14(3) 163-170, Autumn 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Effects of quinoa seed-based diets in combination with enzyme supplements on the serum biochemical parameters, nutrient digestibility, tibia characteristics and immunity of broiler chickens

Mohammad Yusef Asnaashari Amiri, Mohammad Ali Jafari *, Mehrdad Irani

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Qaimshahr Branch, Islamic Azad University, Qaimshahr, Iran

Key Words

Quinoa seed
Immunity
Digestibility
Serum
Broilers

Abstract

Introduction: The objective of this study was to examine the influenceof quinoa seed-based diets in combination with phytase and protease enzymes on the serum biochemical parameters, nutrient digestibility, intestinal variables, tibia characteristics and immunity of broiler chickens**.**

Materials & Methods: A total of 250 one-day-old broiler chicks (ROSS 308) were randomly allocated into 5 treatments with 5 replicate pens per treatment and 10 birds each. The experimental treatments were a corn-soybean meal diet as control group or control diet supplemented with 150 g/kg of quinoa seed alone olone or supplemented with protease, phytase and combination of protease and phytase**.**

Results: The results indicated a significant decrease in serum concentration of cholesterol, triglycerides and AST activity of broilers fed quinoa seed supplemented with protease and phytase than the control group ($P<0.05$).Jejunum and ileum length enhanced in broiler chickens which received all experimental diets compared with control ($P<0.05$).Nutrient digestibility coefficients of crude protein calcium and phosphorous were significantly greater in broilers fed on diets supplemented with phytase or phytase +protease ($P<0.05$).In tibia variables, the highest concentration of calcium and phosphorous was observed in phytase or phytase+protease supplemented diets ($P<0.05$).the relative weight of bursa and spleen as immunity organs was increased in broilers fed protease or phytase supplemented diets ($P<0.05$).

Conclusion: In conclusion, the addition of phytase or protease enzymes to quinoa seed-based diet may be a suitable scenario to improve nutrient digestibility, immunity or some tibia characteristics in broiler chickens.

* Corresponding Author's email: drjafari1349@gmail.com
Received: 26 July 2021; Reviewed: 26 August 2021; Revised: 26 October 2021; Accepted: 25 November 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.314059.2682

فصلنامه علمی محیط‌زیست جانوری، سال ۱٤، شماره ۳، پاییز ۱٤۰۱ Journal of Animal Environment, Vol. 14, No. 3, Autumn 2022

مقاله پژوهشی

بررسی استفاده از مکمل‌های آنزیمی در جیره‌های بر پایه دانه کینوا بر فراسنجه‌های خونی، قابلیت هضم مواد مغذی، سیستم ایمنی و خصوصیات درشت نی در جوجه‌های گوشتی

محمدیوسف اثناعشری‌امیری، محمدعلی جعفری**، مهرداد ایرانی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران

کلمات کلیدی

دانه کینوا
ایمنی
قابلیت هضم
سرم خون
جوجه گوشتی

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تأثیر افزودن آنزیم‌های فیتاز و پروتئاز در جیره‌های حاوی دانه کینوا بر صفات بیوشیمیایی سرم خون، قابلیت هضم، اجزای روده، ویژگی‌های درشت نی جوجه‌های گوشتی بود.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش از تعداد ۲۵۰ قطعه جوجه یک‌روزه نر سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۵ تکرار و ۱۰ قطعه در هر تکرار استفاده شد. جیره‌های آزمایشی شامل جیره شاهد (جیره پایه شامل ذرت و کنجاله سویا)، جیره شاهد مکمل شده با ۱۵درصد دانه کینوا به تنهایی یا مکمل شده با آنزیم فیتاز، پروتئاز و ترکیب پروتئاز+فیتاز بودند.

نتایج: نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده کاهش غلظت کلسترول، تری‌گلیسرید وفعالیت AST در جوجه‌های تغذیه‌شده با جیره‌های‌حاوی کینوا مکمل شده با آنزیم‌های فیتازو پروتئاز نسبت به تیمار شاهد بود ($p<۰/۰۵$). طول دئودنوم و ژژنوم در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با همه جیره‌های آزمایشی در مقایسه با جیره شاهد افزایش نشان داد ($p<۰/۰۵$). قابلیت هضم موادمغذی پروتئین‌خام، کلسیم و فسفر درجیره‌های حاوی فیتاز یا فیتاز+پروتئاز بیش‌تر از سایر تیمارها بود ($p<۰/۰۵$). در ویژگی‌های درشت نی، بالاترین غلظت کلسیم و فسفر در جیره‌های حاوی فیتاز یا فیتاز+پروتئاز مشاهده‌گردید ($p<۰/۰۵$). وزن بورس‌و طحال به‌عنوان اندام ایمنی درجوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌های حاوی پروتئاز یا فیتاز افزایش یافت ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، افزودن آنزیم فیتاز یا پروتئاز به جیره حاوی دانه کینوا می‌تواند در بهبود قابلیت هضم، ایمنی و برخی ویژگی‌های درشت نی در جوجه گوشتی موثرباشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: drjafari1349@gmail.com

تاریخ دریافت: ٤ مرداد ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ٤ شهریور ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ٤ آبان ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ٤ آذر ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.314059.2682

مقدمه

یکی از گیاهان با ترکیب شیمیایی مناسب و ارزشمند جهت تامین پروتئین مورد نیاز طیور، کینوا است. گیاه کینوا با نام علمی *Chenopodium quinoa* بومی کوه‌های آند در کشورهای بولیوی، شیلی و پرو است (۱). براساس گزارش سازمان خواروبار کشاورزی میزان پروتئین دانه کینوا بین ۱۳/۸۱ تا ۲۳/۹ درصد است و منبع غنی تامین کننده اسیدهای آمینه ضروری بدن انسان است (۲). کینوا از نظر مقدار و کیفیت اسیدهای آمینه به‌خصوص اسیدهای آمینه لیزین و متیونین مناسب‌تر از سایر غلات است (۳، ۴). دانه کینوا منبع عالی از منگنز، آهن و پتاسیم، منبع خوبی از مس، روی و فسفر و نیز حاوی ویتامین‌های گروه ب از جمله ریبوفلاوین، تیامین و نیاسین است. بخش اعظم جیره جوجه‌های گوشتی را دانه‌های غلات و کنجاله‌های گیاهی تشکیل می‌دهند. اسید فایتیک (میوایتوزیتول هگزا فسفریک اسید) به‌طور طبیعی در گیاهان وجود دارد و محل ذخیره اولیه اسید فایتیک در گیاهان، دانه‌های آن‌ها می‌باشد. اسید فایتیک و تانن موجود در کنجاله‌ها به عناصر معدنی متصل شده و آن‌ها را از دسترس آنزیم‌های گوارشی خارج می‌سازد و ممکن است در متابولیسم عناصر معدنی مثل کلسیم مشکل ایجاد کند (۵). دانه کینوا همانند سایر اقلام گیاهی جیره طیور حاوی تعدادی از مواد ضدتغذیه مانند ساپونین‌ها، اسیدفیتیک، تانن‌ها و مهارکننده‌های ترپسین است. ساپونین‌ها به‌عنوان عوامل اصلی ضدکیفیت در ارتباط با کینوا شناخته شده‌اند و محتویات ساپونین در کینوا به‌میزان قابل توجهی متفاوت است (۰/۱۴ تا ۰/۷۳)، کینوا هم‌چنین در سطوح پایین حاوی مهارکننده ترپسین و تانن هستند (۴). بنابراین برای کاهش اثرات منفی، عوامل ضدتغذیه‌ای موجود در دانه کینوا استفاده از افزودنی‌هایی هم‌چون مکمل‌های آنزیمی ضروری به‌نظر می‌رسد. امروزه آنزیم‌های اگزوژنوس به‌طور گسترده‌ای در جیره طیور جهت افزایش زیست فراهمی مواد مغذی و متعاقب آن بهبود عملکرد رشد استفاده می‌شود. گزارش شده است که مصرف آنزیم فیتاز در جیره جوجه‌های گوشتی موجب افزایش مصرف فسفر فیتاته، رشد جوجه گوشتی و افزایش مقاومت استخوان درشت نی می‌شود (۵). علاوه بر این، اثرات مفید آنزیم فیتاز بر راندمان انرژی، سلامت روده و هضم مواد مغذی در جیره‌های غذایی جوجه‌های گوشتی به‌خوبی مشخص شده است (۶). بنابراین، فرض می‌شود که افزودن مکمل فیتاز به رژیم‌های غذایی حاوی کینوا ممکن است منجر به افزایش قابلیت زیست‌فراهمی فسفر و کلسیم در روده جوجه‌های گوشتی شود. علاوه بر این، دانه‌های کینواحاوی مقداری مهارکننده ترپسین می‌باشد که ممکن است در جذب پروتئین اختلال ایجاد کند (۷). رژیم‌های غذایی با غلظت بالا مهارکننده‌های ترپسین ممکن است هیستومورفولوژی پانکراس را تغییر دهند (هیپرتروفی و هیپرپلازی) و منجر به هضم و جذب کم پروتئین و سپس جذب اسیدآمینه در جوجه‌های گوشتی شوند (۸). بنابراین، استفاده از پروتئازهای خارجی ممکن است یک راهکار مناسب برای افزایش قابلیت هضم پروتئین در جیره‌های غذایی حاوی دانه کینوا در جوجه‌های گوشتی باشد. تاکنون مطالعه‌ای در مورد تاثیر افزودن مکمل فیتاز به تنهایی یا در ترکیب با پروتئاز در جیره‌های غذایی حاوی دانه کینوا بر روی متابولیت‌های سرم، قابلیت هضم مواد مغذی و ویژگی‌های استخوان درشت نی جوجه‌های گوشتی انجام نشده است، بنابراین، مطالعه حاضر به‌منظور تعیین اثر افزودن آنزیم‌های فیتاز و پروتئاز بر متابولیت‌های سرم، عملکرد ایمنی، هضم مواد مغذی و خصوصیات استخوان در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با دانه کینوا انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در زمستان ۱۳۹۸ در یک مزرعه پرورش مرغ گوشتی واقع در استان مازندران شهرستان قائمشهر انجام گرفت. در این آزمایش از ۲۵۰ قطعه جوجه یک‌روزه گوشتی راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۵ تکرار و در هر تکرار از ۱۰ قطعه جوجه استفاده شد. جوجه‌ها به‌مدت ۴۲ روز با جیره‌های حاوی انرژی و پروتئین مشابه و در قالب سه برنامه تغذیه‌ای آغازین (۱۰-۱ روزگی)، رشد (۲۴-۱۱ روزگی) و پایانی (۴۲-۲۵ روزگی) تغذیه شدند. پرندگان در طول آزمایش دسترسی آزاد به خوراک و آب داشتند. جیره‌های آزمایشی شامل جیره شاهد (جیره پایه شامل ذرت و کنجاله سویا)، جیره شاهد مکمل شده با ۱۵درصد دانه کینوا به تنهایی یا مکمل شده با آنزیم فیتاز، آنزیم پروتئاز و ترکیب پروتئاز +فیتاز بودندکه بر اساس جداول احتیاجات جوجه‌های گوشتی نژاد راس فرموله شدند (۹). مواد تشکیل‌دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های آزمایشی پایه و جیره‌های حاوی دانه کینوا در جداول ۱و ۲ نشان داده شده است.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی: در سن ۲۸ روزگی از هر واحد آزمایشی ۱ قطعه جوجه به‌صورت تصادفی انتخاب و خونگیری از سیاهرگ بال انجام شد. جوجه‌ها قبل از خونگیری به‌مدت ۴ ساعت ناشتا نگه‌داری شدند. سپس با استفاده از سرنگ‌های ۳ سی‌سی، مقدار ۳ میلی‌لیتر خون از هر جوجه گرفته شد و بلافاصله بعد از خونگیری، خون به‌داخل لوله‌های آزمایشی حاوی ماده ضدانعقاد اتیلن دی‌آمین تترااسیداستیک منتقل شد. لوله‌های آزمایشی به آزمایشگاه انتقال داده شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (VISION مدل-VSCFN II ۱۵۰۰۰، ساخت کره) با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه

قرار گرفت تا سرم جداشود. بعداز جداسازی سرم، هریک از نمونه‌های سرم به لوله‌های آزمایش انتقال داده‌شد. پس از آن نمونه‌های موجود برای تعیین فراسنجه‌های خونی در زمان مشخص در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد و سپس غلظت فراسنجه‌های خونی شامل کلسترول، تری‌گلیسرید، پروتئین تام، ALT و AST با استفاده از کیت تشخیصی تهیه شده از شرکت پارس آزمون و غلظت فسفر و کلسیم با روش رنگ‌سنجی توسط اسپکتوفتومتر (UNICO۲۱۰۰ ساخت آمریکا) با طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

جدول ۱: اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های غذایی

مواد تشکیل دهنده خوراک (درصد)	دوره آغازین(۱۰-۱) روزگی	دوره رشد(۲۴-۱۱) روزگی	دوره پایانی(۴۲-۲۴) روزگی
دانه ذرت	۵۱/۰۷	۵۶/۵۱	۶۱/۷۱
کنجاله سویا (۴۵ درصد)	۴۱/۷۷۳	۳۶/۰۳۰	۳۰/۴۰۶
دی کلسیم فسفات	۱/۷۵۱	۱/۵۲۹	۱/۴۱۳
کربنات کلسیم	۱/۲۱۷	۱/۱۴۳	۱/۰۳۵
مکمل‌های ویتامینی	۰/۰۵۶	۰/۰۴۳	۰/۰۲۹
مکمل‌های معدنی	۰/۱۹۴	۰/۲۰۰	۰/۲۰۵
DL- متیونین	۰/۲۵۹	۰/۲۳۲	۰/۲۱۴
ال- لیزین	۰/۳۰۴	۰/۲۸۵	۰/۲۸۹
ال- ترئونین	۰/۰۰۷	۰/۰۰۷	۰
نمک معمولی	۰/۵۲۲	۰/۴۹۹	۰/۴۵۰
روغن سویا	۲/۸۴	۳/۵۱	۴/۲۴
ترکیب شیمیایی			
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم)	۳۰۰۰	۳۱۰۰	۳۲۰۰
پروتئین خام (درصد)	۲۳/۷	۲۱/۶	۱۹/۵
کلسیم (درصد)	۰/۹۶	۰/۸۷	۰/۷۹
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۴۸	۰/۴۳	۰/۴۰
متیونین (درصد)	۰/۴۷	۰/۵۱	۰/۵۶
لیزین (درصد)	۱/۱۶	۱/۲۹	۱/۴۴

مکمل ویتامینه و مواد معدنی به‌ازای هر کیلوگرم جیره: ویتامین A ۱۵۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین D3 ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین E ۲۰ میلی‌گرم، ویتامین K3 ۵ میلی‌گرم، ویتامین B2 ۵ میلی‌گرم، ویتامین B1 ۲ میلی‌گرم، ویتامین B12 ۰/۰۲ میلی‌گرم، ویتامین B6 ۲ میلی‌گرم، اسیدپانتوتنیک ۱۲ میلی‌گرم، بیوتین ۱/۰۱ میلی‌گرم، نیاسین ۲۵ میلی‌گرم، اسیدفولیک ۱ میلی‌گرم، مس ۵ میلی‌گرم، ید ۱ میلی‌گرم، منگنز ۷۰ میلی‌گرم، آهن ۵۰ میلی‌گرم، روی ۵۰ میلی‌گرم، سلنیوم ۰/۱ میلی‌گرم.

طول روده، ویسکوزیته ایلئومی و قابلیت هضم مواد مغذی:

در پایان آزمایش برای اندازه‌گیری طول روده، ۵ پرنده در هر تیمار به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و سپس کشته شدند. بعد از تخلیه امعاء و احشا، قسمت روده هر مرغ گوشتی به‌آرامی برداشته شد و طول بخش‌های مختلف روده کوچک ازجمله دئودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری ویسکوزیته ایلئومی، محتویات ایلئوم جمع‌آوری و بلافاصله در سانتریفیوژ ۳۰۰۰g به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس سوپرناتانت حاصل در ویال دو سی‌سی ریخته شدو در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید سپس با استفاده از ویسکومتر دیجیتال، ویسکوزیته اندازه‌گیری گردید (۱۰).

جدول ۲: اجزای تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های غذایی پایه + دانه کینوا

مواد تشکیل‌دهنده خوراک (درصد)	دوره آغازین(۱۰-۱) روزگی	دوره رشد(۲۴-۱۱)روزگی	دوره پایانی(۴۲-۲۴) روزگی
دانه ذرت	۴۲/۱۸	۴۷/۸۰	۵۲/۷۵
کنجاله سویا (۴۵درصد)	۳۵/۷۷	۳۲/۰۴	۲۶/۶۶
دانه کینوا	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰	۱۵/۰۰
دی کلسیم فسفات	۱/۷۸	۱/۵۴	۱/۴۲
کربنات کلسیم	۱/۲۳۰	۱/۱۵۱	۱/۰۴۲
مکمل‌های ویتامین	۰/۲۵۰	۰/۰۵۶	۰/۰۴۲
مکمل‌های معدنی	۰/۲۵۰	۰/۱۹۴	۰/۲۰۰
DL- متیونین	۰/۲۷۲	۰/۲۳۷	۰/۲۱۹
ال- لیزین	۰/۴۳۹	۰/۳۵۹	۰/۳۵۵
ال- ترئونین	۰/۰۶۵	۰/۰۳۵	۰/۰۱۹
نمک معمولی	۰/۴۵۰	۰/۴۹۱	۰/۴۴۲
روغن سویا	۰/۲۲	۱/۰۸	۱/۸۴
ترکیب شیمیایی			
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم)	۳۰۰۰	۳۱۰۰	۳۲۰۰
پروتئین خام (درصد)	۲۳	۲۱/۵	۱۹/۵
کلسیم (درصد)	۰/۹۶	۰/۸۷	۰/۷۹
فسفرموجود (درصد)	۰/۴۸	۰/۴۳	۰/۴۰
متیونین (درصد)	۰/۵۶	۰/۵۱	۰/۴۷
لیزین (درصد)	۱/۴۴	۱/۲۹	۱/۱۶

مکمل ویتامینه و مواد معدنی به ازای هر کیلوگرم جیره: ویتامین A ۱۵۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین D3 ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی، ویتامین E ۲۰ میلی‌گرم، ویتامین K3 ۵ میلی‌گرم، ویتامین B2 ۵ میلی‌گرم، ویتامین B1 ۲ میلی‌گرم، ویتامین B12 ۰/۰۲ میلی‌گرم، ویتامین B6 ۲ میلی‌گرم، اسیدپانتوتنیک ۱۲ میلی‌گرم، بیوتین ۱/۰۱ میلی‌گرم، نیاسین ۲۵ میلی‌گرم، اسیدفولیک ۱ میلی‌گرم، مس ۵ میلی‌گرم، ید ۱ میلی‌گرم، منگنز ۷۰ میلی‌گرم، آهن ۵۰ میلی‌گرم، روی ۵۰ میلی‌گرم، سلنیوم ۰/۱ میلی‌گرم.

به‌منظور اندازه‌گیری قابلیت هضم ایلئومی مواد مغذی در روز ۳۸ پرورش، به هر یک از جیره‌های آزمایشی ۰/۳ درصد اکسیدکروم

اضافه شد. سپس از هر تکرار یک پرنده به‌روش جابجایی گردن کشتار شده و پس از باز کردن محوطه شکمی، روده کوچک از محل زائده مکل تا دو سانتی‌متری محل اتصال روده کوچک به سکوم (تقریباً یک سوم انتهایی ایلئوم) برداشته شد. پس از شستشوی محتویات روده با آب مقطر و جمع‌آوری آن در یک ظرف برای هر تکرار، ظروف حاوی نمونه‌ها در برودت ۱۸ - درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و پس از خشک کردن، برای تعیین میزان اکسیدکروم، فسفر و کلسیم به آزمایشگاه ارسال شد. غلظت پروتئین، کلسیم، فسفر و اکسیدکروم در مواد هضمی ایلئومی و خوراک اندازه‌گیری شد. ضرایب قابلیت هضم براساس روش Salavati و همکاران محاسبه گردید (۱۱).

ویژگی‌های درشت نی و پاسخ ایمنی سلولی: برای بررسی ویژگی‌های استخوان درشت نی، ۵ پرنده انتخاب و به‌روش جابجایی گردن کشتار شدند و بلافاصله بعد از جمع‌آوری استخوان درشت‌نی، پوست و سایر بافت‌های استخوان جدا و مقاومت استخوان به‌روش Kocabagli (۱۲) و نیز ضخامت، قطر و طول استخوان درشت نی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری غلظت کلسیم، فسفر و خاکستر کل، ابتدا استخوان درشت نی به‌مدت ۱۶ ساعت در داخل آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از آسیاب‌نمودن در داخل کوره در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴ ساعت قرار گرفت و سپس غلظت کلسیم و فسفر استخوان (درصد از خاکستر) به‌ترتیب با استفاده از دستگاه جذب اتمی و اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. جهت‌اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی علیه SRBC (Sheep red blood cell) در روزهای ۲۸ و ۳۵ دوره پرورشی، ۲ قطعه پرنده‌از هر واحد آزمایشی انتخاب شد و ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون ۰/۵ درصد SRBC از طریق ورید بال به جوجه تزریق گردید و تولید آنتی‌بادی در پاسخ به SRBC باروش میکروتیتر هموگلوتیناسیون اندازه‌گیری شد (۱۳). هم‌چنین به‌منظور تعیین عیار پادتن تولید شده علیه واکسن گامبورو و نیوکاسل، دو هفته بعد از تزریق واکسن مربوط خونگیری از طریق سیاهرگ بال صورت گرفت. پس از استخراج سرم، عیار پادتن تولید شده علیه واکسن نیوکاسل و گامبورو از روش HI (Hemagglutination Inhibition test) و عیار پادتن ارزیابی گردید.و در روز ۴۲ دوره آزمایش، ۲ پرنده از هر تکرار به‌صورت تصادفی و پس از توزین ذبح گردیدند و وزن طحال و بورس فابریسیوس محاسبه گردید.

تحلیل آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SAS (۱۴)و رویه عمومی GLM استفاده گردید. میانگین تیمارهای آزمایشی نیز با استفاده از آزمون توکی در سطح معنی‌داری ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

فراسنجه‌های خونی: جدول ۳ میانگین فراسنجه‌های خونی شامل کلسترل، تری‌گلیسرید، عناصر کلسیم و فسفر و هم‌چنین آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP موجود در گروه‌های آزمایشی را نشان می‌دهد. استفاده از دانه کینوا و هم‌چنین آنزیم‌های فیتاز و پروتئاز منجر به کاهش سطح کلسترول، تری‌گلیسرید در مقایسه با نمونه شاهد شدند ($p<۰/۰۵$). با این وجود تفاوتی در محتوی پروتئین تام، کلسیم و فسفر بین تیمارهای مختلف وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). در ارتباط با آنزیم‌های کبدی به استثنای ALT که بین تیمارهای مختلف فاقد اختلاف معنی‌دار با نمونه شاهد بود آنزیم‌های Ast و Alp تحت تاثیر آنزیم‌های مورد استفاده در تیمارهای مختلف قرار گرفته به‌طوری‌که برای مثال فعالیت Alp نمونه‌های حاوی آنزیم و جیره پایه در مقایسه با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۵$).

طول اجزای روده: نتایج به‌دست آمده در جدول ۴ بیانگر آن است که استفاده از آنزیم‌های فیتاز و پروتئاز تاثیر معنی‌داری بر طول روده و بخش‌های مختلف آن دارد ($p<۰/۰۵$). به‌نحوی‌که بیش‌ترین اندازه دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم و کل طول روده به‌ترتیب مربوط به تیمار فیتاز+ پروتئاز، پروتئاز، پایه و فیتاز+ پروتئاز بود.

قابلیت هضم ایلئومی مواد مغذی و ویسکوزیته ایلئومی: نتایج به‌دست آمده در جدول ۵ بیانگر آن است که بیش‌ترین قابلیت هضم مواد مغذی پروتئین، کلسیم و فسفر مربوط به تیمار فیتاز+ پروتئاز می‌باشد ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین نتایج نشان داد که استفاده از دانه کینوا و آنزیم‌های فیتاز و پروتئاز در مقایسه با نمونه شاهد، تاثیری بر ویسکوزیته ایلئومی ندارد ($p>۰/۰۵$).

ویژگی‌های استخوان درشت نی: جدول ۶ بیانگر آن است که بیش‌ترین تنش عمودی مربوط به تیمار فیتاز+ پروتئاز و کم‌ترین آن مربوط به تیمار شاهد بود ($p<۰/۰۵$) و بیش‌ترین تنش افقی مربوط به تیمار فیتاز+پروتئاز و کم‌ترین آن مربوط به تیمار پایه بود ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین غلظت کلسیم و فسفر در استخوان درشت نی جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی آنزیم فیتاز و فیتاز+پروتئاز بیش‌تر از گروه شاهد بود و خاکستر کل نیز در استخوان درشت نی جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی آنزیم‌های فیتاز+پروتئاز بیش‌تر بود ($p<۰/۰۵$).

شاخص‌های ایمنی: نتایج جدول ۷ بیانگر آن است که تمامی شاخص‌های ایمنی به‌استثنای SRBC1، SRBC2، نیوکاسل و برونشیت و آنفولانزا تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند ($p<۰/۰۵$). به صورتی‌که بیش‌ترین سطح گامبورو مربوط به تیمار فیتاز+پروتئاز، بیش‌ترین وزن بورس مربوط به تیمار فیتاز+پروتئاز و بیش‌ترین وزن طحال مربوط به تیمار فیتاز+پروتئاز بود ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳: اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی بر حسب (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)

	شاهد (فاقد کینوا)	پایه (حاوی کینوا)	کینوا+فیتاز	کینوا+پروتئاز	کینوا+فیتاز+ پروتئاز	خطای استاندارد میانگین	سطح معنی‌داری
کلسترول	۱۳۸/۲۰^{a}	۱۲۷/۸۰^{ab}	۱۲۸/۰۰^{ab}	۹۳/۸۰^{b}	۹۰/۸۰^{b}	۸/۵۲	۰/۰۰۲
تری‌گلیسرید	۱۲۱/۰۰^{a}	۷۷/۲۰^{b}	۷۰/۸۰^{bc}	۵۵/۰۰^{bc}	۴۸/۲۰^{c}	۵/۸۲	۰/۰۰۱
ALT	۶/۴۰	۶/۸۰	۸/۶۰	۹/۸۰	۷/۰۲	۱/۰۵	۰/۱۵
AST	۳۷۴/۰۰^{a}	۳۰۵/۶۰^{ab}	۲۴۳/۸۰^{b}	۲۷۸/۸۰^{b}	۲۵۳/۶۰^{b}	۱۶/۱۴	۰/۰۰۰۱
ALP	۵۲۲۴/۸۰^{d}	۸۷۲۹/۴۰^{b}	۸۷۱۸/۴۰^{b}	۹۵۲۴/۶۰^{a}	۷۹۲۳/۴۰^{c}	۳۶/۷۷	۰/۰۰۱
پروتئین کل	۳/۷۰	۳/۸۴	۳/۲۸	۲/۹۴	۲/۸۶	۰/۵۳	۰/۶۱
کلسیم	۱۰/۵۲	۱۱/۲۰	۱۰/۱۴	۹/۴۶	۹/۵۴	۰/۷۷	۰/۶۰
فسفر	۸/۶۲	۸/۴۸	۷/۷۸	۷/۷۷	۷/۹۲	۰/۷۸	۰/۸۱

a، b و c: حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد (p<۰/۰۵).

جدول ۴: تاثیر تیمارهای آزمایشی بر طول اجزای روده (سانتی‌متر)

	شاهد (فاقد کینوا)	پایه (حاوی کینوا)	کینوا + فیتاز	کینوا + پروتئاز	کینوا + فیتاز+ پروتئاز	خطای استاندارد میانگین	سطح معنی‌داری
دئنوم	۳۰/۵۵	۳۱/۲۵	۳۱/۴۵	۳۳/۴۲	۳۴/۶۵	۱/۳۸	۰/۲۸
ژژنوم	۶۳/۳۹^{b}	۷۱/۸۵^{a}	۷۴/۴۵^{a}	۷۰/۷۲^{a}	۷۳/۹۸^{a}	۱/۲۱	۰/۰۰۱
ایلئوم	۶۴/۶۶^{b}	۷۳/۲۰^{a}	۷۱/۶۰^{a}	۶۷/۴۳^{ab}	۷۱/۰۲^{a}	۱/۵۳	۰/۰۰۵

a، b و c: حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد (p<۰/۰۵).

جدول۵: تاثیرتیمارهای آزمایشی بر قابلیت هضم ایلئومی مواد مغذی (برحسب درصد)

	شاهد (فاقد کینوا)	پایه (حاوی کینوا)	کینوا + فیتاز	کینوا + پروتئاز	کینوا + فیتاز+ پروتئاز	خطای استاندارد میانگین	سطح معنی‌داری
پروتئین خام (برحسب درصد)	۶۳/۱۸^{b}	۶۴/۱۴^{ab}	۶۵/۱۵^{ab}	۶۷/۰۸^{ab}	۶۸/۲۸^{a}	۱/۰۱	۰/۰۲
کلسیم (برحسب درصد)	۴۹/۷۵^{b}	۵۰/۲۶^{b}	۵۳/۷۵^{a}	۵۵/۱۲^{a}	۵۵/۵۹^{a}	۰/۶۰	۰/۰۰۱
فسفر (برحسب درصد)	۴۰/۲۴^{c}	۴۱/۷۵^{bc}	۴۳/۵۱^{abc}	۴۵/۵۰^{ab}	۴۶/۶۸^{a}	۰/۹۱	۰/۰۱
ویسکوزیته ایلئومی	۲/۶۴	۲/۴۳	۲/۳۴	۲/۴۰	۲/۴۵	۰/۱۳	۰/۶۱

a، b و c: حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد (p<۰/۰۵).

جدول۶: تاثیر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های استخوان درشت نی

	شاهد (فاقد کینوا)	پایه (حاوی کینوا)	کینوا + فیتاز	کینوا + پروتئاز	کینوا + فیتاز+ پروتئاز	خطای استاندارد میانگین	سطح معنی‌داری
تنش عمودی (پاسکال)	۵۲۹/۶۲^{d}	۵۴۴/۹۸^{c}	۶۵۸/۸۶^{b}	۵۵۴/۱۲^{c}	۶۷۳/۸۲^{a}	۱/۷۲۲	۰/۰۰۰۱
تنش افقی (پاسکال)	۱۷۹/۴۴^{c}	۱۸۲/۷۴^{c}	۲۶۸/۳۴^{b}	۱۸۵/۳۰^{c}	۲۸۵/۶۰^{a}	۰/۹۲۰	۰/۰۰۰۱
طول (میلی‌تر)	۹۱/۱۰	۹۱/۲۸	۹۱/۴۰	۹۱/۸۱	۹۱/۰۶	۰/۹۴	۰/۱۶
وزن (گرم)	۵/۹۸	۶/۰۱	۶/۰۹	۶/۳۲	۶/۳۵	۰/۳۲	۰/۸۸
قطر (میلی‌متر)	۱۱/۶۱	۱۱/۶۷	۱۱/۷۰	۱۱/۷۶	۱۱/۷۹	۰/۱۳۴	۰/۹۹
کلسیم (قسمت در میلیون)	۷۶/۱۶^{c}	۹۷/۳۳^{bc}	۷۶/۳۰^{c}	۸۲/۲۳^{ab}	۸۳/۶۲^{a}	۰/۸۸	۰/۰۰۰۱
فسفر (قسمت در میلیون)	۱۳۱/۸۰^{b}	۱۳۵/۴۰^{b}	۱۳۵/۰۴^{b}	۱۸۲/۳۷^{a}	۱۸۱/۳۵^{a}	۱/۷۶	۰/۰۰۰۱
کل خاکستر (قسمت در میلیون)	۴۰/۹۴^{bc}	۴۰/۰۹^{c}	۴۳/۱۷^{bc}	۴۴/۲۹^{ab}	۴۷/۴۱^{a}	۰/۵۷۵	۰/۰۰۵۵

a، b و c: حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد (p<۰/۰۵).

جدول۷: تاثیر تیمارهای آزمایشی بر ایمنی سلولی

	شاهد (فاقد کینوا)	پایه (حاوی کینوا)	کینوا + فیتاز	کینوا + پروتئاز	کینوا + فیتاز+ پروتئاز	خطای استاندارد میانگین	سطح معنی‌داری
(log2) SRBC1	۱/۵۹	۱/۸۵	۲/۲۲	۲/۲۹	۲/۲۹	۰/۲۷	۰/۲۴
(log2) SRBC2	۳/۱۶	۳/۲۷	۴/۰۲	۳/۷۰	۴/۱۳	۰/۴۳	۰/۴۳
نیوکاسل (log4)	۴/۲۹	۴/۷۴	۴/۸۵	۴/۸۱	۴/۷۳	۰/۴۶	۰/۹۱
گامبورو (log2)	۱۴۷۷۵^{b}	۱۴۱۰۴^{c}	۱۴۹۰۱^{b}	۱۳۱۶۶^{d}	۱۵۸۳۹^{a}	۴۷۳	۰/۰۰۱
برونشیت (log2)	۳۹۲۳	۲۶۱۸	۳۲۷۵	۲۳۹۰	۳۷۸۳	۳۰/۰۳	۰/۱۲
آنفولانزا (log4)	۲/۵۲	۳/۲۳	۲/۹۹	۲/۷۹	۲/۳۰	۰/۲۵	۰/۰۶
بورس (درصد)	۳/۳۵^{d}	۳/۶۹^{cd}	۳/۹۰^{c}	۴/۳۶^{b}	۵/۶۷^{a}	۰/۰۶۰	۰/۰۰۰۱
طحال (درصد)	۷/۰۲^{ab}	۶/۶۷^{b}	۵/۲۰^{c}	۴/۳۹^{d}	۷/۵۴^{a}	۰/۰۸۱	۰/۰۰۰۱

a، b و c: حروف غیرمشابه در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد (p<۰/۰۵).

بحث

در آزمایش حاضر، افزودن مکمل فیتاز و پروتئاز به جیره حاوی دانه کینوا باعث کاهش معنی‌دار غلظت سرمی کلسترول، تری گلیسیرید و فعالیت آنزیم AST شد (p<۰/۰۵). اطلاعات کمی در مورد تأثیر جیره‌های حاوی دانه کینوا بر متابولیت‌های خونی و فعالیت آنزیم‌های کبدی در جوجه‌های گوشتی وجود دارد. بااین‌حال، ومطابق با نتایج حاضر، گزارش شده است که برخی از اجزای فیتوشیمیایی مانند فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و ساپونین‌ها در دانه‌های کینوا یافت شده‌اند که می‌توانند بر متغیرهای بیوشیمیایی سرم در حیوانات تأثیر بگذارند(۱۵). اثر کاهندگی فیتواسترول‌ها روی کلسترول،به‌دلیل اختلال در جذب روده‌ای و احتمالاً کاهش لیپوپروتئین آئروژنیک در کبد و روده‌هاست. Liu و همکاران، نیز گزارش نمودند ساپونین‌ها باعث کاهش غلظت کلسترول و LDL خون می‌شوند که احتمال دارد دلیل این کاهش به‌خاطر تشکیل کمپلکس‌های نامحلول ساپونین‌ها با کلسترول در روده و ممانعت از جذب آن‌ها باشد (۱۶). از طرف دیگر گزارش شده است ساپونین‌ها از طریق کاهش میزان فعالیت آنزیم هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم A سنتتاز باعث کاهش ساخت کلسترول و لیپوپروتئین‌ها شده و نهایتاً باعث کاهش لیپیدهای جوجه گوشتی می‌شود (۱۶). هم‌چنین نوع آنزیم بر میزان کلسترول و تری‌گلیسرید خون اثر معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). با مقایسه بین آنزیم‌های فیتاز و پروتئاز مشاهده شد که میزان کلسترول و تری گلیسرید در جیره‌های حاوی آنزیم فیتاز بیش‌تر بوده است علت این امر را می‌توان بدین‌دلیل دانست که فیتات باتشکیل کمپلکس با نشاسته باعث غیرقابل استفاده شدن بخشی از نشاسته می‌شود و آنزیم فیتاز با شکستن این کمپلکس آن را آزاد کرده در نتیجه نشاسته حاصله می‌تواند به تری‌گلیسرید تبدیل شود، بنابراین آنزیم فیتاز می‌تواند باعث افزایش گلوکز و تری‌گلیسرید خون شود که این نیز با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. کبد به‌عنوان یک عضو مهم در تغذیه و متابولیسم طیور به دستکاری تغذیه‌ای حساس است. فعالیت آنزیم‌های کبدی در خون معمولاً به‌عنوان شاخص اصلی عملکرد و سلامت کبد درنظر گرفته می‌شود (۱۱). تحقیقات متفاوت نشان داده است که در جوجه‌های گوشتی دارای کبد سالم، فعالیت آنزیم‌هایی مانند AST و ALT در خون کاهش می‌یابد (۱۷). در بررسی منابع، هیچ مقاله‌ای در مورد اثرات مکمل‌های فیتازیا پروتئازها بر فعالیت آنزیم‌های کبدی در جوجه‌های گوشتی پیدا نشد. بنابراین نمی‌توان مقایسه مستقیم انجام داد. افزودن مکمل فیتازیا پروتئاز باعث افزایش طول قسمت‌های مختلف روده کوچک در جوجه‌های گوشتی شد. در یک مطالعه با جوجه‌های گوشتی، صفات لاشه مانند وزن لاشه گرم و وزن دستگاه گوارش تحت تأثیر مکمل فیتاز قرار نگرفت (۱۸). طی مطالعه‌ای بیان شد که استفاده از فیتاز به تنهایی یا همراه با زایلاناز باعث تغییر طول روده کوچک در جوجه‌های گوشتی نمی‌شود (۱۹). ضرایب قابلیت هضم روده‌ای پروتئین خام، کلسیم و فسفر در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی دانه کینوا همراه با فیتازیا پروتئاز بهبود یافت. داده‌های منتشر شده در مورد ضریب هضم روده‌ای پروتئین خام با داده‌های فعلی در مورد اثرات مکمل فیتاز و پروتئاز مطابقت دارد. به موازات این یافته‌ها، مکمل فیتاز و پروتئاز در جیره جوجه‌های گوشتی منجر به افزایش قابلیت هضم پروتئین خام و اسید آمینه شد (۲۰). علاوه بر این، افزودن مکمل‌های فیتاز و پروتئازها به‌صورت جداگانه در جیره حاوی کنجاله سویا، قابلیت هضم مواد مغذی و عملکرد جوجه‌های گوشتی تغذیه شده را بهبود بخشید (۲۱). افزودن آنزیم فیتازیا پروتئاز قابلیت هضم ظاهری روده پروتئین خام را افزایش داد (۲۲). چندین مطالعه اثر مثبت فیتاز را بر ضریب قابلیت هضم کلسیم یا فسفر در جوجه‌های

گوشتی نشان داد. مکمل فیتاز قابلیت هضم ایلئومی فسفر و پروتئین خام را در جوجه‌های گوشتی افزایش می‌دهد که با نتایج Olukosi و همکاران، مطابقت دارد (۲۳). مکمل فیتازیا پروتئاز باعث افزایش محتوای کلسیم و فسفر در استخوان درشت نی جوجه‌های گوشتی شد. مانند بسیاری از خوراک‌های گیاهی در طیور، دانه کینوا دارای سطوح بالای فیتات است که فسفر و سایر مواد مغذی متصل به آن را غیرقابل دسترس می‌کند بنابراین، افزودن آنزیم فیتاز خواص ضد تغذیه‌ای کمپلکس فیتات را از طریق دفسفوریلاسیون بهبود می‌بخشد و در نتیجه باعث بهبود قابلیت دسترسی فسفر و هم‌چنین سایر مواد مغذی می‌شود (۲۴). در تغذیه طیور، به‌طور گسترده مشاهده شده است که مکمل فیتاز در جیره‌های پایه باعث افزایش معدنی شدن استخوان می‌شود (۲۵). از طرفی تغییر شکل ساق پا یکی از شایع‌ترین مشکلات جوجه‌های گوشتی است که در ۳ درصد از کل گله به‌ویژه در ابتدای مرحله رشد ظاهر می‌شود. مطابق با نتایج ما، مکمل فیتاز در جیره جوجه‌های گوشتی باعث افزایش غلظت کلسیم، فسفر و خاکستر کل در این استخوان شد (۲۶). در این مطالعه، تیتر آنتی‌بادی علیه SRBC، NDV، IBV و آنفولانزا تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. با این‌حال، وزن نسبی طحال و بورس به‌عنوان اندام‌های ایمنی در جوجه‌های دریافت‌کننده مکمل پروتئاز و فیتاز بیش‌تر بود. در مقابل، مشاهده شده است که استفاده از مکمل فیتاز در جیره جوجه‌های گوشتی می‌تواند تعداد لنفوسیت‌ها و تیتر آنتی‌بادی علیه NDV را افزایش دهد، که نشان می‌دهد فیتاز ممکن است تأثیر مفیدی بر سلامت روده و عملکردهای ایمنی در جوجه‌های گوشتی داشته باشد (۲۷). از سوی دیگر، افزودن پروتئاز به جیره کم پروتئین هیچ تاثیری بر عملکرد ایمنی و تیتر آنتی‌بادی جوجه‌های گوشتی نداشت (۱۶). با توجه به نتایج این مطالعه، نتیجه‌گیری می‌شود که استفاده از آنزیم‌های فیتازیا پروتئاز در جیره غذایی حاوی دانه کینوا باعث تغییر برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم در جوجه‌های گوشتی می‌شود. هم‌چنین، افزودن مکمل فیتازیا پروتئاز به جیره‌های حاوی دانه کینوا می‌تواند باعث بهبود قابلیت هضم مواد مغذی، ایمنی یا برخی ویژگی‌های درشت نی در جوجه‌های گوشتی گردد.

منابع

1. **Nokandi, A., Hosseini-Vashan, S.J., Ghiasi, S.E. and Naeimipour-Yonesi, H., 2021.** Growth performance, blood indices, immune response, nutrient digestibility and intestinal morphology of broiler chickens fed processed quinoa seed (*Chenopodium quinoa* Willd). Iranian. J. Anim. Sci. 51: 285-297.
2. **FAO. 2011.** Quinoa: An ancient crop to contribute to world foodsecurity. Regional Office for Latin America and the Caribbean. 63 p.
3. **Outi, E.M., Emanuele, Z. and Elke, K.A., 2015.** Modifying the cold gelation properties of quinoa protein isolate: influence of heat-denaturation pH in the alkaline rang. Plant Foods Human Nutrition. 70: 250-256.
4. **Ruales, J. and Nair, B.M., 1993.** Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds. Food Chemistry. 48: 131-136.
5. **Rezaeipour, V., Barsalani, A. and Abdullahpour, R., 2016.** Effects of phytase supplementation on growth performance, jejunum morphology, liver health, and serum metabolites of Japanese quail fed sesame (*Sesamum indicum*) meal- based diets containing graded levels of protein, Trop. Anim. Heaith. Prod. 48: 1141-1146. Doi: 10,1007/s11250-016- 1066-x.
6. **Selle, P.H., Cowieson, A.J. and Ravindran, V., 2009.** Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. Livestock Science. 124: 126-141.
7. **Oboh, G. and Elusiyan, C., 2007.** Changes in the nutrient and anti-nutrient content of micro-fungi fermented cassava flour produced from low-and medium cyanide variety of cassava tubers. African Journal of Biotechnology. 6 p.
8. **Pacheco, W., Stark, C., Ferket, P. 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: 2245-2252.
9. **Aviagen, T., 2014.** Ross 308 Broiler Nutrition Specifications. Aviagen Group, Huntsville.
10. **Lázaro, R., Garcia, M., Medel, P. and Mateos, G., 2003.** Influence of enzymes on performance and digestive parameters of broilers fed rye-based diets. Poultry science. 82: 132-140.
11. **Salavati, M.E., Rezaeipour, V., Abdullahpour, R. and Musavi, S.N., 2021.** Biozactive Peptides from SesameMeal for Broiler Chickens; Its Influence on the Serum Biochemical Metabolit, Immunity Responses ans Nutrient Digestibility. Int. j. Pep. Res. Ther. 27: 1297-1303
12. **Kocabagli, N., 2001.** The effect of dietary phytase supplementation at different levels on tibial bone characteristics and strength in broilers. Turkish Journal Veterinary Animal Science. 25: 97-802.
13. **Wegmann, T.G. and Smithies, O., 1966.** A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. Transfusion. 6: 67-73.
14. **SAS. 1999.** SAS Statistics User's Guide. Statistical Analytical System, fifth revised ed. SAS Institute Inc, Carry, NC.
15. **Paśko, P., Sajewicz, M., Gorinstein, S. and Zachwieja, Z., 2008.** Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in Amaranthus cruentus and Chenopodium quinoa seeds and sprouts by HPLC. Acta chromatographica. 20: 661-672.
16. **Liu, S.Y., Cadogan, D.J., Peron, A., Truong, H.H. and Selle, P.H., 2014.** Effects of phytase supplementation on growth performance, nutrient utilisation and digestive dynamics of starch and protein in broiler chickens offered maize, sorghum- and wheat-based diets. Anim. Feed Sci. Technol. 197: 164-175.
17. **Corduk, M., Ceylan, N. and Ildiz, F., 2007.** Effect of dietary energy density and L-carnitine supplementation

on growth performance, carcass traits and blood parameters of broiler chickens. South african journal of animal science. 37: 65-73.

18. **Ghosh, A., Mandal, G., Roy, A. and Patra, A., 2016.** Effects of supplementation of manganese with or without phytase on growth performance, carcass traits, muscle and tibia composition, and immunity in broiler chickens. Livestock Science. 191: 80-85.

19. **Roofchaei, A., Rezaeipour, V., Vatandour, S. and Zaefarian, F., 2019.** Influence of dietary carbohydrases, individually or in combination with phytase or an acidifier, on performance, gut morphology and microbial population in broiler chickens fed a wheat-based diet. Animal Nutrition. 5: 63-67.

20. **Borda-Molina, D., Zuber, T., Siegert, W., Camarinha Silva, A., Feuerstein, D. and Rodehutscord, M., 2019.** Effects of protease and phytase supplements on small intestinal microbiota and amino acid digestibility in broiler chickens. Poultry science. 98: 2906-2918.

21. **Cowieson, A., Bedford, M., Selle, P. and Ravindran, V., 2009.** Phytate and microbial phytase: implications for endogenous nitrogen losses and nutrient availability. World's poultry science journal. 65: 401-418.

22. **Murugesan, G.R., Romero, L.F. and Persia, M.E., 2014.** Effects of protease, phytase and a *Bacillus* sp. direct-fed microbial on nutrient and energy digestibility, ileal brush border digestive enzyme activity and cecal short-chain fatty acid concentration in broiler chickens. PloS one. 9: e101888.

23. **Olukosi, O., González-Ortiz, G., Whitfield, H. and Bedford, M., 2020.** Comparative aspects of phytase and xylanase effects on performance, mineral digestibility, and ileal phytate degradation in broilers and turkeys. Poultry science. 99: 1528-1539.

24. **Walters, H., Coelho, M., Coufal, C. and Lee, J., 2019.** Effects of increasing phytase inclusion levels on broiler performance, nutrient digestibility, and bone mineralization in low-phosphorus diets. Journal of Applied Poultry Research. 28: 1210-1225.

25. **Viveros, A., Brenes, A., Arija, I. and Centeno, C., 2002.** Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broiler chicks fed different levels of phosphorus. Poultry Science. 81: 1172-1183.

26. **Singh, A., Walk, C., Ghosh, T., Bedford, M. and Haldar, S., 2013.** Effect of a novel microbial phytase on production performance and tibia mineral concentration in broiler chickens given low-calcium diets. British Poultry Science. 54: 206-215.

27. **Liu, N., Ru, Y., Cowieson, A., Li, F. and Cheng, X.C., 2008.** Effects of phytate and phytase on the performance and immune function of broilers fed nutritionally marginal diets. Poultry Science. 87: 1105-1111.