمونه نیز دو ریزلوله به منظور دو تکرار در نظر گرفته شد. برنامه گرمایی استفاده شده در واکنش Real Time PCR برای ژن‌های β -actin و تریپسین شامل دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۳۱ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس با ۴۰ چرخه و در مرحله جداسازی نهایی در شرایط دمایی ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه بود.

جدول ۴: توالی، شماره دسترسی و جایگاه آغازگرهای مرتبط با ژن PRSS1 و β -Actin

Size bp	Sequence	GeneBankID	Primer
241	5'-CAGTGATGAGGATGATGACA-3' 5'-GTGACGGATGACTTTAGATG-3'	GGU15155	PRSS1
139	5'-CTGTGCCATCTATGAAGGCTA-3' 5'-ATTCTCTCTCGGCTGTGGTG-3'	NM 205518	β -Actin

تجزیه و تحلیل آماری: در بخش اول، نتایج حاصل از بخش

آزمایشگاهی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۵ تکرار برای هر تیمار اجرا گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (1-Way ANOVA) نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه واریانس قرار گرفت. از اختلاف سیکل آستانه (ژن Ct) مورد نظر با ژن کنترل داخلی یا اصطلاحاً خانه‌گردان، میزان بیان نسبی ژن مورد نظر از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ حاصل شد. داده‌های بیان ژن نیز با استفاده از روش AVOVA و آزمون t دو طرفه انجام شد. هم‌چنین در بخش مزرعه‌ای، آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۷ تیمار (۷ نوع جیره)، ۴ تکرار برای هر تیمار و ۲۰ قطعه پرند در هر تکرار اجرا گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از مدل زیر، تجزیه و تحلیل شدند:

$$X_{ij} = \mu + \tau_j + \varepsilon_{ij}$$

که X_{ij} مقدار مشاهدات (اثر j مین تیمار بر i مین پن)، μ میانگین جامعه، τ_j اثر تیمار jام، ε_{ij} اثر خطای آزمایشی می‌باشد. از آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف آزمایشی استفاده گردید. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

پارامترهای کیفی کنجاله سویا: نتایج مربوط به ارزیابی

پارامترهای کیفی کنجاله سویای حرارت دیده در جدول ۵ ارائه شده است. براساس این نتایج، حرارت دادن کنجاله سویا منجر به کاهش تمامی شاخص‌های کیفی مورد ارزیابی گردید ($P < 0.01$). همان‌گونه که انتظار می‌رفت، کاهش شاخص‌های کیفی با پخت در دمای ۶۰ و ۷۵ درجه سلسیوس چشمگیر نبود، ولیکن با افزایش دما به ۹۰ درجه سلسیوس شاخص‌های مورد ارزیابی به شدت کاهش یافت به طوری

جدول ۵: تأثیر تیمارهای حرارتی مختلف بر فراسنجه‌ها کیفی کنجاله سویا

تیمارهای حرارتی	فعالیت اوره‌آز (ΔpHunits)	حلالیت در پتاس (%)	شاخص تفرق پروتئین (%)	بازدارنده تریپسین (mg/kg)
T0 (گروه شاهد، بدون پخت)	۰/۲۳a	۷۸/۰۵a	۳۰/۵۴a	۳/۷۵a
T1 (پخت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس)	۰/۱۶b	۷۵/۲۷b	۳۰/۸۰a	۲/۲۷b
T2 (پخت در دمای ۷۵ درجه سلسیوس)	۰/۰۹c	۷۴/۶۰b	۲۶/۲۳b	۱/۰۷c
T3 (پخت در دمای ۹۰ درجه سلسیوس)	۰/۰۱d	۶۷/۵۷c	۱۸/۶۹c	۱/۰۵c
SEM	۰/۰۲	۱/۰۳	۱/۳۶	۰/۲۹
P-Value	***	***	***	***

abc در هر ستون میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P < 0.05$). T0: گروه شاهد، T1: پخت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس، T2: پخت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس، T3: پخت در دمای ۹۰ درجه سلسیوس

تغییرات بیان ژن PRSS1: نتایج این آزمایش نشان داد که

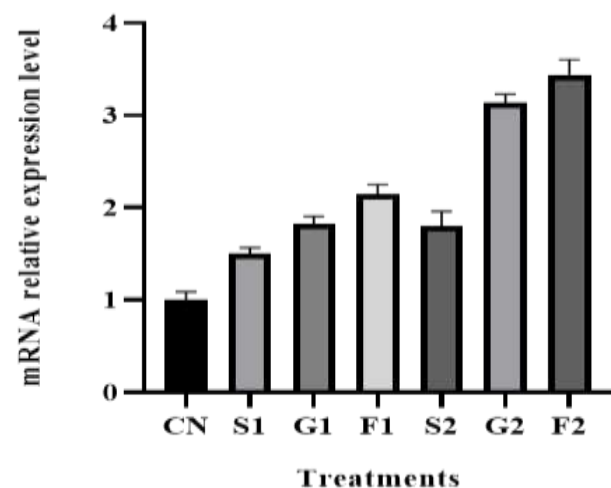
سطوح مختلف کنجاله سویای فرآوری شده، بیان ژن PRSS1 را به

که تفاوت معنی‌داری در این شاخص‌ها در مقایسه با تیمار T1 و T2 مشاهده گردید. به‌طور کلی فرآیند پخت کنجاله سویا منجر به کاهش ۲۵۷ درصدی در محتوی بازدارنده تریپسین، کاهش ۲۳ برابری فعالیت اوره‌آز، کاهش ۱۵ درصدی در میزان حلالیت در پتاس و کاهش ۶۳ درصدی شاخص تفرق پروتئین در تیمار T3 در مقایسه با کنجاله سویا حرارت ندیده شد ($P < 0.01$). از طرفی، روند کاهش شاخص‌های کیفی در این آزمایش وابسته به درجه حرارت اعمال شده بر روی کنجاله سویا بود. به‌گونه‌ای که با افزایش درجه حرارت پخت، میزان کاهش شاخص‌های کیفی افزایش یافت. هم‌چنین برای تمامی پارامترهای مورد ارزیابی، بالاترین شاخص‌ها در کنجاله سویای خام مشاهده شد (جدول ۵). نتایج آزمایشگاهی نشان داد شاخص تفرق پروتئین و فعالیت اوره‌آز در کنجاله سویا خام (T0) بالاترین و در کنجاله سویا حرارت دیده در دمای ۹۰ درجه سلسیوس (T3) پایین‌ترین بود. به‌طور کلی آزمون فعالیت اوره‌آز یکی از روش‌های مطمئن برای تعیین کیفیت سویای حرارت دیده می‌باشد (۱۸). در واقع در این روش، فعالیت بازدارنده تریپسین در سویا به‌طور غیرمستقیم اندازه‌گیری می‌شود. این تست که میزان تغییرات pH حاصل از تبدیل اوره به آمونیاک را نشان می‌دهد، شاخص‌ای غیرمستقیم برای ارزیابی سطح بازدارنده‌های تریپسین و سایر ضدغذی‌ها در سویا بعد از فرآوری است. شاخص فعالیت اوره‌آز در سویایی که خوب فرآوری شده باشد بین ۰/۰۵ تا ۰/۲ می‌باشد و شاخص فعالیت اوره‌آز بیش از ۰/۲ می‌تواند رشد جوجه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. اوره‌آز تنها برای تشخیص سویایی استفاده می‌شود که حرارت ناکافی دیده باشد ولی برای دانه‌هایی که بیش از حد حرارت دیده‌اند، مناسب نیست (۱۹).

شکل چشمگیری در گروه‌های مصرف کننده سویای فرآوری شده در مقایسه با گروه سویای خام افزایش داد ($p < 0.05$). در گروه‌های

فعالیت اوره‌آز از ۲/۰۳ واحد در دانه خام به ترتیب به ۰/۱ و ۰/۰۵ در دانه‌های اکستروید شده در دماهای ۱۲۰، ۱۲۲ و ۱۴۰ درجه سلسیوس کاهش یافت (۲۰). میانگین این شاخص در پژوهش انجام شده توسط Mirghelenj و همکاران، برای دانه‌های سویایی که به مدت ۱۵ ثانیه در دماهای ۱۴۵، ۱۵۵ و ۱۶۵ درجه سلسیوس اکستروید شده بودند، به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۰۹ و ۰/۰۵ بود (۲۱). در مطالعه دیگری، محققان نمونه‌هایی از دانه سویا را در ۵ دمای ۱۱۵، ۱۲۵، ۱۳۵، ۱۴۵ و ۱۶۵ درجه سلسیوس اکستروید کردند شاخص فعالیت اوره‌آز را در آن‌ها به ترتیب ۲/۱۶، ۰/۴۳، ۰/۰۷۳، ۰/۰۳ و ۰/۰۲۸ گزارش کردند (۲۲). نتایج نشان می‌دهد که شاخص فعالیت اوره‌آز در پژوهش حاضر و آزمایش پالیک تفاوت اندکی دارد و این تفاوت‌های جزئی به دلیل تفاوت‌ها در مدت زمان اکستروید، واریته سویا و یا شرایط و خطاهای آزمایشگاه می‌باشد. در آزمایش Dragan و همکاران، اثر درجه حرارت‌های مختلف اکستروید خشک (۱۱۵، ۱۲۵، ۱۳۵، ۱۴۵ و ۱۶۵ درجه سلسیوس) بر روی فعالیت آنزیمی اوره‌آز مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که با افزایش درجه حرارت اکستروید خشک فعالیت آنزیمی اوره‌آز کاهش معنی‌دار (به ترتیب ۱/۸۷۶، ۰/۲۳۹، ۰/۰۶۹، ۰/۰۴۴ و ۰/۰۳۵) یافت. ولیکن دمای ۱۶۵ درجه سلسیوس برای اکستروید خشک سبب کاهش شدید افزایش وزن و بالا رفتن ضریب تبدیل خوراک در جوجه‌های گوشتی ۱۴ روزه شد. از نتایج فوق می‌توان نتیجه گرفت که کاهش فعالیت آنزیمی اوره‌آز و بازدارنده تریپسین به تنهایی جهت حصول اطمینان برای تأثیرگذاری فرآیند کافی نیست و راهکاری برای سنجش آسیب حرارتی احتمالی باید در نظر گرفته شود. چراکه حرارت بیش از حد، سبب توسعه واکنش میلارد و تشکیل کمپلکس‌های نامحلول پروتئین شده و قابلیت دسترسی پروتئین را در پرنده کاهش می‌دهد. یکی از روش‌های ارزیابی سویای فرآوری شده، شاخص تفرق پروتئین است که براساس حلالیت پروتئین‌های سویا در آب است که نمونه‌هایی از سویا در آب با دور بالا مخلوط شده و در نهایت، میزان پروتئین محلول تعیین می‌شود. حرارت‌دهی سویا منجر به تثبیت پروتئین و اتصال آن‌ها به یکدیگر می‌شود که در نهایت با کاهش میزان پروتئین محلول همراه است. در سایر مطالعات Batal و همکاران، نشان دادند که اتوکلاو کردن سویا منجر به کاهش PDI از ۸۹ درصد به ۷۹، ۴۵ و ۱۴ درصد به ترتیب در مدت زمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه می‌گردد (۹). نتایج این آزمایش نشان دادند که با افزایش دما در فرآیند حرارتی از میزان فعالیت بازدارنده تریپسین (TIA) به‌طور معنی‌داری کاهش یافته و این کاهش متناسب با درجه حرارت می‌باشد. به‌طور کلی بیش‌ترین میزان فعالیت بازدارنده تریپسین مربوط به کنجاله سویای تحت حرارت ۶۰ درجه سلسیوس بود که این مقدار تقریباً به کنجاله سویای متداول بسیار

مصرف کننده جیره حاوی ۲/۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده، گروه F1 در مقایسه با شاهد بیان بالاتری را نشان داد ($p < 0.05$). همچنین، سطح بیان ژن PRSS1 در گروه‌های F2 و G2 کنجاله سویای فرآوری شده حاوی ۵ درصد، در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت ($p < 0.05$). با این حال اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد با گروه‌های G1، S1 و S2 برای بیان ژن PRSS1 مشاهده نشد ($p > 0.05$) (شکل ۱).



شکل ۱: نمودار اثر سطوح مختلف کنجاله سویای فرآوری شده طی ۲ دوره آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و رشد (۲۲ تا ۴۲ روزگی) بر بیان ژن PRSS1

Cn: گروه کنترل که جیره پایه حاوی ذرت و کنجاله سویای متداول، S1: جیره حاوی ۲/۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده به‌صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول را در دوره آغازین دریافت کردند، G1: جیره حاوی ۲/۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده را به‌صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول در دوره رشد دریافت کردند، F1: جیره حاوی ۲/۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده را به‌صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول در کل دوره پرورش (آغازین و رشد) دریافت کردند، S2: جیره حاوی ۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده به‌صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول در دوره آغازین دریافت کردند، G2: جیره حاوی ۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده به‌صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول در دوره رشد دریافت کردند و F2: جیره حاوی ۵ درصد کنجاله سویای فرآوری شده به‌صورت جایگزینی با کنجاله سویای متداول در کل دوره پرورش (آغازین و رشد) دریافت کردند.

بحث

فعالیت آنزیمی اوره‌آز به‌عنوان یکی از پارامترهای تعیین کیفیت فرآیند حرارتی در صنعت همواره مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم حساس به حرارت بوده و در درجه حرارت‌های بین ۹۳-۱۲۱ درجه سلسیوس میزان آن به‌شدت کاهش می‌یابد (۱۸). نتایج آزمایش حاضر نشان داد که افزایش حرارت، فعالیت این آنزیم را تا نزدیک صفر کاهش داد. مطابق با این نتایج، در آزمایش Perilla و همکاران،

نزدیک بود (به ترتیب ۲/۲۷ در مقابل ۳/۷۵). با این وجود زمانی که حرارت ۷۵ و ۹۰ درجه سلسیوس بر کنجاله سویا اعمال گردید، TIA به میزان زیادی کاهش یافت. به طوری که محتوای آن از ۳/۷۵ در کنجاله سویای خام به ۱/۰۷ و ۱/۰۵ میلی گرم به ترتیب در تیمار پخته شده در دمای ۷۵ و ۹۰ درجه سلسیوس کاهش یافت و به صورت تقریبی بیش از ۷۰ درصد از بازدارنده موجود در کنجاله سویا حذف گردید. گزارش شده است که بازدارنده تریپسین به شدت به دما حساس بوده و قرارگیری آن در دمای بالا منجر به تخریب ساختار و کاهش فعالیت آن می شود (۲۴). هم چنین گزارش شده است که بازدارنده های پروتئازی موجود در سویا حاوی مقادیر بسیار بالایی سیستین می باشند، به طوری که در حدود ۳۰-۴۰ درصد از کل اسیدهای آمینه آن را سیستین تشکیل می دهد بنابراین به عنوان یک منبع سولفیدریل شناخته می شود (۲۵). با این وجود، بازدارنده تریپسین به شدت نسبت به دما حساس بوده و بیش از ۹۰ درصد آن از طریق حرارت تخریب می شود. غیرفعال سازی این آنزیم توسط حرارت منجر به تعویض گروه های سولفیدریل دی سولفید شده، بنابراین گروه های سولفیدریل برای واکنش با آنزیم در دسترس نمی باشد (۲۶). با توجه به آن که بازدارنده کونیتز دارای ۲ گروه دی سولفید می باشد، در مقایسه با بازدارنده بومن-برک که دارای ۷ گروه دی سولفیدی می باشد، به حرارت حساس تر است و به میزان بیش تری در برابر حرارت از بین می رود (۲۵). در همین مطالعه نشان داده شد که جهت تخریب ۹۰ درصد بازدارنده تریپسین موجود در سویا در درجه حرارت ۹۰ درجه سلسیوس به ۳۰ دقیقه زمان نیاز می باشد و در صورت افزایش حرارت به ۱۲۰ درجه سلسیوس، این زمان به ۵ دقیقه کاهش می یابد که مطابق با نتایج مطالعه کنونی می باشد که نشان داد حرارت کم تر از ۹۰ درجه سلسیوس تأثیر بسیار اندکی بر میزان کاهش بازدارنده تریپسین دارد. سایر مطالعات انجام شده نشان دادند که حرارت اعمال شده با تخریب ساختار این بازدارنده فعالیت آن را در کنجاله فرآیند شده کم می نماید. در آزمایش انجام شده توسط Clarke و Wiseman، اکستروود مرطوب دانه سویا در دمای ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۳۰ و ۱۶۰ درجه سلسیوس منجر به کاهش مقدار فعالیت بازدارنده تریپسین (به ترتیب به میزان ۱۴/۸، ۹/۶، ۴/۵ و ۱/۹ میلی گرم در هر کیلوگرم سویا) شد (۲۷). در مطالعه پیش رو اعمال حرارت ۹۰ درجه سلسیوس بر روی کنجاله سویا تأثیر چشمگیری بر محتوی بازدارنده تریپسین داشت و توانست محتوی این بازدارنده را به کم تر از حد مطلوب برای مصرف طیور برساند. یکی از مهم ترین دلایل تفاوت در این آزمایش با سایر مطالعات ناشی از تفاوت در ماده اولیه می باشد. به طوری که اغلب آزمایش ها انجام شده، تیمار بر روی دانه خام سویا انجام شده که محتوی بازدارنده تریپسین در آن بسیار بالا (بیش از ۷ mg/kg) است، در

حالی که در آزمایش کنونی، فرآوری بر روی کنجاله سویا انجام شده که متوسط میزان بازدارنده تریپسین در آن کم تر و در حدود ۵ mg/kg می باشد. یکی دیگر از دلایل تفاوت در نتایج ناشی از تفاوت در نوع فرآوری است. به طوری که در آزمایش کنونی پخت به همراه اکستروود مرطوب تأثیر بیش تری در حذف فاکتورهای غیرمغذی در مقایسه با هر یک از روش ها به تنهایی دارد. Erdaw و همکاران، جیره های غذایی حاوی مقادیر مختلفی از سویای خام و پروتئاز را بررسی کردند و دریافتند با افزایش سطح پروتئاز، آنزیم های گوارشی لوزالمعده از جمله تریپسین، کیموتریپسین و آنزیم های پروتئولیتیک بهبود یافته ولی قابلیت هضم ایلئال CP و AA با افزایش سویای خام کاهش می یابد (۲۸). هم چنین Yuan و همکاران، در بررسی اثرات مکمل پروتئاز اگزوزنوس بر عملکرد رشد، فعالیت تریپسین پانکراس و بیان mRNA تریپسین گزارش کردند، پس از ۴۲ روز مصرف مکمل، بیان mRNA تریپسین در لوزالمعده در گروه تیمار ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه شاهد به میزان قابل توجهی ۱۹/۵٪ کاهش می یابد. هم چنین، بعد از ۲۱ و ۴۲ روز تیمار با ۱۶۰ میلی گرم در کیلوگرم، سطح mRNA تریپسین پانکراس به میزان قابل توجهی ۶/۱۹٪ و ۳۷/۷٪ نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. آن ها نتیجه گرفتند که میزان پروتئاز در جیره غذایی به طور قابل توجهی بر فعالیت تریپسین و بیان mRNA آن در جوجه های گوشتی تأثیرگذار است که نشان می دهد وجود پروتئاز اگزوزنوس در روده بر ژن تریپسین در سطح رونویسی تأثیر می گذارد. از طرفی فعالیت تریپسین توسط سنتز زیموزن، فعال سازی زیموزن و غیرفعال سازی پروتئاز توسط مهارکننده ها تنظیم می شود. هم چنین، سنتز PRSS1 در سه سطح رونویسی، ترجمه و پس از ترجمه تنظیم می شود (۲۹). از آن جاکه پانکراس یک اندام قابل تطبیق است که مقدار و ترکیب ترشحات آن بسته به خوراک مصرفی تغییر می کند، بنابراین یکی از دلایل احتمالی این است که میزان رونویسی ژن تریپسین در پاسخ به TIA تغییر نمی کند، بلکه افزایش ترجمه mRNAهایی که از قبل در بافت های پانکراسی/پیلوری وجود دارد، افزایش دفع تریپسین در پاسخ به TIA را جبران می نماید (۳۰). از آن جاکه تریپسین پروتئین ها را در انتهای کربوکسیل باقیمانده های آرژنین و لیزین هیدرولیز می کند، به عنوان یک عامل فعال کننده موثر برای سایر پروتئینازهای سرین و متالوپروتئینازهای ماتریکس است. در طیور بیان ژن تریپسین افزون بر پانکراس در تیموس، طحال و کبد نیز صورت می گیرد (۳۱). بنابراین تریپسین به عنوان مولکول سیگنالینگ فعال کننده PARها می تواند در سایر بافت ها نیز ایفای نقش کند. طبق مطالعه Koshikawa و همکاران، فعالیت تریپسین در پانکراس، پوست، روده کوچک، مری، معده، مایع مغزی، طحال و کلیه بالاتر بود (۳۲). مطابق با نتایج ارائه شده در این آزمایش، در مطالعه Yuan

تاثیری ندارد (۳۴). بنابراین، به نظر می‌رسد غلظت پروتئاز در روده کوچک فوقانی از طریق سیستم بازخوردی منفی که در آن پروتئازهای فعال درون دوازدهه ترشح پانکراس را محدود می‌کنند، با ترشح لوزالمعده ارتباط نزدیکی دارد. هرچند کاهش فعالیت پروتئاز نیز ترشح لوزالمعده را تحریک می‌کند (۲۹). در بازخورد مثبت، پپتید کنترل‌گر توسط سلول‌های آسینار ترشح می‌شود و به‌طور مستقیم سلول‌های CCK را در روده کوچک تحریک می‌کند و پس از شروع ترشح لوزالمعده، آن را تقویت می‌کند. در بازخورد منفی، فاکتورهای آزادکننده CCK حساس به تریپسین توسط روده تولید شده و ترشح CCK را تحریک می‌کنند که تریپسین به‌طور موقت با بازدارنده ترکیب می‌شود (۳۴). در این راستا، در تیمارهای مطالعه حاضر سطح mRNA تریپسین نیز می‌تواند هم فعالیت تریپسین و هم مکانیسم کنترل بیان ژن را تا حدی منعکس کند. براساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، کنجاله سویای فرآوری شده در درجه حرارت ۹۰ درجه سلسیوس به‌عنوان نمونه مورد نظر جهت آزمایش‌ها *in vivo* انتخاب شد. هم‌چنین اعمال حرارت ۹۰ درجه سلسیوس بر روی کنجاله سویا تاثیر چشمگیری بر محتوی بازدارنده تریپسین داشت و توانست محتوی این بازدارنده را به کم‌تر از حد مطلوب برای مصرف طیور برساند و هم‌چنین سبب افزایش بیان ژن PRSS1 در جوجه‌های گوشتی شد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از شرکت سنا دام پارس که با تأمین سویای فرآوری شده انجام این مطالعه را حمایت کردند، تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Leeson, S. and Summers, J.D., 2005. Commercial poultry nutrition 3rd ed. Department of Animal and Poultry Science University of Guelph, Ontario, Canada.
2. McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A. and Wilkinson, R.G., 2010. Animal Nutrition. 7th ed. Prentice Hall Publishing, UK.
3. Shi, C., Zhang, Y., Yin, Y., Wang, C., Lu, Z., Wang, F., Feng, J. and Wang, Y., 2017. Amino acid and phosphorus digestibility of fermented corn-soybean meal mixed feed with *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* fed to pigs. *Journal of Animal Science*. 95(9): 3996-4004.
4. Zakaria, H.A. and Ata, M.R., 2020. Efficacy of soya protein concentrates on the performance and immunity of broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science*. 539 p.
5. Rada, V., Lichovnikova, M. and Safarik, I., 2017. The effect of soybean meal replacement with raw full-fat

و همکاران، تیمار با آنزیم NSP یا آنزیم NSP همراه با پروتئاز به‌طور قابل توجهی بیان mRNA تریپسین، لیپاز و آمیلاز را در جوجه‌های گوشتی تحت تأثیر قرار داد. این محققین گزارش کردند، پس از ۲۱ روز، بیان ژن تریپسین در بافت پانکراس ۵۳، ۵۵، ۵۱ و ۳۴ درصد در حیوانات تغذیه شده با آنزیم NSP و آنزیم NSP همراه با درصدهای ۴۰، ۸۰ یا ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم پروتئاز افزایش یافته است. هم‌چنین، پس از ۴۲ روز، در مقایسه با گروه شاهد، حیواناتی که آنزیم NSP یا آنزیم NSP همراه با ۴۰ یا ۸۰ میلی گرم در کیلوگرم پروتئاز دریافت کرده بودند افزایش سطح mRNA تریپسین پانکراس را نشان دادند. این محققان عنوان نمودند که عواملی مانند مقدار شیره گوارشی که توسط پانکراس، کبد و مخاط روده سنتز یا ترشح می‌شود و از طرفی افزایش فعالیت آنزیمی عملکرد هضم را تعیین می‌کنند (۲۶). از آن جاکه شیره پانکراس شامل انواع آنزیم‌هایی مانند آمیلاز لوزالمعده، تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز، لیپاز و کولیپاز می‌باشد که در شکستن و هضم مواد مغذی نقش داشته و همگی ارتباط مستقیمی با عملکرد هضم دارند. در مطالعه حاضر، مصرف کنجاله سویای فرآوری شده در گروه‌های G2 و F2 فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و پروتئاز را افزایش داد هر چند معنی‌دار نبود، که نشان می‌دهد کنجاله سویای فرآوری شده ممکن است در تنظیم بازخوردی پانکراس موثر باشد. هم‌چنین، سنتز آنزیم هضم لوزالمعده توسط یک ژن خاص در سلول‌های آسینار کنترل می‌شود (۲۹). پیش‌سازهای آنزیمی به‌صورت زیموژن در قسمت راسی سلول هر می‌آسینی‌های ترش‌خی ذخیره و سپس توسط دستگاه گلژی به بالای سلول منتقل می‌شوند و در واکوئل‌ها بسته‌بندی می‌شوند. سلول‌های آسینار توسط غشا پایه و الیاف رتیکولر احاطه شده‌اند و در پاسخ به یک سیگنال خارجی، سلول زیموژن را به داخل مجرای رابط ترشح می‌کنند (۳۳). در مطالعه حاضر، پس از ۴۲ روز، مصرف کنجاله سویای فرآوری شده (حاوی ۵ درصد) به‌طور قابل توجهی باعث افزایش سطح mRNA تریپسین لوزالمعده شد، اما مصرف کنجاله سویای فرآوری شده در دوره آغازین تفاوت معنی‌داری در بیان mRNA تریپسین پانکراس ایجاد نکرد. بنابراین می‌توان گفت، بیان اندوژنوس آنزیم گوارشی توسط سطح مواد مغذی در رژیم غذایی و در نهایت دریافت آن به‌عنوان سیگنال خارجی توسط سلول‌های آسینار تنظیم می‌شود (۲۹). جذب مواد مغذی در لومن روده، می‌تواند مستقیماً سلول‌های آسینار لوزالمعده را تحریک کنند، یا ممکن است به‌طور غیرمستقیم مسیرهای هورمونی و عصبی را فعال و ترشحات برون ریز را تنظیم کنند. تزریق داخل‌وریدی اسیدهای آمینه نیز، میزان ترشح تریپسین و کیموتریپسین را افزایش می‌دهد که منجر به تحریک سنتز آنزیم‌های جدید برای هضم از لوزالمعده می‌شود، اما بر میزان لیپاز یا آمیلاز

21. Mirghelenj, S.A., Golian, A. and Kermanshahi, H., 2012. Determination of Processing Quality Tests of Full Fat Soybean Extruded at Three Temperatures and Correlation with Growth. *Iranian Journal of Animal Science Research*. 4(3): 209-215. (In Persian)
22. Palić, D., Modika, K.Y., Oelofse, A., Morey, L. and Coetzee, S.E., 2011. The protein dispersibility index in the quality control of heat-treated full-fat soybeans: an inter-laboratory study. *South African Journal of Animal Science*. 41(4): 413-419.
23. Dragan, O.M., Palić, D.V., Lević, J.D. and Sredanović, S.A., 2008. Quality control of full-fat soybean using urease activity: critical assessment of the method. *Acta Periodica Technologica*. (39): 47-53.
24. Varga-Visi, É., Albert, C., Lóki, K. and Csapó, J., 2009. Evaluation of the inactivation of heat sensitive antinutritive factors in fullfat soybean. *Acta Universitatis Sapientiae Alimentaria*. 2: 111-117.
25. Kwock, K.C. and Niranjan, K., 1995. Effect of thermal processing on soymilk. *International journal of food science & technology*. 30(3): 263-295.
26. van den Hout, R., Pouw, M., Gruppen, H. and van't Riet, K., 1998. Inactivation kinetics study of the kunitz soybean trypsin inhibitor and the bowman-birk inhibitor. *Journal of agricultural and food chemistry*. 46(1): 281-285.
27. Clarke, E. and Wiseman, J., 2007. Effects of extrusion conditions on trypsin inhibitor activity of full fat soybeans and subsequent effects on their nutritional value for young broilers. *British poultry science*. 48(6): 703-712.
28. Erdaw, M.M., Perez-Maldonado, R.A. and Iji, P.A., 2017. Apparent and standardized ileal nutrient digestibility of broiler diets containing varying levels of raw full-fat soybean and microbial protease. *Journal of Animal Science and Technology*. 59(1): 1-1.
29. Yuan, L., Wang, S.Q., Wang, Z.X., Zhu, H. and Huang, K., 2015. Effects of exogenous protease supplementation on endogenous trypsin activity and gene expression in broilers. *Genetics and Molecular Research*. 14(4): 13633-13641.
30. Lilleeng, E., Froystad, M.K., Ostby, G.C., Valen, E.C. and Krogdahl, A., 2007. Effects of diets containing soybean meal on trypsin mRNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 147(1): 25-36.
31. Wang, K., Gan, L., Lee, I. and Hood, L., 1995. Isolation and characterization of the chicken trypsinogen gene family. *Biochemical Journal*. 307(2): 471-479.
32. Koshikawa, N., Hasegawa, S., Nagashima, Y., Mitsuhashi, K., Tsubota, Y., Miyata, S., Miyagi, Y., Yasumitsu, H. and Miyazaki, K., 1998. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse. *The American journal of pathology*. 153(3): 937-944.
33. Konturek, P.C., Kania, J., Kukharsky, V., Ocker, S., Hahn, E.G. and Konturek, S.J., 2003. Influence of gastrin on the expression of cyclooxygenase-2, hepatocyte growth factor and apoptosis-related proteins in gastric epithelial cells. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 54(1): 17-32.
34. Luo, W., Zhao, Y., Zhou, Z., An, C. and Ma, Q., 2008. Digestive enzyme activity and mRNA level of trypsin in embryonic redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 26(1): 62-68.
6. Saki, A.A., Abbasinezhad, M., Ghazi, S., Tabatabai, M.M., Ahmadi, A. and Zaboli, K., 2012. Intestinal characteristics, alkaline phosphatase and broilers performance in response to extracted and mechanical soybean meal replaced by fish meal. 14: 105-114.
7. Röhe, I., Boroojeni, F.G. and Zentek, J., 2017. Effect of feeding soybean meal and differently processed peas on intestinal morphology and functional glucose transport in the small intestine of broilers. *Poultry Science*. 96(11): 4075-4084.
8. Singh, K.M., Shah, T., Deshpande, S., Jakhesara, S.J., Koringa, P.G., Rank, D.N. and Joshi, C.G., 2012. High throughput put 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. *Molecular biology reports*. 39(12): 10595-10602.
9. Batal, A.B., Douglas, M.W., Ingram, A.E. and Parsons, C.M., 2000. Protein dispersibility index as an indicator of adequately processed soybean meal. *Poultry science*. 79(11): 1592-1596.
10. Jazi, V., Mohebodini, H., Ashayerizadeh, A., Shabani, A. and Barekatin, R., 2019. Fermented soybean meal ameliorates Salmonella Typhimurium infection in young broiler chickens. *Poultry science*. 98(11): 5648-5660.
11. Mojarad, M.T., Seidavi, A., Dadashbeiki, M. and Roca-Fernandez, A.I., 2014. Effect of soybean meal heat procedures on growth performance of broiler chickens. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 12(1): 180-185.
12. Jahanian, R. and Rasouli, E., 2016. Effect of extrusion processing of soybean meal on ileal amino acid digestibility and growth performance of broiler chicks. *Poultry science*. 95(12): 2871-2878.
13. Pacheco, W.J., Stark, C.R., Ferket, P.R. and Brake, J., 2014. Effects of trypsin inhibitor and particle size of expeller-extracted soybean meal on broiler live performance and weight of gizzard and pancreas. *Poultry Science*. 93(9): 2245-2252.
14. AOAC. 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
15. Martínez, Y. and Valdiviá, M., 2021. Efficiency of Ross 308 broilers under different nutritional requirements. *Journal of Applied Poultry Research*. 30(2): 100140.
16. Cai, J., Li, T., Huang, B., Cheng, H., Ding, H., Dong, W., Xiao, M., Liu, L. and Wang, Z., 2014. The use of laser microdissection in the identification of suitable reference genes for normalization of quantitative real-time PCR in human FFPE epithelial ovarian tissue samples. *PloS one*. 9(4): e95974.
17. Navarro, E., Serrano-Heras, G. and Castaño, M.J., 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*. 439: 231-250.
18. Morgunova, N.L., Rudik, F.Y., Semilet, N.A., Lovtsova, L.G., Ivanova, Z.I. and Pfeifer, S.A., 2020. Technology for reducing urease activity in soybeans. *InIOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing, 862(6): 062005.
19. Wright, K.N., 1981. Soybean meal processing and quality control. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 58: 294-300.
20. Perilla, N.S., Cruz, M.P., De Belalcázar, F. and Diaz, G.D., 1997. Effect of temperature of wet extrusion on the nutritional value of full-fat soybeans for broiler chickens. *British Poultry Science*. 38(4): 412-416.