مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۴، شماره ۲، ۱۳۹۲ (۱-۱۷۷)

افزایش محتوای لایزوزیم تخم بلدرچین ژاپنی با مکمل سازی جیره‌ای اسیدهای آمینه

نجمه سادات روحانی[۱]، محمد امیر کریمی ترشیزی[۲]* و مریم نیکخواه[۳]
۱، دانش آموخته کارشناسی ارشد پرورش و تولید طیور دانشگاه تربیت مدرس
۲، استادیار گروه پرورش و تولید طیور دانشگاه تربیت مدرس
۳، استادیار گروه نانوبیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس
(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۷- تاریخ تصویب: ۹۲/۴/۸)

چکیده

به منظور بررسی امکان تغییر غلظت و فعالیت آنزیم لایزوزیم در تحقیق حاضر چهار اسیدآمینه آسپاراژین، آرژنین، گلایسین و متیونین به جیره غذایی بلدرچین‌های تخمگذار مکمل شد. برای مکمل سازی اسیدهای آمینه، یکسان بودن محتوای پروتئینی جیره در تمام گروه‌های آزمایشی اساس کار قرار گرفت و بدین منظور مقدار اسیدهای آمینه مکمل افزوده شده در گروه‌های آزمایشی معادل ۰/۲۳۵ درصد پروتئین خام بود. تعداد ۷۲ قطعه بلدرچین تخمگذار در قالب طرح کاملا تصادفی با ۶ تیمار، ۳ تکرار و ۴ پرنده در هر قفس به مدت ۳۰ روز مورد استفاده قرار گرفت. مکمل نمودن اسیدهای آمینه اثر مثبت و معنی‌داری بر روی درصد تولید تخم و توده تخم داشت (P<۰/۰۵)، ضریب تبدیل غذایی در بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌داری نشان نداد، لیکن از نظر عددی بهترین ضریب تبدیل مربوط به گروه شاهد بود (P<۰/۰۵). وزن پوسته، درصد سفیده، درصد زرده، ارتفاع سفیده، واحد هاو و ارتفاع زرده بین گروه‌های آزمایشی تفاوت معنی‌دار نشان دادند(P<۰/۰۵) و افزودن اسیدهای آمینه به جیره غذایی بلدرچین‌ها موجب افزایش این صفات گردید. فعالیت آنزیم لایزوزیم با دو روش لایزوپلیت و کدورت سنجی سنجیده شد، مکمل نمودن اسیدهای آمینه آرژنین و آسپاراژین به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر موجب افزایش فعالیت آنزیم لایزوزیم در هر دو روش لایزوپلیت (P<۰/۰۵) و کدورت سنجی (P<۰/۰۵) شد. غلظت پروتئین لایزوزیم هم تحت تأثیر افزودن جیره‌ای اسیدهای آمینه قرار گرفت (P<۰/۰۵). بر اساس نتایج این تحقیق امکان افزایش لایزوزیم تخم از طریق مکمل سازی جیره‌ای اسیدهای آمینه وجود دارد.

واژه های کلیدی: **اسیدهای آمینه، بلدرچین ژاپنی، تولید تخم، کیفیت داخلی تخم، لایزوزیم سفیده تخم،**

مقدمه

پژوهش‌های متعدد گویای این هستند که ترکیبات فعال بیولوژیکی که در تخم پرندگان وجود دارند به علت دارا بودن اثرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد سرطان و حفاظت از سیستم ایمنی، علاوه بر کارایی در صنعت غذایی، کاربردهای گسترده‌ای در پزشکی و داروسازی یافته‌اند (Mine & Kovacs-Nolan, 2004). از بین اجزاء زیست فعال تخم پرندگان می‌توان به جزء پروتئینی لایزوزیم اشاره نمود. لایزوزیم یک آنزیم طبیعی با پراکنش گسترده است و منبع غنی آن، سفیده تخم ماکیان است و تقریبا ۳/۵ درصد سفیده تخم را تشکیل می‌دهد. لایزوزیم توسط الکساندر فلمینگ[۱] در سال ۱۹۲۲کشف شد (Alderton & Fevold, 1946)، این آنزیم (E.C.3.2.17) به عنوان مورامیداز و ان - استیل مورامیک - هیدرولاز شناخته می‌شود.

بهترین اثر ضد باکتریایی را در مورد کوپلی‌مرهای پلی ساکاریدهایی مانند ان- استیل گلوکوزامین(NAG) و

1. Alexander Fleming

* نویسنده مسئول: محمد امیر کریمی ترشیزی تلفن: ۰۹۱۲۳۲۱۱۶۵۳ E-mail : rasoult@modares.ac.ir

ان- استیل مورامیک اسید(NAM) دارد که جزو واحدهای ساختمانی دیوارهای سلولی بسیاری از باکتری‌ها هستند. فعالیت آنزیم مورامیداز (هیدرولاز) قطع پیوندهای β ۱و۴ گلیکوسیدی میان NAG و NAM است. در صنعت غذایی بصورت مستقیم و غیر مستقیم از لایزوزیم به منظور ممانعت از آلودگی و رشد میکروب‌ها استفـاده می‌کنند. بر طبق استانداردهای غذایی FAO/WHO تولیدکنندگان اجازه یافتند برای تهیه آب سیب و گلابی و تهیه پنیر از لایزوزیم استفاده نمایند (Anonymous, 2012)، همچنانکه در اروپا برای تهیه پنیرهای ایدام[1] و گودا[2] به منظور ممانعت از رشد *Clostridium tyrobutyricum* از لایزوزیم استفاده نموده و در ژاپن هم به سبزی‌ها، غذاهای دریایی و ســـالادها اضـــافه می‌گردد (Davidson, 2001). حیطه‌ی دیگر کاربرد لایزوزیم در تکنولوژی غذایی شرکت در ساخت مواد مورد استفاده در بسته‌بندی‌های خوراک‌ها می‌باشد تا تاریخ مصرف خوراک‌های استریل نشده یا خوراک هایی که به مقدار کم فرآوری شده‌اند را از طریق ممانعت آلودگی توسط رشد میکروارگانیسم‌ها افزایش دهد(Han, 2000). در تحقیقات پزشکی و داروسازی تأثیر حفاظتی لایزوزیم علیه بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و عفونی به اثبات رسیده است (Sugahara et al., 2002). لایزوزیم برای تهیه آئروسل برای درمان بیماری‌های تنفسی ریوی، تهیه پمادهای درمانی متفاوت برای حفاظت و بازسازی موضعی قسمت‌های دیستروفی شده و جراحات التهابی پوست و بافت‌های نرم (Lacono et al., 1980)، تهیه محصولات بهداشتی دهانی به منظور پیشگیری از پوسیدگی دندان (Sava, 1996) کاربرد تجاری دارد. اثرات ضد حساسیت و ضد توموری (Pacor et al., 1996) این آنزیم هم به اثبات رسیده است. داروهایی چون Lysopain در سوئیس، Lyso6 و Hexalyse در فرانسه، Igazum در دانمارک، Murazyme در برزیل و Neuzym در ژاپن از جمله داروهای حاوی لایزوزیم هستند که در این کشورها ساخته و عرضه می‌شوند. Tenuovo در سال ۲۰۰۲ تخمین زده است که سالانه بیش از ۱۰۰ تن لایزوزیم مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tenuovo, 2002).

در پژوهش‌ها نشان داده شده است که دستکاری خوراک (Kopeć et al., 2005)، مدت زمان انبار تخم مرغ (Huopalahti et al., 2007) و سیستم مدیریت مرغان تخمگذار (Trziszka et al., 2007) از جمله عوامل تأثیر گذار بر میزان فعالیت لایزوزیم در سفیده تخـم می‌باشند. با توجه به اینکه در توالی اسیدآمینه ای لایزوزیم (Kijowski et al., 2000) اسیدهای آمینه آسپاراژین و آرژنین بیش‌ترین مقدار، و متیونین یکی از کمترین مقادیر را به خود اختصاص داده است و گلایسین اسیدآمینه‌ای است که سهم متوسطی در ساختار لایزوزیم دارد، به منظور بررسی امکان تغییر غلظت و فعالیت لایزوزیم سفیده تخم بلدرچین تخمگذار، در این آزمایش از مکمل اسیدهای آمینه آرژنین (Merck, Germany)، آسپاراژین (Applichem, Germany)، گلایسین (Serva, Germany) و متیونین (Evonic, Germany) استفاده گردید. با توجه به اینکه پژوهشی تا کنون مبنی بر تأثیر دستکاری غذایی بر افزایش غلظت لایزوزیم و نیز فعالیت این آنزیم انجام نشده است، در این تحقیق اثرات افزودن چند اسیدآمینه سنتزی در جیره بلدرچین‌های تخمگذار بر غلظت و فعالیت این آنزیم مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش

تعداد۷۲ قطعه بلدرچین تخمگذار ژاپنی ۹۸ روزه در قالب طرح کاملا تصادفی شامل ۶ گروه آزمایشی و هر گروه با ۳ تکرار و در هر واحد آزمایشی ۴ قطعه پرنده به مدت ۳۰ روز مورد آزمایش قرار گرفتند.

جیرهٔ غذایی پایه بر اساس توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات برای بلدرچین تخمگذار تنظیم شد (NRC, 1994). پرنده‌ها در دورهٔ پرورش دسترسی آزاد به دان و آب آشامیدنی داشتند.

با استناد بر اینکه پژوهشگران برای مشاهده اثرات متیونین، میزان آن را تا حداکثر ۰/۴ درصد جیره در نظر گرفته‌اند، ما این میزان را برای تهیه جیره حاوی تیمار متیونین به کار بردیم و بر اساس یکسان بودن میزان

1. edam
2. gouda

پروتئین در میان همه جیره‌ها، سایر اسیدهای آمینهٔ آزمایشی را تنظیم نمودیم (جدول ۱).

جدول ۱- ترکیب مواد خوراکی و مواد مغذی موجود در جیره های آزمایشی

گروه آزمایشی	مکمل آرژنین	مکمل آسپاراژین	مکمل آرژنین+ آسپاراژین	مکمل گلایسین	مکمل متیونین	شاهد
ترکیب جیره غذایی (درصد)						
ذرت	۵۳/۴	۵۳/۴	۵۳/۴	۵۳/۴	۵۳/۴	۵۳/۴
کنجاله سویا (٪۴۴)	۳۴/۹۶	۳۴/۹۶	۳۴/۹۶	۳۴/۹۶	۳۴/۹۶	۳۴/۹۶
روغن سویا	۳/۹	۳/۹	۳/۹	۳/۹	۳/۹	۳/۹
دی کلسیم فسفات	۱/۱۴	۱/۱۴	۱/۱۴	۱/۱۴	۱/۱۴	۱/۱۴
کربنات کلسیم	۵/۶۲	۵/۶۲	۵/۶۲	۵/۶۲	۵/۶۲	۵/۶۲
نمک طعام	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴	۰/۳۴
مکمل ویتامینی[1]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل معدنی[2]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
دی ال- متیونین (٪۹۹)	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۵۴	۰/۱۴
ال- آرژنین (٪۹۹<)	۰/۱۱۷	-	۰/۰۵۸۵	-	-	-
ال- آسپاراژین (٪۹۹<)	-	۰/۱۷۷	۰/۰۸۸۵	-	-	-
ال- گلایسین (٪۹۹<)	-	-	-	۰/۲۰۱	-	-
آنالیز مواد مغذی جیره پایه						
انرژی قابل متابولیسم kcal/kg	۲۹۲۲/۱۲	۲۹۲۲/۴۴	۲۹۲۲/۲۸	۲۹۲۲/۱۶	۲۹۳۳/۷	۲۹۱۹/۰۰
پروتئین ٪	۲۰/۱۶	۲۰/۱۶	۲۰/۱۶	۲۰/۱۶	۲۰/۱۶	۱۹/۹۲
متیونین ٪	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۸۵	۰/۴۵
آرژنین ٪	۱/۴۱۷	۱/۳۰	۱/۳۶	۱/۳۰	۱/۳۰	۱/۳۰
گلایسین ٪	۰/۸۴	۰/۸۴	۰/۸۴	۱/۰۴	۰/۸۴	۰/۸۴
کلسیم ٪	۲/۶۲	۲/۶۲	۲/۶۲	۲/۶۲	۲/۶۲	۲/۶۲
فسفر ٪	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۶

۱- ترکیب مکمل ویتامینی مورد استفاده در جیره به ازاء هر کیلوگرم: ویتامین A ۱۰۰۰۰ واحد بین المللی؛ ویتامین D_3 ۹۷۹۰ واحد بین المللی؛ ویتامین E ۱۲۱ واحد بین المللی؛ ویتامین K_3 ۲ میلی گرم؛ B_{12} ۰/۰۲ میلی گرم؛ تیامین ۴ میلی گرم؛ ریبوفلاوین ۴/۴ میلی گرم؛ نیاسین ۲۲ میلی گرم؛ پیریدوکسین۴ میلی گرم؛ بیوتین ۰/۰۳ میلی گرم؛ فولیک اسید ۱ میلی گرم؛ کولین کلراید ۸۴۰ میلی گرم

۲- ترکیب مکمل معدنی مورد استفاده در جیره به ازاء هر کیلوگرم: روی ۶۵ میلی گرم؛ منگنز ۷۵ میلی گرم؛ مس ۶ میلی گرم؛ سلنیوم۰/۲ میلی گرم؛ آهن ۷۵ میلی گرم

متغیرهای اندازه گیری شده در رابطه با عملکرد

در طول دوره پرورش، عملکرد پرندگان شامل مصرف خوراک، تعداد تخم تولیدی و وزن تخم‌ها به صورت هفتگی ثبت شدند. همچنین درصد تخمگذاری با استفاده از تعداد تخم تولیدی، وزن توده تخم با استفاده از درصد تولید و میانگین وزن تخم‌ها و ضریب تبدیل خوراک با استفاده از داده‌های وزن توده تخم و مصرف غذا محاسبه شدند. کلیه داده‌های بدست آمده با کمک نرم افزار SAS تجزیه واریانس شدند، مقایسه میانگین از طریق آزمون دانکن انجام شد. در تمامی آزمون های آماری انجام شده سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

تعیین ویژگی های تخم بلدرچین

تخم‌های تولیدی در ۵ روز انتهایی دوره یک ماههٔ آزمایش جمع آوری گردید و تعداد ۱۵ تخم بلدرچین برای هر گروه آزمایشی انتخاب و برای بررسی ویژگی‌های کمی وکیفی به آزمایشگاه ارسال شدند. سفیده و زرده مربوط به هر گروه آزمایشی پس از جداسازی به صورت مجزا با یکدیگر مخلوط شده و همگن گردیدند. برای اندازه‌گیری ارتفاع و قطر سفیده از دستگاه ارتفاع سنج استفاده شد. ماده خشک سفیده و زرده هم محاسبه گردید.

تعیین غلظت پروتئین

غلظت پروتئین نمونه‌ها به روش بردفورد[1] تعیین گردید، پس از تعیین غلظت پروتئین کل سفیده تخم، برای تعیین غلظت لایزوزیم و سنجش فعالیت آنزیم در مراحل بعدی، یکسان سازی غلظت پروتئین در نمونه-های سفیده انجام شد.

تعیین غلظت لایزوزیم

برای محاسبه مقدار نسبی لایزوزیم از روش الکتروفورز SDS-PAGE[2] استفاده شد (Laemmli, 1970). سیستم مورد استفاده بصورت ناپیوسته بود، ژل پائین ۱۵٪ و ژل بالا ۵٪ تهیه شد، پس از اتمام الکتروفورز، ژل با رنگ

1. Bradford assay
2. Sodium Dodecyle Sulphate- Polyacryl Amide Gel Electrophoresis

کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و پس از یک ساعت در محلول رنگ‌بر قرار گرفت. به منظور محاسبه تقریبی غلظت لایزوزیم ابتدا ژل اسکن شده و سپس به کمک نرم افزار Photo capt شدت باند مربوط تخمین زده شد. در دانسیتوگرام بدست آمده از باند مربوط به لایزوزیم از مقادیر سطح زیر منحنی، حجم و ارتفاع منحنی، مقدار مربوط به حجم برای آنالیز داده‌ها استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم

به منظور تعیین فعالیت آنزیم لایزوزیم از روش کدورت سنجی (Shugar, 1952; Jiang et al., 2001) استفاده شد. میکروارگانیسم مورد استفاده در این سنجش باکتری میکروکوکوس لوتئوس[1] بود که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه گردید. روش کدورت سنجی: مقداری از ارگانیسم میکروکوکوس لوتئوس با بافر فسفات (۶۷ میلی مولار، اسیدیته ۶/۴) مخلوط گردید، تا میزان جذب نوری سوسپانسیون حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر بین ۰/۷- ۰/۶ بدست آید.

نمونه‌های سفیده خام (با میزان پروتئین یکسان) به میزان ۱:۱۰ رقیق سازی شدند. یک میلی لیتر از سوسپانسیون میکروارگانیسم درون کووت ریخته شده و سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه آماده به آن افزوده شده و بعد از تکان دادن بسیار آهسته، کووت سریعا در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد. میزان جذب به مدت ۵ دقیقه و هر ۳۰ ثانیه یکبار در طول موج ۴۵۰ نانومتر یادداشت شد.

محاسبه داده‌ها در برنامه Excel انجام شد، بدین گونه که میانگین تفاوت جذب‌های قرائت شده در ۵ دقیقه بر عدد ۰/۰۰۱ تقسیم شد تا میزان فعالیت آنزیم برای نمونه معین گردد و اعداد حاصل به عنوان میزان فعالیت آنزیم مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. در روش کدورت سنجی یک واحد فعالیت آنزیم برابر است با ۰/۰۰۱ کاهش کدورت سوسپانسیون در هر دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومتر، واحد فعالیت غالبا بصورت U/mg بیان می‌شود.

1. *Micrococcus luteus*, PTCC1625

روش لایزوپلیت

سوسپانسیون میکروارگانیسم در این روش به گونه‌ای تهیه گردید تا میزان جذب سوسپانسیون حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر ۰/۲ بدست آید. سپس آگارز ۱٪ افزوده شد و مخلوط حرارت داده شد تا سوسپانسیون یکنواختی حاصل شود. به میزان ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون در پلیت‌هایی با قطر ۱۰۰ میلی متر ریخته شد. پس از سرد شدن و منعقد شدن سوسپانسیون، چاهکی به قطر ۴ میلی متر در میانه هر پلیت ایجاد شد. نمونه‌های سفیده خام بدون رقیق شدن (پس از یکسان سازی پروتئین کل)، کاملا درون چاهک ریخته شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. قطر هاله تشکیل شده با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد. در این روش قطر هاله‌ای که در اثر فعالیت آنزیم اطراف هر چاهک تشکیل شده بود معیار سنجش میزان فعالیت آنزیم بود.

اندازه‌گیری آنزیم‌های سرمی

غلظت آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز (ALT[2])، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST[3])، آلکالین فسفاتاز (ALP[4]) و لاکتات دهیدروژناز (LDH[5]) موجود در نمونه‌های سرم خون از فراسنجه‌های مورد ارزیابی بودند که با کیت آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون و دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway Genova MK3, UK) تعیین شدند.

تجزیه آماری داده ها

کلیه داده‌های بدست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۳ تکرار با کمک نرم افزار SAS (1990) و با استفاده از مدل آماری زیر تجزیه واریانس شدند:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

که در آن Y_{ij}= مقدار هر مشاهده، μ = اثر میانگین جامعه، T_i = جیره های آزمایشی و ε_{ij} = مقدار باقیمانده می باشد. مقایسه میانگین با روش چند دامنه ای دانکن انجام و سطح معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) فرض شد (Steel and Torrie, 1980).

2. Alalnine Aminotransferase
3. Aspartate Aminotransferase
4. Alkaline Phosphatase
5. Lactate Dehydrogenase

نتایج و بحث

صفات عملکردی

تاثیر افزودن جیره ای اسیدهای آمینه مورد آزمایش بر عملکرد بلدرچین های تخمگذار در جدول ۲ مشاهده می شود. اسیدهای آمینه بر مصرف خوراک به طور معنی داری موثر بودند (P<۰/۰۵). با مکمل نمودن آرژنین به همراه آسپاراژین بیش‌ترین میزان مصرف خوراک مشاهده گردید و گروه دریافت کننده متیونین و گروه شاهد کمترین مصرف خوراک را داشتند. بررسی پژوهشهای انجام شده تا کنون نشان می دهد که مصرف اسیدهای آمینه مازاد در جیره غذایی اثرات متفاوتی بر میزان مصرف خوراک داشته است، تعدادی از پژوهشگران با مصرف سطوح لایزین و اسیدهای آمینه گوگرددار در مصرف خوراک مرغان تخمگذار تفاوت معنی‌داری مشاهده نکردند (Novak et al., 2004; Prochaska et al., 1996) اما پژوهشگر دیگری با مکمل نمودن متیونین در مصرف خوراک مرغان تخمگذار افزایش مشاهده نمود (Liu et al., 2004). با توجه به جدول ۲ دریافت می‌شود که اثر مکمل نمودن اسیدهای آمینه بیش‌تر بر روی درصد تولید تخم و توده تخم بوده است، مکمل نمودن اسیدهای آمینه موجب افزایش این صفات اقتصادی نسبت به گروه شاهد شده‌اند(P<۰/۰۵). همانطور که در جدول مشاهده می‌شود گروه شاهد و سپس گروه آزمایشی مصرف کننده متیونین کمترین درصد تولید را داشتند و گروه آزمایشی دریافت کننده آرژنین و آسپاراژین بیش‌ترین درصد تولید را به خود اختصاص داد. تعدادی از پژوهشگران با تغذیه سطوح اسیدهای آمینه گوگرددار بیش از مقدار توصیه شده توسط NRC در فاز اول تولید مرغان تخمگذار اثر معنی-داری بر روی صفات تولیدی مشاهده نمودند (Bertram Harms et al., 1998 ; & Schutte, 1992).

میانگین وزن تخم‌ها در کل دوره پرورش تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی نداشته است (جدول۲) که احتمالا به دلیل تأمین نیتروژن یکسان در بین کلیه گروه‌های آزمایشی به غیر از گروه شاهد می-باشد. در برخی از آزمایش‌ها با مکمل نمودن متیونین افزایش وزن تخم مرغها مشاهده شد (Liu et al., 2004; Shafer et al., 1996) در حالیکه Novak و همکاران با افزودن اسیدهای آمینه گوگرددار در چهار سطح ۶۳۵، ۶۸۹، ۸۱۱ و ۸۷۷ میلی‌گرم / روز به جیره مرغان تخمگذار، اثری بر وزن تخم مشاهده نکردند (Novak et al., 2004).

اگرچه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین میانگین ضریب تبدیل گروه‌ها مشاهده نشد (جدول ۲) ولی بیش‌ترین ضریب تبدیل غذا مربوط به گروه دریافت کننده هر دو اسیدآمینه آسپاراژین و آرژنین بود. علت افزایش ضریب تبدیل در این گروه آزمایشی را می‌توان افزایش خوراک مصرفی پرنده‌های این گروه دانست.

جدول۲- صفات عملکردی بلدرچین های ژاپنی در کل دوره پرورش

گروه‌های آزمایشی	خوراک‌مصرفی(g/d)	تولید تخم (%)	وزن تخم(g)	توده تخم(g/d)	ضریب تبدیل
آرژنین	۳۴/۸۲ ab	۹۰/۴۷ ab	۱۳/۹۶	۱۲/۶۲ a	۲/۷۶
آسپاراژین	۳۵/۰۷ ab	۸۹/۵۸ ab	۱۳/۹۷	۱۲/ ۵۱ a	۲/۸۰
آرژنین+آسپاراژین	۳۵/۹۳ a	۹۱/۶۶ a	۱۳/۴۱	۱۲/۲۹ a	۲/۹۴
گلایسین	۳۴/۵۵ ab	۸۸/۶۹ ab	۱۴/۰۶	۱۲/۴۷ a	۲/۸۲
متیونین	۳۲/۹۲ b	۸۷/ ۲۲ b	۱۳/۲۶	۱۱/۵۶ b	۲/۸۵
شاهد	۳۲/۹۰ b	۸۶/۹۰ b	۱۳/۹۸	۱۲/۱۵ ab	۲/۷۲
P-value	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۱۲	۰/۰۴	۰/۲۶
SEM	۰/۳۶	۰/۵۵	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۰۲

abc میانگین های با حروف متمایز هر ستون، از نظر آماری متفاوتند (P<۰/۰۵)

کیفیت تخم‌های بلدرچین

طبق نتایج قابل مشاهده در جدول ۳ درصد زرده و درصد سفیده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی داشتند(P<۰/۰۵)، که شاید بتوان در توافق با سایر پژوهشگران عنوان کرد که نیاز اسیدهای آمینه بلدرچین تخمگذار که در NRC 1994 پیشنهاد شده است کاملا مناسب نبوده و می‌توان با افزودن جیره‌ای اسیدهای آمینه درصد زرده و سفیده را تغییر داد

(Novak et al., 2004). در آزمایشی که در سال ۱۹۹۶ بر روی مرغان لگهورن سفید هایسکس انجام شد، با افزایش سطح لایزین در جیره غذایی این مرغان، افزایش خطی در درصد زرده مشاهده شد ولی اثر معنی‌داری روی آلبومن گزارش نگردید (Scheideler et al., 1996). در حالیکه در سال ۲۰۰۴ آزمایشی بر روی مرغان Dekalb Delta انجام شد که با افزایش سطح لایزین در جیره غذایی این پرندگان، افزایش درصد آلبومن و درصد ماده خشک آلبومن مشاهده شد و درصد زرده در این پژوهش کاهش یافت (Novak et al., 2004). علت تفاوت در نتـایج داده‌ها در ترکیبات تخم را Novak و همکاران ناشی از تفاوت احتیاجات اسیدهای آمینه در سویه‌های مختلف تخمگذار بیان نمود. از ویژگی تخم‌های لگهورن سفید هایسکس وجود مقدار زرده بیش‌تر در تخم نسبت به سایر سویه‌ها می‌باشد، که در نتیجه می‌تواند احتیاجات لایزین را افزایش دهد. در حالیکه در تخم مرغان تخمگذار Dekalb Delta میزان آلبومن بیش‌تر می‌باشد، Novak و همکاران اظهار داشتند که تفاوت در گونه‌های مختلف می‌تواند بر میزان احتیاجات لایزین اثرگذار باشد. برخی از پژوهشگران بالا بردن سطح متیونین در جیره غذایی را فاکتور مهمی در بالا بردن ماده خشک و پروتئین تخم مرغ‌ها بیان نمودند، بدون اینکه اثر زیادی بر تولید تخم، وزن تخم یا میزان تلفات بگذارد (Shafer et al., 1996 ; Carey et al., 1991). در پژوهش حاضر با مکمل نمودن اسیدهای آمینه درصد ماده خشک سفیده و پروتئین آن تحت تأثیر قرار گرفت(P<۰/۰۵)، لیکن اثری روی ماده خشک زرده و پروتئین زرده مشاهده نشد (جدول۳). تحت تأثیر قرار نگرفتن درصد پروتئین زرده را می‌توان به استدلال سایر محققین (Novak et al., 2004) ارجاع داد که با توجه به اینکه زرده در کبد و سفیده در مگنوم ساخته می‌شوند، تغییرات اسیدآمینه در خون در نتیجه محتوای خوراک مصرفی ممکن است کمترین اثر را بر روی نرخ سنتز پروتئین در بافت کبد نسبت به مگنوم داشته باشد. زیرا وظیفه عمده کبد برای سنتز پروتئین کل بدن می‌باشد و سنتز پروتئین زرده جزء کوچکی از وظایف این اندام می‌باشد. که این مطلب ممکن است دلیلی برای کاهش پاسخ به غلظت اسیدآمینه در پروتئین زرده باشد. با مکمل نمودن اسیدهای آمینه سنتزی در آزمایش حاضر بهترین کیفیت تخم‌ها از لحاظ مقایسه واحد هاو را گروه دریافت کننده آسپاراژین نشان داد و کمترین واحد هاو مربوط به گروه دریافت کننده متیونین بود(P<۰/۰۱)، نتایج مشابهی در مورد ارتفاع سفیده بدست آمده است که با توجه به رابطه مستقیم این دو پارامتر قابل انتظار بود. از عوامل موثر بر واحد هاو تغذیه بیان شده است (Roberts, 2004). در تغذیه طیور پروتئین خوراک و محتوای اسیدهای آمینه مانند لایزین و متیونین اثر مستقیم بر واحد هاو دارند، این فاکتورها بر ارتفاع سفیده و متعاقب آن واحد هاو اثر می‌گذارند.

جدول۳ – تأثیر مکمل سازی اسیدهای آمینه بر کیفیت تخم‌های بلدرچین

اسیدهای آمینه	درصد سفیده	درصد زرده	درصد پوسته	٪ماده خشک سفیده	٪پروتئین سفیده	٪ماده خشک زرده	٪پروتئین زرده	ارتفاع سفیده (میلی متر)	واحد هاوو
آرژنین	۶۲/۲ a	۲۹/۷ b	۸	۱۳/۳۶ d	۷/۷۲ a	۵۱/۲۵	۱۲/۳۹	۵/۵۷ ab	۹۳/۵۳ a
آسپاراژین	۶۱/۹ ab	۳۰/۱ b	۷/۹	۱۳/۶۵ c	۷/۶۹ a	۵۳/۷۵	۱۳/۲۳	۵/۹۲ a	۹۵/۲۳ a
آرژنین+آسپاراژین	۶۰/۷ bc	۳۱/۱ ab	۸	۱۲/۲۵ e	۷/۶۳ ab	۵۴/۰	۱۲/۹۳	۵/۳۶ b	۹۲/۹۲ a
گلایسین	۶۱/۰ abc	۳۰/۵ ab	۸	۱۴/۴۴ b	۷/۳۵ b	۵۳/۳۷	۱۲/۶۰	۵/۷۱ ab	۹۴/۶۸ a
متیونین	۶۰/۲ c	۳۱/۶ a	۸	۱۲/۲۵ e	۷/۳۳ b	۵۳/۶۲	۱۴/۲۹	۴/۸۲ c	۹۰/۱۰ b
شاهد	۶۰/۳ c	۳۱/۰ ab	۸	۱۴/۷۲ a	۷/۳۶ b	۵۳/۲۰	۱۲/۴۰	۵/۶۳ ab	۹۳/۵۱ a
P-value	۰/۰۰۶	۰/۰۵	۰/۶۵	<۰/۰۰۱	۰/۰۱	۰/۳۷	۰/۴۵	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۴
SEM	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۲۳	۰/۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۸	۰/۴۱

abc میانگین های با حروف متمایز هر ستون، از نظر آماری متفاوتند (P<۰/۰۵)

سنجش فعالیت آنزیم لایزوزیم

میزان فعالیت آنزیم در هر دو روش تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی نشان داد (P<۰/۰۵ - جدول۴).

کدورت سنجی

همانطور که در جدول۴ مشاهده می‌شود، در روش کدورت سنجی گروه دریافت کننده اسیدآمینه‌های

آرژنین + آسپاراژین با U/mg ۸۱۰۰ بیش‌ترین فعالیت لایزوزیم را موجب شد(P<۰/۰۵). گروه آزمایشی دریافت کننده آسپاراژین دومین رتبه فعالیت آنزیم را نشان داد و گروه شاهد با U/mg ۵۰۰۰ کمترین فعالیت را در بین سایر گروه‌ها نشان داد. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۵ انجام شد، از طریق دستکاری غذایی میزان فعالیت لایزوزیم تغییر یافت. در این آزمایش هوموکاربوویت[6]، پودرماهی به همراه افزودن مواد معدنی، کنجاله منداب و KRM[7] موجب کاهش فعالیت لایزوزیم نسبت به گروه شاهد شدند، در این آزمایش فعالیت لایزوزیم با روش کدورت سنجی اندازه‌گیری شده بود و تقریبا ۱۰ درصد کاهش فعالیت در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد(Kopeć et al., 2005).

لایزوپلیت

نتایج حاصل از روش لایزوپلیت نشان داد که گروه دریافت کننده اسیدهای آمینه آرژنین و آسپاراژین بیش‌ترین قطر هاله‌ی شفاف تجزیه‌ی باکتری را موجب شد، پس از آن طبق انتظار گروه دریافت کننده آرژنین و گروه تغذیه کننده آسپاراژین بیش‌ترین فعالیت آنزیم لایزوزیم را در نمونه‌های سفیده تخم نشان دادند (P<۰/۰۵). در نمونه‌های سفیده گروه دریافت کننده متیونین کمترین فعالیت لایزوزیم را دارا بودند. چنانچه در جدول ۴ مشاهده می‌شود، قطر هاله تشکیل شده حاصل از فعالیت نمونه‌های خون گروه‌های آزمایشی در روش لایزوپلیت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. احتمالا می‌توان افزایش فعالیت لایزوزیم را در گروه‌های ذکر شده، حضور مقادیر بالای اسیدهای آمینه آسپاراژین و آرژنین در ساختار لایزوزیم بیان نمود. با توجه به اینکه نمونه‌های مورد آزمایش از لحاظ پروتئین کل یکسان سازی شده بودند، داده‌های حاصل از لایزوپلیت و کدورت سنجی نشان دادند مکمل نمودن این دو اسیدآمینه بصورت جداگانه و یا همراه با هم موجب افزایش فعالیت لایزوزیم سفیده تخم بلدرچین‌ها گردید.

جدول۴- تأثیر مکمل سازی جیره‌ای اسیدهای آمینه بر سنجش فعالیت آنزیم با روش کدورت سنجی و لایزوپلیت

گروه آزمایشی	فعالیت آنزیم در ۵ دقیقه (U/ml)	قطر هاله نمونه‌های سفیده (mm)	قطر هاله نمونه‌های خون (mm)
آرژنین	۶۰۰۰^{b}	۳۰/۴۵^{ab}	۳۲/۳۴
آسپاراژین	۶۶۰۰^{ab}	۳۰/۲۸^{ab}	۳۴/۰۶
آرژنین+آسپاراژین	۸۱۰۰^{a}	۳۰/۹۱^{a}	۳۰/۷۴
گلایسین	۶۱۰۰^{b}	۲۹/۸۴^{cb}	۳۲/۸۵
متیونین	۶۳۰۰^{ab}	۲۹/۲۲^{c}	۳۱/۳۱
شاهد	۵۰۰۰^{b}	۳۰/۴۳^{ab}	۳۱/۳۴
P-value	۰/۰۵	۰/۰۰۲	۰/۱۴
SEM	۲۹۹/۱۵۴	۰/۱۴۸	۰/۳۹

^{abc} میانگین های با حروف متمایز هر ستون، از نظر آماری متفاوتند (P<۰/۰۵)

غلظت لایزوزیم

اسیدهای آمینه آرژنین و آسپاراژین بیش‌ترین مقدار لایزوزیم را در سفیده تخم بلدرچین موجب شدند(P<۰/۰۵ - جدول ۵). با توجه به اینکـه در پـژوهش‌های قبلی امکان افزایش غلظت لایزوزیم در سفیده تخم بررسی نشده است، در آزمایش حاضر با فراهم آوردن اسیدهای آمینه مورد نظر در جیره غذایی نتایج جالب توجهی مشاهده گردید. علاوه بر این گرم سفیده تولیدی در روز با ضرب نمودن توده تخم در درصد سفیده محاسبه شد، این پارامتر گرچه معنی دار شده است (P<۰/۰۵) ولی افزایش سهم لایزوزیم را نشان نمی‌دهد لیکن با توجه به اینکه درصد مشخصی از سفیده (۳/۵ درصد) را لایزوزیم تشکیل می‌دهد، می‌توان با افزایش سفیده تولیدی در روز بیان نمود که میزان لایزوزیم هم افزایش یافته است. طبق این پارامتر گروه‌های آزمایشی آرژنین و آسپاراژین بیش‌ترین مقدار سفیده تولیدی را داشته‌اند و می‌توان اظهار کرد که این دو اسیدآمینه در افزایش مقدار لایزوزیم دارای نقش بوده‌اند (جدول۵).

6. Humocarbovite=30% huminic acid+23% mineral
7. KRM= Humocarbovite+fish oil (2:1)

جدول ۵- تأثیر مکمل سازی جیره‌ای اسیدهای آمینه بر غلظت لایزوزیم موجود در سفیده تخم بلدرچین‌ها

گروه آزمایشی	غلظت لایزوزیم(mg/ml)	گرم سفیده تولیدی در روز
آرژنین	۳/۸۰ [a]	۷/۸۵ [a]
آسپاراژین	۴/۰۱ [a]	۷/۵۲ [b]
آرژنین+آسپاراژین	۳/۹۵ [a]	۷/۶۴ [ab]
گلایسین	۳/۰۴ [c]	۷/۵۵ [b]
متیونین	۳/۴۰ [b]	۶/۹۵ [c]
شاهد	۲/۹۹ [c]	۷/۳۵ [b]
P-value	< ۰/۰۰۰۱	< ۰/۰۰۰۱
SEM	۰/۱۰	۰/۰۷

[abc] میانگین های با حروف متمایز هر ستون، از نظر آماری متفاوتند (P<۰/۰۵)

سلامت بلدرچین‌ها

در صورت بروز مسمومیت در اثر مصرف فرم کریستاله اسیدهای آمینه در خوراک، اندامی که منعکس کننده مسمومیت می‌باشد کبد است، و همانطور که در مطالعات نشان داده شده است افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی به عنوان شاخص حساسیت سرولوژیکی در مسمومیت‌های کبد و کلیه می‌باشد (Shi et al., 2006).

همانطور که در جدول۶ آمده است سطح آنزیم‌های سرمی آسپارتات‌آمینوترانسفراز، آلانین‌آمینوترانسفراز، لاکتات‌دهیدروژناز و آلکالین‌فسفاتاز در خون هیچ کدام از پرنده‌های مورد آزمایش نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد و از این نظر سلامت پرنده‌ها مورد تهدید واقع نگردید.

جدول۶- فعالیت آنزیم‌های سرمی در خون (IU/l)

گروه آزمایشی	آلکالین‌فسفاتاز	آلانین‌آمینوترانسفراز	آسپارتات‌آمینوترانسفراز	لاکتات‌دهیدروژناز
آرژنین	۷۹/۲۶	۹/۹۳	۳۷/۵۵	۲۳۶/۴
آسپاراژین	۴۲/۲۷	۱۶/۳۵	۵۹/۳۸	۱۹۳/۷
آرژنین+آسپاراژین	۱۰۰/۱۷	۱۶/۳۸	۳۳/۷۵	۳۴۲/۰
گلایسین	۷۷/۶۶	۱۸/۳۰	۳۶/۳۹	۲۸۹/۹
متیونین	۵۳/۵۳	۱۹/۵۲	۳۸/۸۹	۱۴۱/۶
شاهد	۸۲/۰۲	۱۴/۸۹	۳۱/۵۹	۳۱۱/۲
P-value	۰/۴۰	۰/۵۳	۰/۶۸	۰/۴۵
SEM	۸/۳۰	۲۵/۹۸	۵/۰۰	۳۱/۱۶

نتیجه گیری کلی

مکمل نمودن اسیدهای آمینه در جیره بلدرچین‌های تخمگذار بر صفات عملکردی از جمله درصد تولید و توده تخم اثر مثبت گذاشت. ویژگی‌های کمی و کیفی تخم از جمله درصد زرده، درصد سفیده و واحد ها و تحت تأثیر قرار گرفت و از طرفی سلامتی پرنده‌ها تهدید نشد.

با مکمل نمودن اسیدهای آمینه آسپاراژین و آرژنین مقدار لایزوزیم تولیدی در سفیده تخم افزایش نشان داد و فعالیت آنزیم لایزوزیم هم تحت تأثیر قرار گرفت.

پیشنهادات

پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی سطوح متفاوت اسیدهای آمینه آرژنین و آسپاراژین در جیره در نظر گرفته شوند تا سطح بهینه مکمل سازی تعیین گردد و مکمل نمودن اسیدهای آمینه مذکور در مدت زمان طولانی‌تر ادامه یابد تا از حضور یا عدم حضور اثرهای منفی اطمینان حاصل شود.

REFERENCES

1. Alderton G. & Fevold H. L. (1946). Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme. *Journal of Biological Chemistry*, 19, 1-5.
2. Bertram H. L. & Schutte, J. B. (1992). Evaluation of the sulphur containing amino acids in laying hens. *World's Poultry Congress*, 3, 607-609.
3. Carey J. B., Asher R. K., Angel J. F. & Lowder L.S. (1991) The influence of methionine intake on egg composition. *Poultry Science*, 70, 151.
4. Davidson P.M. (2001). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Food Microbiology. (Ed., M.P. Doyle), ASM Press. Washington D.C. pp: 601-602.
5. Han J. H. (2000). Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, 54, 56–65.
6. Harms R. H., Russell G. B., Harlow H. & Ivey, F.J. (1998). The influence of methionine on commercial laying hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 7, 45-52.
7. Huopalahti R., Lopez-Fandino R., Anton M. and Schade R. (2007). Bioactive egg compounds (Ed), lysozyme (pp. 33-40). New York: Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
8. Jiang C.M., Wang M.C., Chang W. & Chang H.M. (2001). Isolation of lysozyme from hen egg albumen by alcohol-insoluble cross-linked pea pod solid ion-exchange chromatography. *Food Chemistry and Toxicology*, 66,1089-1092.
9. Kijowski J., Lesnierowski G. & Fabisz-Kijowska A. (2000). *Lysozyme polymer formation and functionality of residues after lysozyme extraction*. In: Egg nutrition and biotechnology. J.S. Sim, S. Nakai, and W. Guenter (eds.). CABI Publications. New York.
10. Kopeć W., Skiba T., Korzeniowska M., Bobak L. & Trziszka T. (2005). Activity of protease inhibitors and lysozyme of hen's egg depending on feed modification and egg storage. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14, 79-83.
11. Lacono V.J., Mackay B.J., Dirienzo S. & Pollock J. J. (1980). Selective antibacterial properties of lysozyme for oral microorganisms. *Infection and Immunity*, 29, 523-532.
12. Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 – 685.
13. Liu Z., Bateman A., Bryant M., Abebe A. & Roland D. (2004). Estimation of bioavailability of DL-methionine hydroxy analogue relative to DL-methionine in layers with exponential and slope-ratio models. *Poultry Science*, 83, 1580–1586.
14. Mine Y. & Kovacs-Nolan J. (2004). Biologically active hen egg components in human health and disease. *Journal of Poultry Science*, 41, 1-29.
15. Novak C., Yakout H. & Scheideler S. (2004). The combined effects of dietary lysine and total sulfur amino acid level on egg production parameters and egg components in Dekalb Delta laying hens. *Poultry Science*, 83, 977–984.
16. Osserman E. F. & Lawlor D. P. (1966). Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*, 124, 921-952.
17. Pacor S., Giacomello E., Bergamo A., Clerici K., Zacchigna M., Boccu E. & Sava G. (1996). Antimetastatic action and lymphocyte activation by the modified lysozyme mPEG-Lyso in mice with MCa mammary carcinoma. *Anticancer Research*, 16, 2559-2564.
18. Prochaska J. F., Carey J. B. & Shafer D. J. (1996). The effect of L-lysine intake on egg component yield and composition in laying hens. *Poultry Science*, 75, 1268–1277.
19. Roberts J.R. (2004). Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *Journal of Poultry Science*, 41, 161-177.
20. SAS Institute (1990). *SAS/STAT User's Guide*, Version 6, 4th ed., Vol. 2. SAS Institute Inc., Cary, NC.
21. Sasaki T. (2000) The mode of actions of lysozyme as an immunoglobulin production stimulating factor. *Biochimica et Biophysica Acta*, 14, 27-34.
22. Sava G. (1996). Pharmacological aspects and therapeutic applications of lysozymes. *Exs Journal*, 75, 433-449.
23. Scheideler S.E., Novak C., Sell J.L. & Douglas J. (1996). Hisex White Leghorn lysine requirement for optimum body weight and egg production during early lay. *Poultry Science*, 75, 86.
24. Shafer D.J., Carey J.B. & Prochaska J.F. (1996). Effect of dietary methionine intake on egg component yield and composition. *Poultry Science*, 75, 1080–1085.
25. Shi Y.H., Xu Z.R., Feng J.L. & Wang C.Z. (2006). Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, 129, 138-148.
26. Shugar D. (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 8, 302-309.

27. Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. (1980). *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
28. Sugahara T., Murakami F., Yamada Y. & Tenuovo J. (2002). Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: Efficacy and safety. *Oral Diseases*, 8, 23–29.
29. Tenuovo J. (2002). Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: Efficacy and safety. *Oral Diseases*, 8, 23–29.
30. Trziszka T., Dobrzański Z., Skiba T. & Kopeć W. (2007). Effects of breeding and housing systems of layers on egg quality and the activity of cystatin and lysozyme. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57, 583-586.
31. Anonymous. (2012). Codex General Standard for Food Additives. Food additive details, from http://www.codexalimen tarius.net.