

اثرات استفاده از سطوح مختلف آرد میوه بلوط در جیره غذایی

بر تغییرات وزن پانکراس و بیان ژن کربوکسی پپتیداز پانکراس در جوجه‌های گوشتی

- **اسما مرادعلی پور** (نویسنده مسئول)
دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
- **مصطفی محقق دولت آبادی**
دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
- **محمد هوشمند**
استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۷۵۴۰۰۱۲۸

Email: moradalipoor.a70@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.120131.1609

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن کربوکسی پپتیداز پانکراس و تغییرات وزن پانکراس در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف آرد میوه بلوط بود. بدین منظور سه تیمار غذایی (شاهد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط) در قالب طرح کاملاً تصادفی از سن ۱ تا ۴۲ روزگی در اختیار جوجه‌های گوشتی قرار گرفت. در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی، تعداد ۳۶ قطعه جوجه‌ی گوشتی (۱۸ قطعه در هر سن، ۶ قطعه برای هر تیمار) کشتار گردید و وزن بدن و وزن پانکراس اندازه‌گیری شد. سپس از RNA بافت پانکراس استخراج و ساخت cDNA انجام شد. بیان ژن با استفاده از Real Time PCR و آنالیز داده‌ها با نرم‌افزارهای REST و SAS انجام شد. نتایج نشان داد که بیان ژن کربوکسی پپتیداز در جوجه‌های گوشتی که به مدت ۲۱ روز با تیمار ۱۵ درصد میوه بلوط تغذیه شده بودند، نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ($P < 0.05$). در سن ۴۲ روزگی، بیان ژن کربوکسی پپتیداز در جوجه‌های تغذیه شده با جیره حاوی ۲۰ درصد میوه بلوط نسبت به جوجه‌های تیمار ۱۵ درصد، به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود ($P < 0.05$). وزن نسبی پانکراس نیز در جوجه‌هایی که به مدت ۴۲ روز از تیمار ۲۰ درصد استفاده کرده بودند، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$). به‌طور کلی استفاده از میوه بلوط به‌عنوان جایگزین ذرت، باعث تغییر در بیان ژن کربوکسی پپتیداز، کاهش وزن بدن و افزایش وزن نسبی پانکراس شد و این تأثیرات به مقدار خوراک مصرفی، درصد بلوط مورد استفاده، طول دوره استفاده از آن و سایر عوامل بستگی دارد. مصرف غذای حاوی ترکیبات فنلی (میوه بلوط) بیان ژن‌ها را تغییر می‌دهد که به منظور درک مکانیسم‌های مولکولی عملکرد پلی‌فنل‌ها نیاز به انجام تحقیقات بیشتر می‌باشد.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 121 pp: 39-52

Effects of Different Levels of oak acorn in the diet on Pancreatic Weight and expression of pancreatic Charboxypeptidase gene in Broiler Chickens

By: A. Moradalipour^{1*}, M. Muhagheh-Dolatabady², M. Houshmand³

1. M.Sc Graduated of Genetics and Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj.

2. Associate professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj.

3. Assistant professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture Science, University of Yasouj.

Received: November 2017

Accepted: February 2018

The aim of this study was to evaluate the expression of pancreatic Charboxypeptidase gene and changes of pancreas weight of broiler chickens fed with different levels of oak acorn. For this purpose, three diets (control, 15% and 20% oak acorn) were fed to broilers during 1 to 42 days of age. On days 21 and 42, body weight and pancreatic weight of 36 broiler chickens (18 birds in each age, 6 birds /treatment) were measured. Then, the total RNA was extracted from the pancreatic tissue and cDNA was synthesized. Gene expression was performed using Real Time PCR and data were analyzed with the REST and SAS software. The gene expression results showed that mRNA expression levels of Charboxypeptidase gene were significantly higher in birds fed diet containing 15 percent oak acorn for 21 days compared to the control group ($P < 0.05$). On day 42, the gene expression in chickens fed with diet containing 20% oak was significantly lower in compared to 15% oak diet ($P < 0.05$). Pancreas relative weight was significantly increased in broilers fed with diet containing 20% oak acorn on day 42 ($P < 0.05$). Generally, the substitution of dietary corn with oak acorn led to a change in expression of Charboxypeptidase gene, reduction in body weight and an increase in the relative weight of the pancreas, and these effects depend on the feed intake, the percentage of oak acorn, time period of its use and other factors. The consumption of food containing phenolic compounds (oak acorn) can alter genes expression, which requires more research to understand the molecular mechanism of polyphenols function.

Key words: Broiler, Carboxypeptidase, Gene expression, Pancreatic hypertrophy, Phenolic compounds

مقدمه

غلات، متخصصان تغذیه را بر آن داشته تا به بررسی خوراک‌های جدید پردازند (Sharif و همکاران، ۲۰۱۲). یکی از خوراک‌هایی که اخیراً پرورش دهندگان جوجه‌های گوشتی از آن به عنوان یک منبع انرژی در تغذیه طیور استفاده می‌کنند، میوه درخت بلوط می‌باشد که حاوی مقادیر قابل توجهی نشاسته و چربی است (Saffarzadeh و همکاران، ۱۹۹۹). طی پژوهشی، جایگزینی بلوط تا سطح ۲۲/۵ درصد با ذرت در جیره جوجه‌های

پرورش طیور بخش جدایی ناپذیر صنعت دام در جهان می‌باشد و سهم قابل توجهی از نیاز پروتئینی جهان از این طریق تأمین می‌شود (Conolly, 2012). اما هزینه‌های بالای خوراک در صنعت طیور که حدود ۷۰ درصد کل هزینه‌های یک واحد تولیدی را شامل می‌شود، این صنعت را با مشکل مواجه کرده است. همچنین وارداتی بودن ذرت و سویا که از اقلام خوراکی عمده در تغذیه طیور هستند و نیز رقابت بین انسان و طیور در استفاده از دانه

فعالیت آنزیم‌های گوارشی کاهش یافته (Yuste و همکاران، ۱۹۹۲؛ Mahmood و همکاران، ۲۰۰۷؛ Mansoori و همکاران، ۲۰۰۷) و پانکراس با فعالیت زیاد خود، بزرگتر می‌شود (Ahmed و همکاران، ۱۹۹۱؛ Mahmood and Smithard, 1993؛ Mahmood و همکاران، ۱۹۹۷). ترکیبات فنلی تنظیم‌کننده‌ی فعالیت آنزیم‌های هدف و نیز تنظیم‌کننده‌ی بیان ژن هستند و می‌توانند باعث تغییر فعالیت‌های آنزیمی و رونویسی شوند (Kumari and Jain, 2012).

نوتریژنومیک (ژنومیک تغذیه‌ای)، اثر جیره و اجزای تشکیل‌دهنده‌ی آن را روی بیان ژن‌ها و چگونگی رونویسی DNA به mRNA و سپس تولید پروتئین بررسی می‌کند. همچنین این علم با بررسی اثر تغذیه بر اختلالات ژنتیکی می‌تواند به تغییر جیره غذایی کمک کند. یکی از روش‌های رایج برای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها در بافت‌های مختلف، Real Time PCR می‌باشد که امروزه این تکنیک به میزان گسترده‌ای برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dhar و همکاران، ۲۰۰۹؛ Weyrich و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه به اهمیت پانکراس در تولید آنزیم‌های گوارشی و نیز نقش آنزیم کربوکسی‌پپتیداز در هضم پروتئین‌ها، تغییرات بیان این ژن در بافت پانکراس جوجه‌های گوشتی که به مدت ۲۱ و ۴۲ روز از جیره‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط استفاده کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. انتظار می‌رود با توجه به این نتایج بتوان مناسب‌ترین مقدار میوه بلوط را به عنوان جایگزین بخشی از ذرت جیره به پرورش‌دهندگان جوجه‌های گوشتی توصیه کرد تا از هاپروتروپی پانکراس (افزایش اندازه سلول‌های پانکراس)، تغییر در بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز و به دنبال آن اختلال در هضم پروتئین و مواد مغذی جلوگیری کرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، تعداد ۲۶۴ قطعه جوجه گوشتی سویه کاب ۵۰۰ در ۳ تیمار آزمایشی با ۴ تکرار و هر تکرار شامل ۲۲ قطعه جوجه یک‌روزه (نر و ماده) در قالب طرح کامل تصادفی مورد بررسی

گوشتی، باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی، افزایش وزن و افزایش مصرف خوراک گردید (Bojarpour و همکاران، ۲۰۱۰). این میوه علاوه بر ترکیبات تغذیه‌ای مهم، دارای ترکیبات فنلی نظیر تانن‌ها (گالیک اسید و الاجیک اسید) می‌باشد که خاصیت ضد تغذیه‌ای داشته و از مواد محدودکننده‌ی مصرف میوه بلوط می‌باشند. مصرف این ترکیبات می‌تواند فرآیند گوارش را تحت تأثیر قرار دهد (McDougall و همکاران، ۲۰۰۸). وجود تانن‌ها در جیره طیور منجر به ضخیم شدن چینه‌دان، زخمی شدن دوازدهه و سائیدگی جداره‌های داخلی دستگاه گوارش شده است که در نتیجه باعث کاهش هضم مواد خوراکی می‌شود (Makkar, 2003).

پروتئین‌ها که از مهمترین اجزاء خوراک هستند، توسط پپسین به پلی‌پپتیدها شکسته شده و سپس توسط آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسینو الاستاز به پپتیدهایی با انتهای C تبدیل و در نهایت توسط کربوکسی‌پپتیدازها به اسیدهای آمینه و الیگوپپتیدها شکسته می‌شوند (Stevens and Hume, 1995). ترکیبات فنلی با اتصال به گروه‌های دارای بار مثبت موجود در ساختار پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، کاتیون‌های چند ظرفیتی و مواد معدنی از قبیل آهن، روی و کلسیم، باعث کاهش ارزش تغذیه‌ای خوراک می‌شوند (Khandelwal و همکاران، ۲۰۰۹). این ترکیبات از طریق تعامل با پروتئین‌ها، ساختار، عملکرد و کیفیت آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Yuksel و همکاران، ۲۰۱۰). تانن‌ها که ترکیبات فنلی با وزن مولکولی بالا می‌باشند، با پروتئین‌های داخلی بدن نظیر آنزیم‌های دستگاه گوارش باند می‌شوند و در نتیجه فعالیت آن‌ها را مهار کرده و مانع هضم پروتئین‌ها و سایر ماکرومولکول‌ها نظیر نشاسته می‌شوند (Rawel و همکاران، ۲۰۰۳). تانن این پتانسیل را دارد که ۱۲ برابر وزن خودش پروتئین‌ها را رسوب دهد (Jansman, 1993). بنابراین با اتصال به پروتئین، نشاسته و سایر ماکرومولکول‌ها، مقاومت آن‌ها را نسبت به حمله آنزیم‌های گوارشی افزایش داده و با این عمل قابلیت هضم این ماکرومولکول‌ها را کاهش می‌دهد (Mahmood و همکاران، ۲۰۰۸). همچنین با تشکیل کمپلکس تانن-آنزیم،

هیدرولیز) موجود در میوه بلوط مورد استفاده در این پژوهش به ترتیب ۹۱/۳۷، ۶/۵۳، ۵/۵۱ و ۶/۰۸ درصد بود. تنظیم جیره‌های آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و پایانی (۲۲ تا ۴۲ روزگی) با استفاده از نرم‌افزار UFFDA و بر اساس توصیه‌های NRC (۱۹۹۴)، صورت گرفت (جدول ۱).

قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل تیمار شاهد (جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره بر پایه ذرت-کنجاله سویا و بدون میوه بلوط) و تیمار ۱۵ و ۲۰ درصد (جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط) بود. میزان ماده خشک، پروتئین، فیبر و تانن (مجموع تانن متراکم و تانن قابل

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های مورد استفاده در آزمایش

| پایانی ^۱ | آغازین ^۱ | ترکیبات جیره (درصد) |
|----------------------|---------------------|--|
| ۶۱/۸۹ | ۵۶/۰۴ | ذرت |
| ۳۱/۲۴ | ۳۷/۱۷ | کنجاله سویا |
| ۱/۳۶ | ۱/۲۵ | کربنات کلسیم |
| ۱/۱۵ | ۱/۶۲ | دی کلسیم فسفات |
| ۳/۴۶ | ۲/۸۶ | روغن گیاهی |
| ۰/۲۵ | ۰/۲۵ | مکمل ویتامینه ^۲ |
| ۰/۲۵ | ۰/۲۵ | مکمل معدنی ^۳ |
| ۰/۳۲ | ۰/۴۲ | نمک |
| ۰/۰۶ | ۰/۱۴ | DL-متیونین |
| ۰/۰۲ | ۰ | لیزین |
| ترکیب مواد مغذی جیره | | |
| ۳۰۵۰ | ۲۹۵۰ | انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری در کیلوگرم جیره) |
| ۱۹/۰۶ | ۲۱/۲۰ | پروتئین خام (درصد) |
| ۰/۸۶ | ۰/۹۳ | کلسیم (درصد) |
| ۰/۳۳ | ۰/۴۲ | فسفر (درصد) |
| ۰/۱۴ | ۰/۱۸ | سدیم (درصد) |
| ۰/۳۶ | ۰/۴۶ | متیونین (درصد) |
| ۰/۹۵ | ۰/۹۹ | لیزین (درصد) |

۱. در جیره‌های حاوی میوه بلوط، این خوراک به میزان ۱۵ و ۲۰ درصد جیره، جایگزین ذرت شد بدون اینکه در درصد سایر مواد خوراکی جیره، تغییری داده شود.

۲. این مکمل در هر کیلوگرم جیره، مقادیر زیر را تأمین می‌نماید: ویتامین A: واحد بین‌المللی (IU) ۱۸۰۰۰، ویتامین D3: ۴۰۰۰ IU، ویتامین E: ۷۲ میلی‌گرم، ویتامین K3: ۴ میلی‌گرم، ویتامین B1: ۳/۵۵ میلی‌گرم، ویتامین B2: ۱۳/۲ میلی‌گرم، ویتامین B6: ۵/۸۸ میلی‌گرم، ویتامین B9: ۲ میلی‌گرم، ویتامین B12: ۰/۰۳ میلی‌گرم، پانتوتنات کلسیم: ۱۹/۶ میلی‌گرم، نیاسین: ۵۹/۴ میلی‌گرم، کلرید کولین: ۱ گرم.

۳. این مکمل در هر کیلوگرم جیره، مقادیر زیر را تأمین می‌نماید: منگنز: ۶۵ میلی‌گرم، روی: ۵۵ میلی‌گرم، آهن: ۵۰ میلی‌گرم، مس: ۸ میلی‌گرم، ید: ۱/۹۸۵ میلی‌گرم، سلنیوم: ۰/۴ میلی‌گرم.

دقیقه به منظور سنتز cDNA انجام شد. از ژل آگارز ۱ درصد نیز به منظور بررسی کیفیت cDNA سنتز شده استفاده شد. در تکنیک PCR کمی به منظور کمی سازی داده های حاصل از اندازه گیری سطوح mRNA، می توان میزان mRNA ژن هدف را نسبت به میزان mRNA یک ژن مرجع داخلی مورد سنجش قرار داد. بنابراین در این مطالعه دو ژن مرجع β -Actin و YWHAZ مورد استفاده قرار گرفت و از نرم افزار 2004 Bestkeeper (Pfaffl و همکاران، ۲۰۰۴) به منظور آنالیز پایداری بیان ژن های مرجع استفاده گردید. مشخصات آغازگرها در جدول ۲ آمده است. آغازگرهای ژن کربوکسی پپتیداز با استفاده از توالی mRNA این ژن در پایگاه (National Center for Biotechnology Information) NCBI توسط نرم افزار 3 primer طراحی شد و سپس با استفاده از نرم افزار BLAST از یکتا بودن محل اتصال جفت آغازگرها اطمینان حاصل شد. آغازگرهای ژن های YWHAZ و β -Actin از مقاله Yang و همکاران (۲۰۱۳) اقتباس شده است.

در پایان دوره آغازین (۲۱ روزگی) و همچنین پایان دوره آزمایش (۴۲ روزگی)، از هر تیمار به طور تصادفی شش قطعه جوجه (نر و ماده) انتخاب و پس از اندازه گیری وزن بدن، کشتار گردیدند. سپس بافت پانکراس هر جوجه به طور کامل جدا و وزن گردید. مراحل استخراج RNA از نمونه پودر شده بافت پانکراس (۱۰۰ میلی گرم) با استفاده از کیت استخراج RNX-Plus شرکت سیناژن و طبق دستورالعمل شرکت انجام گرفت. سپس برای اطمینان از عدم حضور DNA، RNA استخراج شده با آنزیم DNase I تیمار گردید. کمیت و کیفیت RNA استخراجی نیز با استفاده از اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. سنتز cDNA با استفاده از مسترمیکس لیوفلیزه بایونیر شرکت تکاپوزیست انجام شد. حجم نهایی میکروتیوب های حاوی مسترمیکس با ۲۰ پیکومول از آغازگر تصادفی هگزامر، ۶ میکرولیتر از نمونه های RNA و آب عاری از RNase به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) تحت شرایط دمای ۱۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای ۶۰ دقیقه و دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۵

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

| طول قطعه (bp) | توالی آغازگرها (۵' - ۳') | شماره دستیابی | نام آغازگر |
|---------------|--|---------------|------------------|
| ۱۳۹ | CTGTGCCCATCTATGAAGGCTA ATTCTCTCTCGGCTGTGGTG | NM-205518 | β -Actin |
| ۳۵۸ | TCCACCACGACAGACCA CCAGCCTTCCA ACTTCC | NM-001031343 | YWHAZ |
| ۱۷۳ | GGAACCATCGACTGGACCTA CAGTAGAGGTGACCCCGTGT | NM-204584 | Carboxypeptidase |

جوجه‌های گوشتی با استفاده از برنامه REST (Pfaffl و همکاران، ۲۰۰۲) و بر اساس تفاوت n -برابری بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با سطح ۱۵ و ۲۰ درصد آرد میوه بلوط نسبت به جوجه‌های گوشتی گروه شاهد محاسبه گردید. این نرم‌افزار برای بررسی تفاوت بیان mRNA از فرمول زیر استفاده می‌کند (Pfaffl, ۲۰۰۱).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{t}}_{\text{target}} (\text{MEAN}_{\text{control}} - \text{MEAN}_{\text{sample}})}}{(E_{\text{reference}})^{\Delta C_{\text{t}}_{\text{reference}} (\text{MEAN}_{\text{control}} - \text{MEAN}_{\text{sample}})}}$$

Ratio در این فرمول نشان‌دهنده‌ی مقایسه‌ی اختلاف بیان ژن‌ها در دو نمونه می‌باشد. E_{target} و E_{ref} به ترتیب بازده PCR ژن هدف و ژن مرجع و ΔC_{t} اختلاف Ct کنترل با نمونه هدف می‌باشد.

بیان ژن در هر تیمار با استفاده از نرم‌افزار SAS و رویه‌ی ANOVA نیز انجام شد (SAS, Institute, 2003). تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با مدل $Y = \mu + A_i + e_{ij}$ صورت گرفت که μ میانگین، A_i اثر تیمار و e_{ij} اثرات باقی‌مانده می‌باشد. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. همچنین از نرم‌افزار SAS برای محاسبه‌ی تغییرات وزن نسبی پانکراس استفاده شد.

نتایج و بحث

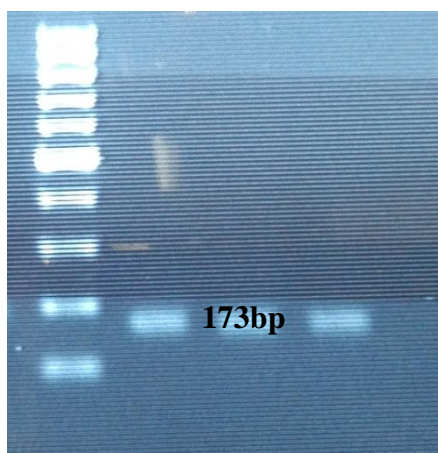
به منظور شناسایی ژن مرجع مناسب برای بافت پانکراس، نتایج حاصل از آنالیز ژن‌های مرجع با نرم‌افزار Bestkeeper 2004 در جدول ۳ آورده شده است.

به منظور ارزیابی تغییرات بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز، از واکنش PCR در زمان حقیقی استفاده شد که این کار با استفاده از مسترمیکس سیناژن Q-RT-PCR و با استفاده از دستگاه Real Time PCR, BIO RAD CFX, 96 انجام شد. مواد این واکنش برای هر نمونه حاوی ۴ میکرولیتر مسترمیکس سایرگرین، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت با غلظت ۱۰ پیکومول، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول، ۳ میکرولیتر آب DNase Free و ۲ میکرولیتر cDNA بود (حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر). برنامه‌ی حرارتی مورد استفاده برای واکنش Real time PCR ژن‌های مرجع شامل مرحله واسرشته سازی با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۵ چرخه در شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی)، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (اتصال آغازگرها)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (بسط آغازگرها) می‌باشد (Yang و همکاران، ۲۰۱۳). برنامه حرارتی برای ژن کربوکسی‌پپتیداز نیز شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۳۱ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با ۴۰ چرخه و در مرحله تفکیک نهایی (جهت ترسیم منحنی ذوب) در شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه بود.

به منظور محاسبه بازده PCR، از مخزن ژن حاوی کل cDNA، ۶ رقت در دو تکرار تهیه شد و نمودار استاندارد توسط دستگاه رسم شد. سپس بازده ژن مرجع و ژن هدف با استفاده از نرم‌افزار REST, 2009, V2.0.13 و از طریق فرمول $E = 10^{1/s} - 1$ (Kubista و همکاران، ۲۰۰۶) محاسبه شد. در این فرمول S نشان‌دهنده‌ی شیب خط می‌باشد. مقایسه‌ی بیان ژن در

جدول ۳- داده‌های توصیفی ژن‌های مرجع در سنین ۲۱ و ۴۲ روزگی

| ۴۲ روزگی | | ۲۱ روزگی | | |
|----------------|-------|----------------|--------|------------------------------|
| β -Actin | YWHAZ | β -Actin | YWHAZ | |
| ۱۸ | ۱۸ | ۱۸ | ۱۸ | تعداد داده‌ها |
| ۲۷/۸۲ | ۳۴/۲۵ | ۲۲/۵۷ | ۳۳/۷۴ | میانگین هندسی (Cq) |
| ۲۷/۸۳ | ۳۴/۳۰ | ۲۲/۶۱ | ۳۳/۸۰ | میانگین حسابی (Cq) |
| ۲۶/۰۱ | ۳۱/۲۲ | ۱۹/۵۷ | ۲۹/۸۵ | کمترین داده (Cq) |
| ۲۹/۱۰ | ۳۷/۲۶ | ۲۵/۵۹ | ۳۷/۷۱ | بیشترین داده (Cq) |
| ۰/۶۶ | ۱/۴۵ | ۰/۸۹ | ۱/۶۰ | انحراف استاندارد (\pm Cq) |
| ۲/۳۷ | ۴/۲۳ | ۳/۹۵ | ۴/۷۳ | ضریب تغییرات (Cq %) |
| -۳/۵۰ | -۸/۱۹ | -۸/۰۱ | -۱۴/۸۴ | min [x-fold] |
| ۲/۴۳ | ۸/۰۴ | ۸/۱۰ | ۱۵/۶۵ | max [x-fold] |
| ۱/۵۸ | ۲/۷۳ | ۱/۸۶ | ۳/۰۳ | std dev [\pm x-fold] |



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن کربوکسی پپتیداز روی ژل آگارز (۱٪)، نشانگر M100

در این پژوهش بیان ژن کربوکسی پپتیداز در جوجه‌های گوشتی که به مدت ۲۱ روز با جیره حاوی ۱۵ درصد آرد میوه بلوط تغذیه شده بودند، نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۴).

ژن β -Actin در هر دو دوره ۲۱ و ۴۲ روزگی از انحراف استاندارد و ضریب تغییراتی پایینی برخوردار می‌باشد. بنابراین این ژن با کمترین تنوع (انحراف استاندارد کمتر از ۱)، بیان پایدارتری دارد (Pfaffl و همکاران، ۲۰۰۴). تفاوت بین مقدار min [x-fold] و max [x-fold] نشان‌دهنده تفاوت بین کمترین حد بیان و بیشترین حد بیان داده‌های موجود در یک گروه نسبت به میانگین داده‌ها می‌باشد. ژن β -Actin با تفاوت بیان کمتر، دارای ثبات بیان بالاتری در شرایط آزمایشی (تیمارهای مختلف) بود. طبق این نتایج، β -Actin تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت، از این رو ژن مرجع مناسبی برای مطالعات بیان ژن‌های پانکراس می‌باشد. بنابراین از ژن β -Actin به منظور نرمال کردن داده‌های بیان ژن استفاده شد.

الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت و تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر تأیید شد. (شکل ۱).

جدول ۴- بیان نسبی ژن کربوکسی پپتیداز پانکراس در دو دوره ۲۱ و ۴۲ روزگی

| نتایج | سطح احتمال | بیان | تیمار | سن |
|-------------|------------|-------|-------------------------|----------|
| افزایش بیان | ۰/۰۱۷ | ۴/۲۴۶ | ۱۵ درصد نسبت به شاهد | ۲۱ روزگی |
| - | ۰/۱۴۷ | ۲/۵۳۳ | ۲۰ درصد نسبت به شاهد | |
| - | ۰/۴۰۵ | ۰/۵۹۷ | ۲۰ درصد نسبت به ۱۵ درصد | |
| - | ۰/۵۶۴ | ۱/۱۹۱ | ۱۵ درصد نسبت به شاهد | ۴۲ روزگی |
| - | ۰/۲۰۶ | ۰/۶۳۷ | ۲۰ درصد نسبت به شاهد | |
| کاهش بیان | ۰/۰۳۹ | ۰/۵۳۵ | ۲۰ درصد نسبت به ۱۵ درصد | |

شاهد: جیره شاهد بر پایه ذرت-کنجاله سویا (بدون استفاده از بلوط)، ۱۵ درصد: جیره حاوی ۱۵ درصد آرد میوه بلوط، ۲۰ درصد: جیره حاوی ۲۰ درصد آرد میوه بلوط.

پژوهشگران دلیل افزایش مصرف خوراک حاوی تانن را تلاش جوجه‌ها برای جبران کمبود انرژی ناشی از مصرف این جیره‌ها بیان نموده‌اند (Nyachoti و همکاران، ۱۹۹۶). بنابراین می‌توان گفت که با افزایش مصرف خوراک حاوی تانن در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار ۱۵ درصد، بیان ژن کربوکسی پپتیداز در این تیمار افزایش یافته است. به‌طور کلی تانن‌ها باعث افزایش تولید آنزیم‌های گوارشی توسط پانکراس می‌شوند و مهار فعالیت آنزیم‌ها در روده رخ می‌دهد (Griffiths and Moseley, 1980). همچنین می‌توان این‌گونه تفسیر نمود که با افزایش مصرف خوراک، پروتئین بیشتری دریافت شده و به دنبال آن بیان ژن کربوکسی پپتیداز نیز افزایش یافته است. افزایش فعالیت پروتئاز پانکراس با افزایش پروتئین غذا مشاهده می‌شود (Harmon, Swanson and 2002). به‌طور کلی بیان ژن به وسیله‌ی عوامل محیطی و با تغییر در غذای مصرفی تنظیم می‌شود (Scheele and Kern, 1989) و میزان ترشح هر کدام از آنزیم‌های هضمی، نوع و میزان ماده مصرفی را در خوراک تخمین می‌زند. در مراحل اولیه زندگی تولید آنزیم‌های گوارشی ناقص می‌باشد، بنابراین افزایش در بیان ژن آنزیم‌های گوارشی و افزایش ترشح آنزیم‌های هضمی، موجب بهبود عملکرد جوجه‌ها می‌شود. تحقیقات صورت گرفته توسط Lee و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که ترکیبات ضد میکروبی و ترکیبات فنلی مانند ترین‌ها و

انتظار می‌رفت با بالا رفتن درصد میوه بلوط و بیشتر بودن ترکیبات فنلی موجود در جیره، بیان ژن در این جوجه‌ها تغییرات بیشتری را نشان دهد، اما این تغییر در جوجه‌های تغذیه شده با تیمار ۲۰ درصد (سن ۲۱ روزگی) مشاهده نشد. بدین منظور مصرف خوراک جوجه‌ها در تیمارهای مختلف و در دوره آغازین (۱ تا ۲۱ روزگی) و کل دوره (۱ تا ۴۲ روزگی) بررسی شد (جدول ۵). نتایج نشان داد که در دوره آغازین، جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با تیمار ۱۵ درصد، مصرف خوراک بالاتری نسبت به جوجه‌های گوشتی تیمار ۲۰ درصد داشتند ($P < 0.05$) که با نتایج حاصل از مطالعات دیگر، مطابقت دارد (Houshmand و همکاران، ۲۰۱۵).

جدول ۵- اثر سطوح مختلف میوه بلوط بر مصرف خوراک جوجه‌های گوشتی

| تیمارهای آزمایشی | مصرف خوراک (g) | |
|------------------|-------------------|------------|
| | ۱-۲۱ روزگی | ۱-۴۲ روزگی |
| شاهد | ۹۶۶ ^{ab} | ۳۶۶۸ |
| ۱۵ درصد | ۹۸۴ ^a | ۳۸۲۹ |
| ۲۰ درصد | ۹۳۰ ^b | ۳۵۱۹ |
| SEM | ۱۴ | ۱۱۳ |
| P value | ۰/۰۴ | ۰/۵۲ |

شاهد: جیره شاهد بر پایه ذرت-کنجاله سویا (بدون استفاده از بلوط)، ۱۵ درصد: جیره حاوی ۱۵ درصد آرد میوه بلوط، ۲۰ درصد: جیره حاوی ۲۰ درصد آرد میوه بلوط. در هر ستون تفاوت ارقام با حروف نامشابه، معنی دار است ($P < 0.05$).

می‌کنند. Rezaei و Semnaninejad (۲۰۱۶) گزارش کردند که استفاده از سطوح ۱۰ و ۲۰ درصد میوه بلوط در جیره جوجه‌های گوشتی، مصرف خوراک، وزن و افزایش وزن بدن و نیز قابلیت هضم ماده خشک و پروتئین خام را به طور معنی‌داری کاهش داد. به طور کلی عوامل مختلفی مانند افزایش وزن، مصرف خوراک، بازده غذایی، منبع تانن و نوع ماده خوراکی مورد استفاده، غلظت تانن، عوامل حیوانی (گونه، سن و میزان تولید)، دوره تغذیه با تانن و ساختار جیره می‌توانند اثرات تانن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (Jansman, 1993). همچنین ساختار، وزن مولکولی و تعداد گروه‌های هیدروکسیل پلی‌فنل‌ها، نقش مهمی در ایجاد تعاملات ایفا می‌کنند (Hasni و همکاران، ۲۰۱۱).

در این پژوهش با افزایش درصد آرد میوه بلوط در جیره جوجه‌های گوشتی (۲۰ درصد) و نیز مصرف طولانی مدت آن (۴۲ روز)، وزن پانکراس نسبت به وزن زنده جوجه افزایش یافت ($P < 0.05$) (جدول ۶). مطالعات مختلف، دلیل افزایش وزن نسبی پانکراس در جوجه‌های تغذیه‌شده با یک منبع حاوی ترکیبات فنلی را مهار آنزیم‌های گوارشی توسط مواد ضد تغذیه‌ای نظیر تانن می‌دانند. تانن‌ها با ایجاد کمپلکس غیر قابل هضم تانن-آنزیم، مانع از فعالیت آنزیم‌ها گردیده و باعث بزرگ شدن اندازه پانکراس می‌شوند (Margaret and McNab, 1991).

تیمول (در سطح ۱۰۰ پی‌پی‌ام) در جیره جوجه‌های گوشتی، ترشحات آنزیمی پانکراس را با توجه به کامل نبودن فعالیت آنزیم‌های هضمی در جوجه‌های کم سن افزایش می‌دهد. Noy و Sklan (۱۹۹۵) گزارش کردند که مقدار آنزیم‌های آمیلاز، تریپسین و لیپاز در جوجه‌های ۲۱ روزه، به ترتیب به ۱۰۰، ۵۰ و ۲۰ برابر افزایش می‌یابد.

بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در جوجه‌های گوشتی که به مدت ۴۲ روز با تیمار ۲۰ درصد تغذیه شده بودند نسبت به جوجه‌های تغذیه‌شده با تیمار ۱۵ درصد، حدود ۵۰ درصد کاهش یافته است ($P < 0.05$) (جدول ۴). جیره حاوی ۲۰ درصد آرد میوه بلوط به علت دارا بودن مقادیر بیشتر مواد ضد تغذیه‌ای مانند تانن‌ها، خوشخوراک نبوده و به مقدار کمتر مصرف شده (غیر معنی‌دار)، بنابراین بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در جوجه‌های گوشتی ۴۲ روزه کم شده است. مطالعات دیگر نیز حضور مقادیر بالای تانن را عامل کاهش مصرف خوراک گزارش کرده‌اند (Acamovic و همکاران، ۲۰۱۲؛ Sharif and Brooker, 2005). کاهش در بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز و نیز کاهش فعالیت و ترشح آن، موجب کاهش هضم پروتئین می‌شود. همچنین تانن‌ها با اتصال به پروتئین، مانع از هضم آن‌ها توسط آنزیم‌ها می‌شوند و جذب مواد پروتئینی جیره را با مشکل مواجه

جدول ۶- اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن حقیقی و وزن نسبی پانکراس

| وزن حقیقی پانکراس (گرم) | | وزن نسبی پانکراس (درصد وزن بدن) | | تیمارهای آزمایشی |
|-------------------------|-----------|---------------------------------|------------|------------------|
| ۴۲ روزگی | ۲۱ روزگی | ۴۲ روزگی | ۲۱ روزگی | |
| ۴/۵۵±۰/۳۹ | ۲/۴۸±۰/۱۲ | ۰/۲±۰/۰۰۹ ^b | ۰/۳۳±۰/۰۰۷ | شاهد |
| ۴/۰۶±۰/۱۴ | ۲/۰۷±۰/۱۶ | ۰/۲±۰/۰۰۶ ^b | ۰/۳۴±۰/۰۱۶ | ۱۵ درصد |
| ۴/۳۷±۰/۳۴ | ۲/۴۳±۰/۱۲ | ۰/۲۵±۰/۰۰۲ ^a | ۰/۳۷±۰/۰۰۱ | ۲۰ درصد |

شاهد: جیره شاهد بر پایه ذرت-کنجاله سویا (بدون استفاده از بلوط)، ۱۵ درصد: جیره حاوی ۱۵ درصد آرد میوه بلوط، ۲۰ درصد: جیره حاوی ۲۰ درصد آرد میوه بلوط. داده‌ها به صورت Mean±SD ارائه شده‌اند.

a-b: در هر ستون تفاوت ارقام با حروف نامشابه، معنی‌دار است ($P < 0.05$).

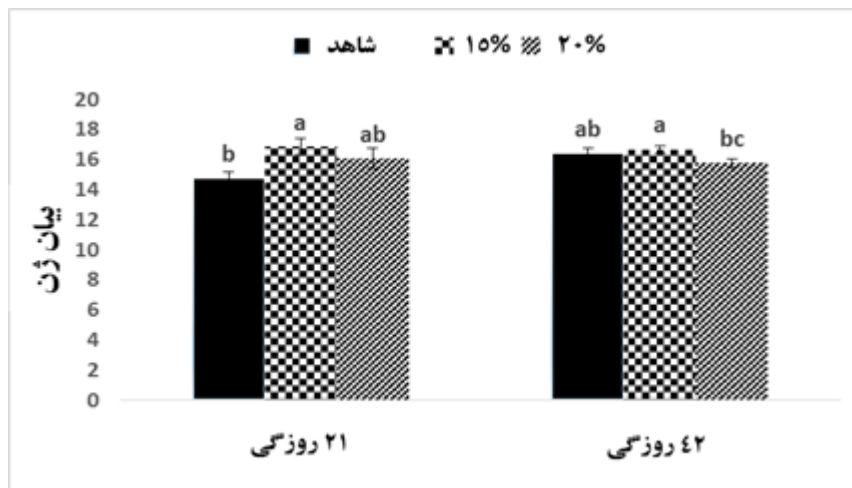
تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری نداشت ($P > 0.05$). بنابراین وزن بدن جوجه‌ها کاهش یافته بود ($P < 0.05$). کاهش وزن در دوره پایانی احتمالاً به دلیل آسیب دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی با مصرف ترکیبات ضد تغذیه‌ای موجود در میوه بلوط مانند تانن‌ها و فیبرها می‌باشد. از این رو می‌توان اینگونه تفسیر نمود که تغذیه با جیره حاوی ۲۰ درصد آرد میوه بلوط تا سن ۴۲ روزگی باعث کاهش غیرمعنی دار مصرف خوراک، کاهش دسترسی به پروتئین و به دنبال آن کاهش در وزن جوجه‌ها شده و بدین ترتیب بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز کاهش و وزن نسبی پانکراس افزایش یافته است. در پژوهشی بین اندازه پانکراس و اندازه بدن در جوجه خروس‌های گوشتی تغذیه شده با تانن خوراکی دانه سال یک رابطه معکوس مشاهده شد، این پژوهش‌گران گزارش کردند که فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل تریپسین، آلفا آمیلاز و دی پپتیداز تا حدودی تحت تأثیر وزن زنده و مصرف خوراک قرار دارد (Mahmood and Smithard, 1993).

میوه بلوط همچنین حاوی مقداری فیبر می‌باشد. برخی از منابع فیبر، وزن اندام‌های دستگاه گوارش را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Amerah و همکاران، ۲۰۰۹). این مواد دارای توانایی مهارکنندگی آنزیم‌ها نیز هستند و موجب هایپرتروفی پانکراس و در نهایت افزایش ترشحات پانکراس می‌شوند (Kratzer و همکاران، ۱۹۶۷). طی پژوهشی، بازدارنده‌های پروتئاز موجود در سویا ترشح آنزیم‌های آمیلاز، تریپسین، کیموتریپسین و پانکراتوپپتیداز پانکراس را افزایش، اما فعالیت آمیلاز و تریپسین را در مجرای روده کاهش دادند. این بازدارنده‌های پروتئاز با کاستن از فعالیت آنزیم در روده و در نتیجه آزادسازی کوله‌سیستوکینین، سبب بزرگ شدن پانکراس شدند (Gueguen و همکاران، ۱۹۹۳).

در این پژوهش بیان ژن کربوکسی‌پپتیداز در بافت پانکراس جوجه‌های گوشتی گروه شاهد در سن ۴۲ روزگی بیشتر از جوجه‌های گوشتی گروه شاهد در سن ۲۱ روزگی بود (شکل ۲). در واقع با افزایش سن، ترشح آنزیم‌های پانکراس بیشتر شد (Noy and Sklan, 1995).

پانکراس در هنگام تغذیه با جیره حاوی تانن، مجبور به انجام سوخت و ساز بیشتر (برای تولید آنزیم به منظور شکستن پیوندهای شیمیایی تانن و خنثی کردن اثرات آن) می‌شود و برای جبران مهار آنزیمی دچار هایپرتروفی می‌شود (Ahmed و همکاران، ۱۹۹۱). بر اساس مطالعات صورت گرفته، به کارگیری میوه درخت سال (*Shorea robusta*) در جیره جوجه‌های گوشتی به علت تانن زیاد موجود در آن، باعث کاهش قابلیت هضم پروتئین و کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده و پانکراس (تریپسین، کیموتریپسین و آلفا آمیلاز) می‌شود (Mahmood و همکاران، ۲۰۰۷؛ ۲۰۰۸) و اندازه پانکراس را افزایش می‌دهد (Mahmood و همکاران، ۱۹۹۷) که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد. در این مطالعه مصرف خوراک در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۲۰ درصد آرد میوه بلوط نسبت به تیمار ۱۵ درصد به‌طور غیر معنی داری کاهش یافته است و این کاهش اندک نیز می‌تواند یکی از عوامل افزایش وزن نسبی پانکراس باشد. در مطالعات مختلف، افزایش اندازه پانکراس با مصرف خوراک کمتر گزارش شده است (Acamovic and Brooker, 2005؛ Mahmood و همکاران، ۱۹۹۷). مصرف کمتر خوراک، فعالیت آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. فعالیت‌های کمتر آنزیم‌ها در پرندگان تغذیه شده با خوراک فاقد تانن، ممکن است به دلیل توانایی کوله‌سیستوکاینین (CCK) برای تحریک ترشحات پانکراس به روده، و مصرف کمتر خوراک باشد (Mahmood و همکاران، ۱۹۹۷). این پژوهش‌گران گزارش کردند که فعالیت پایین‌تر آنزیم‌ها در پرندگان تغذیه شده با دانه سال به دلیل مهار آنزیم با تشکیل کمپلکس تانن-آنزیم و یا به دلیل ترشح کمتر این آنزیم‌ها به داخل روده می‌باشد (Mahmood و همکاران، ۱۹۹۷). کاهش پاسخ سلول‌های آسینار به کوله‌سیستوکاینین در موش‌ها به دلیل محدودیت پروتئین، گزارش شده است (Prost and Belleville, 1991).

در پژوهش حاضر، وزن نسبی پانکراس در جوجه‌های گوشتی که تا ۴۲ روزگی با تیمار ۲۰ درصد تغذیه شده بودند، به‌طور قابل توجهی افزایش یافت ($P < 0.05$), در حالیکه وزن حقیقی پانکراس در بین



شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف بر بیان ژن کربوکسی پپتیداز پانکراس

شاهد: جیره شاهد بر پایه ذرت-کنجاله سویا (بدون استفاده از بلوط)، ۱۵٪: جیره حاوی ۱۵ درصد آرد میوه بلوط، ۲۰٪: جیره حاوی ۲۰ درصد آرد میوه بلوط.

نتیجه گیری کلی

این پژوهش برای اولین بار به بررسی بیان ژن کربوکسی پپتیداز در بافت پانکراس جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با آرد میوه بلوط پرداخت. در این پژوهش، مصرف بالای جیره حاوی ۱۵ درصد آرد میوه بلوط تا سن ۲۱ روزگی، باعث افزایش بیان ژن کربوکسی پپتیداز شد. همچنین سطح ۲۰ درصد آرد میوه بلوط در جیره و استفاده طولانی مدت از آن (۴۲ روز)، موجب کاهش بیان ژن کربوکسی پپتیداز، کاهش وزن بدن و افزایش وزن نسبی پانکراس شد در صورتی که مصرف جیره حاوی ۱۵ درصد آرد میوه بلوط تا سن ۴۲ روزگی این مشکل را ایجاد نکرد. بنابراین برای جلوگیری از افزایش وزن نسبی پانکراس و نیز جلوگیری از کاهش هضم مواد با ارزش پروتئینی (به دلیل نقش مهم آنزیم کربوکسی پپتیداز در هضم پروتئین)، و به دنبال آن کاهش وزن، توصیه می‌شود که در صورت مصرف طولانی مدت از آرد میوه بلوط در جیره جوجه‌های گوشتی، از سطوح پایین‌تر این میوه و یا از میوه فرآوری شده آن استفاده شود. همچنین به منظور کاهش اثرات منفی تانن‌ها، توصیه می‌شود از مقدار بیشتری پروتئین در جیره استفاده شود. الگوهای پاسخ به تغییرات محیطی و مکانیسم‌های مولکولی با بیان ژن‌های پانکراس در هر دو سطوح رونویسی و ترجمه تنظیم می‌شوند که نیاز به بررسی جامع در هر دو سطح دارد.

در مطالعه‌ای که بر روی آنزیم‌های گوارشی پانکراس و روده‌ی کوچک در نژاد مرغ قرمز جنگلی و مرغ گوشتی در سنین مختلف صورت گرفت، با افزایش سن، فعالیت آنزیم‌های پانکراس هم افزایش یافت (Khalid و همکاران، ۲۰۱۱). افزایش فعالیت آنزیم با افزایش سن به افزایش ظرفیت گیرنده‌های کوله‌سیستوکینین با میل ترکیبی بالا در سلول‌های آسینار پانکراس، بستگی دارد (Prost و همکاران، ۱۹۸۸). به‌طور کلی بیان افزایشی یا کاهش‌ی ژن‌ها ضرورتاً بیانگر افزایش یا کاهش پروتئین مورد نظر نیست اما می‌تواند نقطه شروع پاسخ‌های مولکولی باشد. در اینجا افزایش و کاهش بیان ژن‌ها و نیز افزایش وزن نسبی پانکراس، می‌تواند یک پاسخ سازگاری در برابر مصرف مواد حاوی ترکیبات فنلی (بلوط) باشد. پژوهشگران گزارش کردند، هورمون‌های زیادی توسط سوبستراهای تغذیه‌ای خاص (پروتئین، چربی یا کربوهیدرات) در غذا آزاد می‌شوند. این هورمون‌ها الگوهای انتخابی بیان ژن مربوط به پانکراس برون‌ریز را در پاسخ به تغییرات غذا میانجی‌گری می‌کنند و ساخت گروه‌های آنزیمی (پروتئینازها، لیپازها و گلیکوزیدازها) را تنظیم می‌کنند و به پانکراس اجازه می‌دهند تا با سطوح تغییرات سوبستراها در غذا سازگار شوند (Bieger and Scheele, 1980).

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقایان دکتر موسی زرین و دکتر رضا محمودی جهت همکاری در انجام پژوهش، صمیمانه قدردانی و تشکر بعمل می‌آید.

منابع

- Acamovic, T. and Brooker, J.D. (2005). Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*. 64:403-412.
- Ahmed, A.E., Smithard, R. and Ellis, M. (1991). Activities of enzymes of the pancreas, and the lumen and mucosa of the small intestine in growing broiler cockerels fed on tannin-containing diets. *British Journal of Nutrition*. 65:189-197.
- Amerah, A.M., Ravindran, V. and Lentle, R.G. (2009). Influence of insoluble fibre and whole wheat inclusion on the performance, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. *British Poultry Science*. 50(3):366-375.
- Bieger, W. and Scheele, G. (1980). Two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis of protein mixtures containing active or potentially active proteases. *Analytical biochemistry*. 109(2):222-230.
- Bojarpour, M., Bahmaninia, E., Ebrahimi, R. and Fayazi, J. (2010). Evaluate effects of different inclusion of oak kernel with determine food potential oak kernel substitute with corn seed on broiler chickens ration. *Research Journal of Biological Sciences*. 5:17-19.
- Conolly, A. (2012). Seminar presentation on pushing the boundaries performance and profit ability. Poultry International Magazine, Mark Clement, pp: 18.
- Dhar, A.K., Bowers, R.M., Licon, K.S., Veazey, G. and Read, B. (2009). Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. *Molecular Immunology*. 46:1688-1695.
- Griffiths, D.W. and Moseley, G. (1980). The effect of diets containing field beans of high and low polyphenolic content on the activity of digestive enzymes in the intestine of rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 31:255-259.
- Gueguen, J., Van Oort, M.G., Quillien, L. and Hessian, M. (1993). The composition, biochemical characteristics and analysis of proteinaceous antinutritional factors in legume seeds. *Publication-European Association for Animal production*. 70:9-9.
- Hamou, H., Bouderoua, K., Sisbane, I. and Mourot, J. (2012). Effect of green oak acorn based diet on performance and fatty acid composition of cooked breast meat. *International Journal of Applied Animal Sciences*. 1:94-101.
- Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R. and Tajmir-Riahi, H.A. (2011). Interaction of milk α and b-casein with tea polyphenols. *Food Chemistry*. 126:630-639.
- Houshmand, M., Hojati, F. and Parsaie, S. (2015). Dietary nutrient manipulation to improve the performance and tibia characteristics of broilers fed oak acorn (*Quercus Brantii Lindl*). *Brazilian Journal of Poultry Science*. 1:17-24.
- Jansman, A.J.M. (1993). Tannins in feedstuffs for simple stomached animals. *Nutrition Research Reviews*. 6:209-236.
- Khalid, K., Kadhim, A., Zuki, B.Z., Noordin, M.M., Babjee, S.M.A. and Zamri-Saad, M. (2011). Activities of amylase, trypsin and chymotrypsin of pancreas and small intestinal contents in the red jungle fowl and broiler breed. *African Journal of Biotechnology*. 10(1):108-115.

- Khandelwal, S., Udipi, S.A. and Ghuger, P. (2009). Polyphenols and tannins in Indian pulses: Effect of soaking, germination and pressure cooking. *Food Research International*. 43:526-530.
- Kratzer, F.H., Rajagura, R.W.A.S. and Vohra, P. (1967). The effect of polysaccharides on energy utilization, nitrogen retention and fat absorption in chickens. *Poultry Sciences*. 46:1489-1493.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 27(2):95-125.
- Kumari, M. and Jain, S. (2012). Tannins: an antinutrient with positive effect to manage diabetes. *Research Journal of Recent Sciences*. 2277-2502.
- Lee, K.W., Everts, H., Kappert, H.J., Frehner, M., Losa, R. and Beynen, A.C. (2003) Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *British Poultry Science*. 44:450-7.
- Mahmood, S., Ajmal Khan, M., Sarwar, M. and Nisa, M. (2008). Use of chemical treatments to reduce antinutritional effects of tannins in salseed meal: Effect on performance and digestive enzymes of broilers. *Livestock Science*. 116:162-170.
- Mahmood, S., Ajmal Khan, M., Sarwar, M., Nisa, M., Lee, W.S., Kim, S.B., et al (2007). Use of chemical treatments to reduce tannins and trypsin inhibitor contents in salseed (*Shorea robusta*) meal. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 20:1462-1467.
- Mahmood, S. and Smithard, R. (1993). A comparison of effects of body weight and feed intake on digestion in broiler cockerels with effects of tannins. *British Journal of Nutrition*. 70:701-709.
- Mahmood, S., Smithard, R. and Sarwar, M. (1997). Effects of salseed (*Shorea robusta*) tannins, restricted feed intake and age on relative pancreas weight and activity of digestive enzymes in male Broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 65 (1):215-230.
- Makkar, H.P.S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animal, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49:241-256.
- Mansoori, B., Nodeh, H., Modirsanei, M., Kiaei, M.M. and Farkhoy, M. (2007). Evaluating the influence of tannic acid alone or with polyethylene glycol on the intestinal absorption capacity of broiler chickens, using d-xylose absorption test. *Animal Feed Science and Technology*. 134:252-260.
- Margaret, L. and Mcnab, J.M. (1991). The inhibitory effects of hull polysaccharides a tannins of field beans (*Vicia faba L.*) on the digestion of amino acids, starch and lipid and on digestive enzyme activities in young chicks. *British Journal of Nutrition*. 65:199-216.
- McDougall, G.J., Kulkarni, N.N. and Stewart, D. (2008). Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors*. 34:73-80.
- National Research Council. (1994). *Nutrient requirements of poultry* (9th rev. ed). National Academy Press. Washington, DC.
- Noy, Y. and Sklan, D. (1995). Digestion and absorption in the young chick. *Poultry Science Journal*. 74:366-373.
- Nyachoti, C.M., Atkinson, J.L. and Lesson, S. (1996). Response of broiler chicks fed a high-tannin sorghum diets. *Journal of Applied Poultry Research*. 5:239-245.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 30(9):36-36.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-

