

تأثیر اندازه ذرات کربنات کلسیم و آنزیم فیتاز و نوع تغذیه بر عملکرد، کیفیت پوسته تخم مرغ و خصوصیات استخوان در مرغ های تخم گذار تجاری

• وحید صالحی^۱، رضا وکیلی (نویسنده مسئول)^۱، مهدی الهی ترشیزی^۲

۱- گروه علوم دامی، واحد کاشمر، دانشگاه آزاد اسلامی، کاشمر، ایران

۲- گروه علوم دامی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۴ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۴

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۳۱۶۸۵۱۰

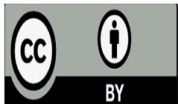
Email: reza.vakili@iau.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ASJ.2025.368004.2446

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثرات اندازه ذرات کربنات کلسیم، آنزیم فیتاز با و بدون تغذیه‌ی شبانه بر عملکرد، کیفیت تخم مرغ و استخوان، پارامترهای خونی و قابلیت هضم ظاهری مواد معدنی در مرغ های تخم گذار از سن ۶۰ تا ۷۲ هفته‌گی انجام شد. در مجموع ۷۲۰ قطعه مرغ تخم گذار Hy-line (W-36) در آرایش فاکتوریل ۲×۲×۲ بر اساس طرح کاملاً تصادفی با دو نوع اندازه ذرات کلسیم کربنات (۱۰۰ درصد ریز < ۰/۵ میلی متر) و ۷۵ درصد درشت (۲-۴ میلی متر) + ۲۵ درصد ریز، دو سطح آنزیم فیتاز (FTU/kg صفر و ۳۰۰) و تغذیه‌ی شبانه (با و بدون) قرار گرفتند. در طول آزمایش تأثیر معنی دار اندازه ذرات کربنات کلسیم بر بهبود ضریب تبدیل خوراک و استحکام استخوان درشت نی به دست آمد (P<۰/۰۵). آنزیم فیتاز به طور معنی داری منجر به بهبود ضریب تبدیل خوراک، درصد پوسته‌ی تخم مرغ و درصد خاکستر، کلسیم و فسفر درشت نی شد (P<۰/۰۵). تغذیه‌ی شبانه منجر به افزایش وزن تخم مرغ، درصد پوسته‌ی تخم مرغ و آلکالین فسفاتاز و کاهش غلظت سرمی کلسیم و فسفر شد (P<۰/۰۵). اثر متقابل اندازه ذرات کربنات کلسیم و فیتاز برای سطح کلسیم سرم معنی دار بود (P<۰/۰۵). به طور کلی، استفاده از فیتاز در جیره ها باعث بهبود ضریب تبدیل خوراک و کیفیت پوسته تخم مرغ و درشت نی شد و جیره های حاوی فیتاز و کربنات کلسیم با ذرات درشت تر باعث افزایش سطح کلسیم خون شدند. به طور کلی، نتایج نشان داد که استفاده از ذرات درشت تر کربنات کلسیم همراه با آنزیم فیتاز و برنامه تغذیه‌ی شبانه، موجب بهبود ضریب تبدیل خوراک، کیفیت پوسته تخم مرغ و استحکام استخوان شد. این ترکیب می تواند به عنوان یک راهکار تغذیه‌ای مؤثر برای ارتقای عملکرد تولیدی و سلامت استخوان در مرغان تخم گذار تجاری توصیه شود.

واژه‌های کلیدی: کربنات کلسیم، فیتاز، تغذیه شبانه، مرغ تخم گذار، اندازه ذرات.



Research Journal of Livestock Science No 150 pp: 167-182**The impact of limestone particle size, phytase enzyme, and midnight feeding on performance, egg shell quality, and bone characteristics in commercial laying hens**By: Vahid Salehi¹, Reza Vakili^{*1}, Mahdi Elahi Torshizi²

1: Department of Animal Science, Kash.C., Islamic Azad University, Kashmar, Iran

2: Department of Animal Science, Ma.C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran

* Corresponding author: E.mail: reza.vakili@iau.ac.ir Phone: +989153168510

Received: April 2025**Accepted: August 2025**

This study was conducted to evaluate the effects of calcium carbonate particles size, phytase supplementation with or without night feeding on performance, egg and bone quality, blood parameters, and apparent mineral digestibility in laying hens from 60 to 72 weeks of age. A total of 720 Hy-Line W-36 laying hens were assigned to a 2 × 2 × 2 factorial arrangement in a completely randomized design with two GMD of calcium carbonate [100% fine (<0.5 mm) and 75% coarse (2–4 mm) + 25% fine], two phytase levels (0 and 300 FTU/kg), and two feeding regimens (with or without night feeding). The results indicated that increasing particle size of calcium carbonate significantly improved feed conversion ratio (FCR) and tibia breaking strength (P<0.05). Phytase supplementation significantly enhanced FCR, eggshell percentage, and tibia ash, calcium, and phosphorus contents (P<0.05). Night feeding increased egg weight, eggshell percentage, and serum alkaline phosphatase, while it decreased serum calcium and phosphorus concentrations (P<0.05). A significant interaction between particle size of calcium carbonate and phytase was observed for serum calcium level (P<0.05). Overall, phytase supplementation improved FCR and eggshell and tibia quality, while diets containing phytase combined with coarser calcium carbonate particles increased serum calcium concentration. In conclusion, the use of coarser calcium carbonate particles together with phytase supplementation and night feeding improved feed conversion ratio, eggshell quality, and tibia strength. This combination can be recommended as an effective nutritional strategy to enhance productive performance and bone health in commercial laying hens.

Key words: Calcium carbonate, Phytase, Night feeding, Laying hens, particle size**مقدمه**

واقع شود (Ren و همکاران، ۲۰۱۹؛ Bouvarel و همکاران، ۲۰۱۱). بازجذب کلسیم از استخوان در مراحل پایانی تشکیل پوسته‌ی تخم مرغ لازم است، زیرا در هنگام شب و طی دوره‌ی تاریکی (پرنده به خوراک دسترسی ندارد) انجام می‌پذیرد. از آنجایی که هر دو عنصر کلسیم و فسفر در این هنگام آزاد می‌شوند، در نتیجه میزان فسفر پلاسما نیز افزایش می‌یابد. در نتیجه‌ی این آزادسازی، کیفیت استخوان کاهش یافته و به دلیل اثرگذاری بر میزان کلسیم استخوان، بر کیفیت پوسته نیز تاثیر منفی خواهد داشت (Saunders و همکاران، ۲۰۰۹). حدود دو سوم فسفر غلات به صورت اسید فایتيک می‌باشد که زیست فراهمی آن را

تلاش‌های بسیاری برای بهبود تولید و کیفیت پوسته‌ی تخم مرغ در زمینه‌های ژنتیک، شرایط محیطی و تغذیه‌ای، به ویژه تغذیه‌ی مواد معدنی انجام گرفته است (Nys، ۲۰۰۱). گزارش شده است که کیفیت پوسته‌ی تخم مرغ تحت تاثیر مصرف عناصر پرمصرف مانند کلسیم، فسفر و ویتامین D_۳ است (Koreleski و Swiatkiewicz، ۲۰۰۸). درک الگوهای مربوط به کلسیم و فسفر، متخصصان امر را در توسعه‌ی روش‌های تغذیه‌ای کارآمد کمک کرده و می‌تواند در جهت بهبود راندمان تولید و کیفیت تخم مرغ، کاهش ورودی فسفر خوراک و کاهش دفع فسفر به عنوان یک آلاینده‌ی زیستی در طیور تخم‌گذار مفید

تخمگذار واقع در شهرستان کاشمر (ظرفیت ۵۰۰۰۰ قطعه) انجام شد. مرغ‌ها در قفس‌های سیمی به طول ۵۲ سانتی‌متر، عرض ۳۴ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر نگهداری شدند. این آزمایش یک مرحله‌ی سازگاری سه هفته‌ای پرنده قبل از شروع آزمایش با جیره‌ی غذایی و شرایط جایگاه داشت. دما در حدود ۲۰ درجه-ی سانتی‌گراد بر اساس راهنمای پرورش ۱۷ ساعت نور و ۷ ساعت تاریکی حفظ شد. عملکرد پرندگان مورد بررسی قرار گرفتند و تخم‌ها جمع‌آوری و روزانه ثبت شدند. خوراک به صورت محدود و بر اساس کاتالوگ سویه پرورشی از ۹۰ گرم در روز در ابتدای دوره به ۱۱۰ گرم در پایان دوره‌ی آزمایشی رسید و مصرف آب به طور آزاد در طول آزمایش ارائه شد. دوره‌ی آزمایشی از ۶۰ تا ۷۲ هفته‌گی به طول انجامید.

تیمارها و جیره‌های آزمایشی

تعداد ۷۲۰ قطعه مرغ سویه Hy-line (W-36)، به‌طور تصادفی در ۸ تیمار، ۶ تکرار (۱۵ قطعه مرغ در هر تکرار) تقسیم‌بندی شدند. پرندگان به مدت ۱۲ هفته با دو اندازه ذرات کربنات کلسیم (۱۰۰ درصد ریز (کمتر از ۰/۵ میلی‌متر) و ۷۵ درصد درشت (۴-۲ میلی‌متر) +۲۵ درصد ریز) و دو سطح آنزیم فیتاز رونوزایم هایفوس، تولید شده از اسپرژیلوس اورایزا (صفر و ۳۰۰ واحد در کیلوگرم جیره) و دو شکل تغذیه‌ی شبانه (بدون تغذیه‌ی شبانه و با تغذیه‌ی شبانه) تغذیه شدند. در گروه‌هایی که جیره‌های نیمه‌شب دریافت کردند، غلظت کلسیم (Ca) در صبح کاهش یافت، در حالی که فسفر قابل دسترس (aP) افزایش یافت؛ از سوی دیگر، در عصر، غلظت کلسیم افزایش و میزان فسفر قابل دسترس به میزان ۲۰٪ کاهش یافت. جیره‌های آزمایشی بر اساس نیازهای توصیه شده برای سویه ۲۰۲۰ Hy-line (W-36) با استفاده از نرم افزار UFFDA تنظیم شدند که اجزای آن در جدول ۱ ارائه شده است.

برای پرنده کاهش می‌دهد، به همین دلیل استفاده از فسفات معدنی در جیره‌ی طیور توصیه می‌شود. استفاده از فیتاز قابلیت دسترسی فسفر موجود در غلات را افزایش داده و در نتیجه دفع فسفر کاهش می‌یابد (Abbasi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Guyot و Nys، ۲۰۱۱؛ Rao و همکاران، ۱۹۹۲). عبدعون و همکاران (۱۴۰۲) نشان دادند که میانگین هندسی قطر ذرات ریز و درشت کربنات کلسیم، ضخامت پوسته پوسته تخم مرغ را در مقایسه با اندازه متوسط افزایش داد. همچنین، گزارش شده است که افزودن ذرات درشت کلسیم در بعد از ظهر و یا روشن کردن چراغ‌ها به مدت دو ساعت طی شب و تغذیه‌ی پرنده، باعث همگام سازی کلسیم خوراک با تشکیل پوسته شده و قدرت استحکام پوسته‌ی تخم مرغ را بهبود می‌دهد و در نهایت برداشت کلسیم از استخوان و میزان فسفر پلاسما و دفع فسفر را کاهش می‌دهد (Grizzle و همکاران، ۱۹۹۲). Harms و همکاران (۱۹۹۶) عنوان کردند که روشنایی حدود ۴۵ دقیقه‌ای طی نیمه شب، سبب بهبود کیفیت پوسته‌ی تخم مرغ‌ها می‌شود. علاوه بر این، اثر مثبت فیتاز بر بهبود عملکرد و قابلیت هضم فسفر و کلسیم در طیور تخم‌گذار نیز گزارش شده است (Lim و همکاران، ۲۰۰۳).

با توجه به اهمیت کلسیم و فسفر در جیره‌ی مرغان تخم‌گذار و اثرات بارز آن‌ها بر کیفیت پوسته‌ی تخم مرغ و عملکرد پرندگان و همچنین به دلیل تاثیر تغذیه‌ی شبانه بر بهره‌وری این دو ماده‌ی معدنی مهم، هدف از این مطالعه بررسی همزمان اثرات اندازه ذرات کربنات کلسیم، آنزیم فیتاز و تغذیه‌ی شبانه بر عملکرد، کیفیت استخوان و متابولیت‌های خونی در مرغان تخم‌گذار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پرندگان و جایگاه پرورش

به‌منظور انجام این مطالعه، ۷۲۰ قطعه مرغ تخم‌گذار (Hy-line W36) در سن ۶۰ هفته‌گی به‌طور تصادفی در قفس‌های سه طبقه قرار گرفتند. مطالعه‌ی حاضر در واحد پرورش مرغ -

جدول ۱- مواد خوراکی و ترکیبات شیمیایی جیره ها

جیره عصر	جیره صبح	جیره کنترل	اقلام خوراکی (%)
۶۱/۳۸	۶۱/۳۸	۶۱/۳۸	ذرت
۲۳/۸۶	۲۳/۸۶	۲۳/۸۶	کنجاله سویا (۴۴٪ پروتئین)
۲/۳۰	۲/۳۰	۱/۹۸	روغن سویا
۱۲/۵۴	۷/۶۳	۱۰/۰۸	کربنات کلسیم
۰/۹۵	۱/۶۲	۱/۲۹	دی کلسیم فسفات
۰/۳۵	۰/۳۴	۰/۳۵	کلرید سدیم (نمک طعام)
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل ویتامینه ^۱
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل معدنی ^۲
۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۱	دی ال- متیونین
ت ترکیب شیمیایی (%)			
۲۸۰۰	۲۸۰۰	۲۸۰۰	انرژی قابل متابولیسم (کیلو کالری/کیلوگرم)
۱۵/۲۰	۱۵/۲۰	۱۵/۲۰	پروتئین خام
۵/۰۲	۳/۳۴	۴/۱۸	کلسیم
۰/۲۹	۰/۴۳	۰/۳۶	فسفر قابل دسترس
۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	سدیم
۰/۷۰	۰/۷۰	۰/۷۰	لیزین
۰/۳۵	۰/۳۵	۰/۳۵	متیونین
۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۵۷	متیونین+سیستئین
۰/۳۹	۰/۵۹	۰/۴۹	

اندازه ذرات کربنات کلسیم (۱۰۰ درصد ریز: میلی متر ۰/۵ < و ۷۵ درصد درشت (۴-۲ میلی متر) +۲۵ درصد ریز) و دو سطح آنزیم فیتاز رونوزایم هایفوس، تولید شده از اسپرژیلوس اورایزا (صفر و ۳۰۰ FTU در کیلوگرم جیره). در گروه های دریافت کننده جیره ی نیمه شب، در صبح، غلظت کلسیم و فسفر به ترتیب ۲۰ درصد کاهش و افزایش یافت، در حالی که در عصر، غلظت کلسیم و فسفر به ترتیب ۲۰ درصد افزایش و کاهش یافت. ^۱ ویتامین A، ۲۵۰۰۰۰۰ واحد بین المللی، ویتامین D3، ۸۶۰۰۰۰ واحد بین المللی؛ ویتامین E، ۲۰۰۰۰ واحد بین المللی؛ ویتامین K3، ۱۰۰۰ میلی گرم؛ پانتوتینیک اسید، ۵۰۰۰ میلی گرم؛ پیریدوکسین، ۱۶۰۰ میلی گرم؛ تیامین ۱۰۰۰ میلی گرم؛ ویتامین B12، ۵/۲ میلی گرم؛ ویتامین PP، ۲۰۰۰۰ میلی گرم؛ بیوتین، ۶۰ میلی گرم؛ اسید فولیک ۶۰۰ میلی گرم؛ آهن، ۱۰۰۰۰ میلی گرم؛ روی، ۱۴۰۰۰ میلی گرم؛ منگنز، ۱۶۰۰۰ میلی گرم؛ مس، ۳۲۰۰ میلی گرم؛ I، ۴۰۰ میلی گرم؛ سلنیوم، ۴۰ میلی گرم.

شاخص های مورد ارزیابی

به منظور بررسی ویژگی های تخم مرغ ها، در پایان دوره ی آزمایش، از هر تکرار دو تخم مرغ به طور تصادفی انتخاب شد. طول و عرض تخم مرغ ها با استفاده از کولیس دیجیتال (اوگاو، ژاپن) با دقت ۰/۰۱ میلی متر اندازه گیری شد و سپس با تقسیم عرض تخم مرغ بر طول آن، شاخص شکل تخم مرغ به دست آمد. برای اندازه گیری درصد پوسته ی تخم مرغ، پس از شکستن، پوسته ی تخم مرغ را

ویژگی های عملکردی شامل درصد تولید تخم مرغ، وزن تخم مرغ (گرم)، توده ی تخم مرغ (گرم/روز)، مصرف خوراک روزانه (گرم/روز) و ضریب تبدیل خوراک (گرم/گرم) محاسبه شد. مصرف خوراک هر واحد آزمایشی از تفاوت بین مقدار جیره ی توزیع شده و مقدار جیره ی باقیمانده محاسبه شد. ضریب تبدیل خوراک با تقسیم مصرف خوراک بر توده ی تخم مرغ تعیین شد.

آهن، روی و منیزیم تعیین شد (Salehi و همکاران، ۲۰۲۵). جهت بررسی شاخص های خونی نمونه های خون از ورید بال شش مرغ در هر تیمار در ۷۰ هفتگی جمع آوری شد. - جداسازی سرم با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با دور Rpm 3000 و به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. مقادیر پروتئین سرم، آلومین، کلسیم، فسفر، آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز سرم به وسیله اسپکتوفتومتر اتوآنالایزر مدل A-15 (Bio systems S. A- Costa) Brava 30, 08030 Barcelona, Spain با استفاده از کیت های تجاری (پارس آزمون، تهران، ایران) تعیین شد. در سن ۷۲ هفتگی، شش قطعه پرنده از هر تیمار (یک پرنده از هر قفس) به طور تصادفی انتخاب و کشتار شدند. استخوان درشت نی چپ از هر پرنده برای ارزیابی درصد خاکستر، کلسیم، فسفر، طول و قطر و استحکام برداشته شد. پس از جداسازی گوشت و بافت های نرم از هر استخوان درشت نی، استخوان ها در کوره خشک شده و طول و قطر آنها در ناحیه دیافیز با استفاده از میکرومتر دیجیتال با دقت ۱ میکرون (سری ۵۰۰، میتوتویو، توکیو، ژاپن) اندازه گیری شد. استخوان ها وزن شدند و استحکام آن ها با استفاده از دستگاه Universal Testing Machine Instron (مدل H5KS، Tinius Olsen Company) تعیین شد (Mirakzehi و همکاران، ۲۰۱۳). خاکستر استخوان درشت نی به صورت درصدی از وزن خشک آن محاسبه شد (حمدی و همکاران، ۲۰۱۵). درصد کلسیم و فسفر نیز با روش طیف سنجی پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES; Spectro Arcos) (System, Germany, model 76004555) اندازه گیری شد (Coon و Leske، ۲۰۰۲).

آنالیز آماری

این آزمایش بصورت طرح کاملا تصادفی و در قالب آزمایش فاکتوریل ۲×۲×۲ با ۸ تیمار آزمایشی، ۶ تکرار و ۱۵ پرنده در هر تکرار به مدت ۱۲ هفته انجام شد. داده های آزمایش جهت مطالعه اثرات اندازه ذرات کربنات کلسیم و دو سطح آنزیم فیتاز با استفاده از نرم افزار SAS (9.1) رویه GLM تجزیه و تحلیل

جدا کرده و به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد و پس از خارج کردن و سرد شدن، وزن آن ها را اندازه گیری کرده و به صورت درصد بیان شد (Salehi و همکاران، ۲۰۲۵). به منظور بررسی خصوصیات کیفی تخم مرغ، پس از جمع آوری تخم مرغ ها در پایان هر دوره آزمایشی، نمونه گیری به صورت تصادفی از هر تیمار انجام شد. شاخص زرده و سفیده بر اساس نسبت وزن هر جزء به وزن کل تخم مرغ محاسبه گردید. برای تعیین ضخامت پوسته نیز پس از خشک شدن پوسته ها، اندازه گیری در سه نقطه (نوک، پهلو و انتهای تخم مرغ) با استفاده از میکرومتر دیجیتال انجام شد و میانگین آن ها به عنوان ضخامت پوسته در نظر گرفته شد.

به منظور اندازه گیری قابلیت هضم ظاهری کلسیم، فسفر، آهن، روی و منیزیم از هر واحد آزمایشی یک قطعه پرنده با شرایط ظاهری سالم انتخاب و به طور تصادفی به قفس های متابولیکی با قابلیت جمع آوری فضولات منتقل شدند. پرندگان به مدت هشت روز با جیره های آزمایشی تغذیه شدند که چهار روز اول به منظور دوره عادت پذیری و چهار روز بعد به عنوان دوره اندازه گیری مصرف خوراک و جمع آوری فضولات در نظر گرفته شد. در دوره جمع آوری فضولات، پس از اعمال ۲۴ ساعت گرسنگی، سینی های مخصوص جمع آوری فضولات در زیر قفس ها تعبیه شد. پرنده ها به مدت سه روز کامل به صورت آزاد با جیره های آزمایشی تغذیه شدند و پس از اعمال ۲۴ ساعت محرومیت از خوراک، سینی های جمع آوری فضولات برداشته شدند. مقدار خوراک مصرفی پرندگان در هر قفس در سه روز آزمایش با کسر خوراک باقی مانده از خوراک داده شده تعیین شد. فضولات و نمونه های خوراک در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت - خشک شد. فضولات خشک شده، به مدت دو ساعت در شرایط آزمایشگاهی قرار گرفته تا با شرایط محیط به تعادل برسد. پر و سایر ضایعات احتمالی جدا و وزن کل فضولات دفع شده هر قفس تعیین شد. از خوراک های آزمایشی و فضولات دفعی نمونه گرفته و به روش AOAC (۲۰۰۵) در آزمایشگاه میزان قابلیت هضم ظاهری کلسیم، فسفر،

($P < 0/05$). همچنین، در رابطه با اثرات اصلی فیتاز، مشاهده شد که استفاده از فیتاز در جیره‌ی مرغان تخم گذار به‌طور چشمگیری ضریب تبدیل خوراک را کاهش داد ($P < 0/05$). تغذیه‌ی شبانه سبب بهبود وزن تخم مرغ در پرندگان شد ($P < 0/05$). اثرات اصلی فاکتورهای مورد مطالعه بر سایر پارامترهای اندازه‌گیری شده معنی دار نبود ($P > 0/05$). اثرات متقابل نیز تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند (جدول ۲).

آماري شد. مقایسه‌ی میانگین‌ها بر اساس آزمون توکی و در سطح ۵ درصد انجام شد. در مواردی که اثرات متقابل معنی دار نبود جدول مربوطه گزارش نشد.

نتایج

عملکرد رشد

نتایج این تحقیق نشان داد افزایش اندازه ذرات کربنات کلسیم (از ریز به درشت) به‌طور معنی‌داری سبب بهبود ضریب تبدیل خوراک در مرغان تخم‌گذار از سن ۶۰ تا ۷۲ هفتگی گردید

جدول ۲- اثرات اندازه ذرات کربنات کلسیم، آنزیم فیتاز و تغذیه شبانه بر صفات عملکردی مرغان تخم‌گذار در سنین ۶۰ تا ۷۲ هفتگی.

اثرات اصلی*	تولید تخم مرغ (درصد)	وزن تخم مرغ (گرم)	توده تخم مرغ (گرم/روز)	مصرف خوراک روزانه (گرم/روز)	ضریب تبدیل خوراک (گرم/گرم)
اندازه ذرات کربنات کلسیم					
ریز	۷۶/۶۳	۶۳/۸۸	۵۰/۱۷	۹۹/۹۳	۲/۰۱ ^a
درشت	۷۵/۸۶	۶۴/۲۹	۴۹/۴۷	۹۹/۴۲	۱/۹۵ ^b
P-value	۰/۶۲	۰/۲۰	۰/۶۰	۰/۶۰	۰/۰۴
SEM	۱/۱۰۴	۰/۲۲۳	۰/۹۳۲	۰/۶۳۹	۰/۰۱۷
فیتاز					
صفر	۷۶/۵۱	۶۴/۳۱	۴۹/۸۲	۹۹/۸۷	۲/۰۰ ^a
۳۰۰	۷۵/۹۸	۶۳/۸۶	۴۹/۸۳	۹۹/۴۸	۱/۹۴ ^b
P-value	۰/۷۰	۰/۱۷	۰/۹۹	۰/۷۰	۰/۰۳
SEM	۱/۱۰۴	۰/۲۲۳	۰/۹۳۲	۰/۶۳۹	۰/۰۱۸
تغذیه شبانه					
بدون	۷۵/۷۱	۶۳/۵۱ ^b	۴۹/۴۶	۹۹/۴۷	۱/۹۹
با	۷۶/۷۸	۶۴/۶۷ ^a	۵۰/۱۸	۹۹/۸۸	۱/۹۷
P-value	۰/۵۰	۰/۰۰۷	۰/۶۰	۰/۷۰	۰/۲۰
SEM	۱/۱۰۴	۰/۲۲۳	۰/۹۳۱	۰/۶۳۹	۰/۰۱۷

* میانگین اندازه ذرات کربنات کلسیم: ۱۰۰ درصد ریز: ۰/۵ میلی‌متر < و ۷۵ درصد درشت (۴-۲ میلی‌متر) +۲۵ درصد ریز؛ آنزیم فیتاز رونوزایم هایفوس، تولید شده از اسپرژیلوس اورایزا (صفر و ۳۰۰ FTU در کیلوگرم جیره). در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی جیره نیمه شب، در صبح، غلظت کلسیم و فسفر به ترتیب ۲۰ درصد کاهش و افزایش یافت، در حالی که در عصر، غلظت کلسیم و فسفر به ترتیب ۲۰ درصد افزایش و کاهش یافت. حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/05$). SEM: خطای استاندارد میانگین.

قابلیت هضم ظاهری کلسیم، فسفر، آهن، روی و منگنز

هیچ یک از فاکتورهای مورد بررسی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند ($P > 0.05$).

اثرات اصلی اندازه ذرات کربنات کلسیم، آنزیم فیتاز و تغذیه‌ی شبانه بر قابلیت هضم ظاهری کلسیم، فسفر، آهن، روی و منگنز در سنین ۶۰ تا ۷۲ هفتگی به ترتیب در جدول ۳ گزارش شده است.

جدول ۳- اثرات اندازه ذرات کربنات کلسیم، فیتاز و تغذیه شبانه بر قابلیت هضم ظاهری عناصر معدنی در مرغان تخم‌گذار - در سنین ۶۰ تا ۷۲ هفتگی.

اثرات اصلی*	کلسیم (درصد)	فسفر (درصد)	منیزیم (درصد)	روی (درصد)	آهن (درصد)
اندازه ذرات کربنات کلسیم					
ریز	۵۲/۸۴	۴۲/۸۴	۲۳/۰۲	۳۴/۰۵	۲۲/۴۰
درشت	۵۲/۶۲	۴۲/۳۹	۲۲/۷۲	۳۳/۲۵	۲۱/۷۱
P-value	۰/۷۳	۰/۱۷	۰/۴۶	۰/۲۲	۰/۱۷
SEM	۰/۴۱۹	۰/۲۲۸	۰/۲۹۲	۰/۳۵۸	۰/۳۵۱
فیتاز					
صفر	۵۲/۸۷	۴۰/۶۶	۲۳/۱۵	۳۲/۹۶	۲۱/۹۱
۳۰۰	۵۲/۵۹	۴۱/۵۸	۲۲/۵۹	۳۳/۵۲	۲۳/۱۹
P-value	۰/۶۵	۰/۷۹	۰/۱۸	۰/۳۹	۰/۵۶
SEM	۰/۴۲۹	۰/۲۳۳	۰/۲۹۹	۰/۳۵۸	۰/۳۵۱
تغذیه شبانه					
بدون	۵۲/۶۳	۴۱/۵۰	۲۲/۷۵	۳۳/۵۷	۲۱/۸۶
با	۵۲/۸۳	۴۲/۷۴	۲۳/۰۴	۳۳/۹۰	۲۲/۲۴
P-value	۰/۷۵	۰/۴۷	۰/۵۶	۰/۵۲	۰/۴۴
SEM	۰/۴۱۹	۰/۲۲۸	۰/۲۹۲	۰/۳۵۸	۰/۳۵۱

* اندازه ذرات کربنات کلسیم: ۱۰۰ درصد ریز: ۰/۵ میلی‌متر < و ۷۵ درصد درشت (۴-۲ میلی‌متر) +۲۵ درصد ریز؛ آنزیم فیتاز رونوزایم هایفوس، تولید شده از اسپرژیلوس اورایزا (صفر و FT هر هفته ۳۰۰ در کیلوگرم جیره). در گروه های دریافت کننده‌ی جیره نیمه شب، در صبح، غلظت کلسیم و فسفر به ترتیب ۲۰ درصد کاهش و افزایش یافت، در حالی که در عصر، غلظت کلسیم و فسفر به ترتیب ۲۰ درصد افزایش و کاهش یافت. حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.05$). SEM: خطای استاندارد میانگین.

صفات کیفی تخم مرغ

استفاده از سیستم تغذیه‌ی شبانه نیز سبب افزایش معنادار درصد پوسته‌ی تخم مرغ شد ($P < 0.05$). اثر اصلی اندازه ذرات کربنات کلسیم و اثرات متقابل فاکتورها بر سایر صفات مورد مطالعه معنادار نبود ($P > 0.05$).

نتایج مربوط به اثرات اصلی فاکتورهای مورد مطالعه بر شاخص زرده، شاخص سفیده، شاخص شکل و درصد پوسته‌ی تخم مرغ در سنین ۶۰ تا ۷۰ هفتگی به ترتیب در جدول ۴ آورده شده است. نتایج نشان داد که افزودن فیتاز (۳۰۰ FTU در کیلوگرم جیره) سبب افزایش درصد پوسته‌ی تخم مرغ شد ($P < 0.05$). همچنین،

جدول ۴- اثرات اندازه ذرات کربنات کلسیم، آنزیم فیتاز و تغذیه شبانه بر شاخص های کیفی تخم مرغ در مرغان تخم‌گذار در سنین ۶۰ تا ۷۲ هفتگی.

اثرات اصلی ^۱	شاخص زرده	شاخص سفیده	شاخص شکل	درصد پوسته تخم مرغ
اندازه ذرات کربنات کلسیم				
	ریز	۱۰/۰۵	۷۵/۴۳	۸/۶۱
	درشت	۱۰/۰۸	۷۵/۶۵	۸/۵۴
P-value		۰/۷۸	۰/۵۵	۰/۵۰
SEM		۰/۱۷۶	۰/۲۵۶	۰/۰۷۲
فیتاز				
	صفر	۱۰/۱۰	۷۵/۳۴	۸/۴۵ ^b
	۳۰۰	۱۰/۰۹	۷۵/۷۴	۸/۷۱ ^a
P-value		۰/۷۸	۰/۲۸	۰/۰۲
SEM		۰/۱۷۶	۰/۲۵۴	۰/۰۷۲
تغذیه شبانه				
	بدون	۹/۹۱	۷۵/۳۲	۸/۴۶ ^b
	با	۱۰/۱۷	۷۵/۷۵	۸/۶۹ ^a
P-value		۰/۳۰	۰/۲۵	۰/۰۳
SEM		۰/۱۷۶	۰/۲۵۶	۰/۰۷۲

پارامترهای خونی

اثرات اصلی و متقابل اندازه ذرات کربنات کلسیم، فیتاز و تغذیه‌ی شبانه بر غلظت‌های پروتئین سرم، آلبومین، کلسیم، فسفر، آسپاراتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز سرم خون در سنین ۶۰ تا ۷۲ هفتگی به ترتیب در جداول ۵ و ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که افزایش میانگین هندسی اندازه ذرات کربنات کلسیم در جیره سبب افزایش سطح کلسیم سرم پرندگان شد ($P < 0/05$). در رابطه با اثرات اصلی تغذیه‌ی شبانه، در پرندگانی که جیره‌ی نیمه شب دریافت کردند سطح کلسیم و فسفر سرم به‌طور معناداری کمتر از پرندگانی بود که با جیره‌ی شبانه تغذیه نشدند ($P < 0/05$). در حالی که سطوح آلکالین فسفاتاز سرم در پرندگان دریافت کننده‌ی جیره‌ی نیمه

شب به‌طور معناداری بیشتر از پرندگان دیگر بود ($P < 0/05$). اثر متقابل دوگانه میانگین اندازه ذرات کربنات کلسیم و فیتاز بر سطح کلسیم سرم تحت تاثیر تیمارها قرار گرفت ($P < 0/05$ ، بطوریکه نتایج اثر متقابل فیتاز و میانگین هندسی اندازه ذرات کربنات کلسیم نشان داد که استفاده از فیتاز همراه با ذرات درشت کربنات کلسیم منجر به افزایش معنی‌دار سطح کلسیم نسبت به سایر تیمارها شد ($P < 0/05$). به‌طوری‌که بیشترین مقدار در تیمار حاوی فیتاز و ذرات درشت کربنات کلسیم مشاهده گردید، در حالی که کمترین مقدار مربوط به تیمار بدون فیتاز و با ذرات ریز کربنات کلسیم بود.

جدول ۵- اثرات اندازه ذرات کربنات کلسیم، آنزیم فیتاز و تغذیه شبانه بر شاخص های خونی مرغان تخم گذار در سنین ۶۰ تا ۷۲ هفتگی.

اثرات اصلی*	کلسیم (میلی گرم/دسی لیتر)	فسفر (میلی گرم/دسی لیتر)	پروتئین کل (گرم/دسی لیتر)	آلبومین (گرم/دسی لیتر)	آسپاراتات آمینوترانسفراز (واحد/لیتر)	آلانین آمینوترانسفراز (واحد/لیتر)	آلکالین فسفاتاز (واحد/لیتر)
اندازه ذرات کربنات کلسیم							
ریز	۱۶/۲۳ ^b	۵/۷۰	۶/۶۵	۲/۲۴	۲۱۲/۴۸	۸/۷۰	۸/۸۷
درشت	۱۷/۷۵ ^a	۶/۳۵	۷/۰۸	۲/۲۳	۲۲۱/۶۹	۹/۳۸	۶۱۲/۹۱
P-value	۰/۰۳	۰/۰۶	۰/۰۹	۰/۹۵	۰/۴۰	۰/۲۰	۰/۱۸
SEM	۰/۲۳۳	۰/۱۶۳	۰/۱۲۴	۰/۰۸۳	۷/۵۸۰	۰/۳۶۸	۲۰/۴۶۷
فیتاز							
صفر	۱۶/۵۹ ^b	۵/۹۲	۶/۷۳	۲/۲۷	۲۰۷/۵۸	۸/۸۹	۱/۲۶
۳۰۰	۱۷/۳۷ ^a	۶/۳۰	۷/۰۰	۲/۲۰	۲۲۶/۵۹	۹/۱۹	۶۰۴/۵۲
P-value	۰/۰۲	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۵۸	۰/۰۹	۰/۵۷	۰/۱۰
SEM	۰/۲۳۳	۰/۱۶۳	۰/۱۲۴	۰/۰۸۳	۷/۵۸۰	۰/۳۵۹	۲۰/۴۶۷
تغذیه شبانه							
بدون	۱۷/۴۶ ^a	۶/۴۰ ^a	۶/۷۸	۲/۱۵	۲۱۴/۰۸	۸/۷۵	۵۵۶/۲۸ ^b
با	۱۶/۵۰ ^b	۵/۸۲ ^b	۶/۹۵	۲/۳۲	۲۲۰/۰۸	۹/۳۳	۶۲۹/۴۹ ^a
P-value	۰/۰۰۵	۰/۰۲	۰/۳۴	۰/۱۷	۰/۵۹	۰/۲۷	۰/۰۱
SEM	۰/۲۳۳	۰/۱۶۳	۰/۱۲۴	۰/۰۸۳	۷/۳۹۷	۰/۳۶۸	۲۰/۴۶۷

* اندازه ذرات کربنات کلسیم: ۱۰۰ درصد ریز: ۰/۵ میلی متر < و ۷۵ درصد درشت (۴-۲ میلی متر) + ۲۵ درصد ریز؛ آنزیم فیتاز رونوزایم هایفوس، تولید شده از اسپرژیلوس اورایزا (صفر و ۳۰۰ FTU در کیلوگرم جیره). در گروه های دریافت کننده جیره نیمه شب، در صبح، غلظت کلسیم و فسفر به ترتیب ۲۰ درصد کاهش و افزایش یافت، در حالی که در عصر، غلظت کلسیم و فسفر به ترتیب ۲۰ درصد افزایش و کاهش یافت. حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار می باشد (SEM, P<۰/۰۵): خطای استاندارد میانگین.

جدول ۶- اثرات اندازه ذرات کربنات کلسیم، آنزیم فیتاز و تغذیه شبانه بر شاخص های خونی مرغان تخم گذار در سنین ۶۰ تا ۷۲ هفتگی

اثرات متقابل دو طرفه*		کلسیم (میلی-گرم/دسی لیتر)	فسفر (میلی-گرم/دسی لیتر)	پروتئین کل (گرم/دسی لیتر)	آلبومین (گرم/دسی لیتر)	آسپاراتات آمینوترانسفراز (واحد/لیتر)	آلآنین آمینوترانسفراز (واحد/لیتر)	آلکالین فسفاتاز (واحد/لیتر)	
ذرات کربنات کلسیم	فیتاز	۱۶/۴۶ ^b	۵/۹۹	۷/۰۸	۱/۲۶	۲۲۳/۰۵	۹/۰۰	۱/۸۳	
ریز	۳۰۰	۱۵/۹۹ ^b	۵/۷۴	۶/۲۳	۱/۲۲	۲۰۱/۹۰	۸/۴۰	۱/۹۰	
ریز	صفر	۱۷/۲۸ ^a	۶/۶۰	۱/۹۴	۱/۱۴	۲۳۰/۱۳	۹/۳۸	۶۳۷/۲۰	
درشت	۳۰۰	۱۶/۵۲ ^{ab}	۶/۱۱	۱/۲۳	۱/۳۲	۲۱۳/۲۵	۹/۳۸	۵۸۸/۶۲	
درشت	صفر	۰/۰۴	۱/۶۱	۱/۰۸	۱/۳۷	۱/۸۵	۱/۵۷	۱/۶۲	
P-value		۰/۳۲۹	۰/۲۳۰	۰/۱۷۶	۰/۱۱۸	۱۰/۹۷۲	۰/۵۲۰	۲۹/۶۲۶	
SEM									
ذرات کربنات کلسیم	تغذیه شبانه	۱۶/۹۹	۶/۲۹	۱/۸۶	۱/۲۲	۲۱۴/۲۵	۹/۲۸	۶۱۰/۰۸	
ریز	با	۱۶/۴۶	۵/۴۴	۶/۴۵	۱/۲۶	۲۱۰/۷۰	۸/۱۲	۱/۶۵	
ریز	بدون	۱۷/۹۳	۶/۵۱	۱/۰۵	۱/۴۲	۲۲۵/۹۲	۹/۳۸	۶۴۸/۹۰	
درشت	با	۱۶/۵۳	۶/۲۰	۱/۱۲	۱/۰۴	۲۱۷/۴۷	۹/۳۷	۵۷۶/۹۲	
درشت	بدون	۰/۲۰	۱/۲۵	۱/۱۸	۱/۰۸	۱/۸۲	۱/۲۷	۱/۶۷	
P-value		۰/۳۲۹	۰/۲۳۰	۰/۱۷۶	۰/۱۱۸	۱۰/۴۶۱	۰/۵۲۰	۲۸/۲۴۸	
SEM									
ذرات کربنات کلسیم	فیتاز	۱۸/۰۴	۶/۵۳	۱/۱۳	۱/۱۸	۲۲۷/۵۸	۹/۸۸	۱/۷۸	
ریز	۳۰۰	۱۶/۷۰	۶/۰۶	۱/۸۹	۱/۲۳	۲۲۵/۶۰	۸/۵۰	۱/۲۵	
ریز	بدون	۱۶/۸۸	۱/۲۷	۱/۷۸	۱/۴۶	۲۱۲/۵۸	۸/۷۸	۱/۲۰	
صفر	با	۱۶/۲۹	۶/۵۸	۱/۶۶	۱/۰۸	۲۰۲/۵۷	۹/۰۰	۱/۳۲	
صفر	بدون	۰/۲۶	۱/۶۶	۱/۷۲	۱/۰۷	۱/۷۱	۱/۱۳	۱/۴۳	
P-value		۰/۳۲۹	۰/۲۳۰	۰/۱۷۶	۰/۱۱۸	۱۰/۴۶۱	۰/۵۲۰	۲۹/۶۲۶	
SEM									
اثرات متقابل سه طرفه		تغذیه شبانه	فیتاز	کلسیم	۱۷/۹۷	۶/۴۷	۱/۴۳	۶/۴۷	۱۷/۹۷
ذرات کربنات کلسیم	ریز	با	۳۰۰	۱۶/۹۵	۵/۵۲	۶/۷۲	۱/۴۵	۶/۷۲	۱۶/۹۵
ذرات کربنات کلسیم	ریز	بدون	۳۰۰	۱۶/۰۲	۶/۱۲	۱/۲۸	۱/۳۷	۱/۲۸	۱۶/۰۲
ذرات کربنات کلسیم	ریز	با	صفر	۱۵/۹۷	۵/۳۶	۶/۱۸	۱/۰۷	۶/۱۸	۱۵/۹۷
ذرات کربنات کلسیم	ریز	بدون	صفر	۱۸/۱۲	۶/۶۰	۱/۸۲	۱/۲۸	۱/۸۲	۱۸/۱۲
ذرات کربنات کلسیم	درشت	با	۳۰۰	۱۶/۴۵	۶/۶۰	۱/۰۷	۱/۰۰	۶/۶۰	۱۶/۴۵
ذرات کربنات کلسیم	درشت	بدون	۳۰۰	۱۷/۷۵	۶/۴۲	۱/۲۸	۱/۵۵	۶/۴۲	۱۷/۷۵
ذرات کربنات کلسیم	درشت	با	صفر	۱۶/۶۲	۵/۸۰	۷/۱۷	۱/۰۸	۷/۱۷	۱۶/۶۲
ذرات کربنات کلسیم	درشت	بدون	صفر	۰/۷۵	۱/۳۹	۱/۱۷	۱/۳۰	۱/۱۷	۰/۷۵
P-value		۰/۴۶۵	۰/۳۲۶	۰/۲۴۹	۰/۱۶۷	۱۴/۷۹۵	۰/۷۶۸	۳۹/۹۴۸	
SEM									

* اندازه ذرات کربنات کلسیم: ۱۰۰ درصد ریز؛ ۰/۵ میلی متر < و ۷۵ درصد درشت (۲-۴ میلی متر) + ۲۵ درصد ریز؛ آنزیم فیتاز رونوزایم هایفوس، تولید شده از اسپرژیلوس اورایزا (صفر و ۳۰۰ FTU در کیلوگرم جیره). در گروه های دریافت کننده جیره نیمه شب، در صبح، غلظت کلسیم و فسفر به ترتیب ۲۰ درصد کاهش و افزایش یافت، در حالی که در عصر، غلظت کلسیم و فسفر به ترتیب ۲۰ درصد افزایش و کاهش یافت. حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار می باشد (SEM, P<0/05): خطای استاندارد میانگین.

پارامترهای استخوانی

سبب افزایش معنادار درصد خاکستر، کلسیم و فسفر استخوان درشت‌نی شد ($P < 0/05$). اثرات اصلی تغذیه‌ی شبانه و اثرات متقابل فاکتورها تحت تاثیر تیمارهای مورد آزمایش قرار نگرفتند ($P > 0/05$).

اثرات اصلی و متقابل اندازه ذرات کربنات کلسیم، فیتاز و تغذیه‌ی شبانه بر طول، قطر، استحکام، درصد خاکستر، کلسیم و فسفر درشت‌نی به ترتیب در جدول ۷ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که افزایش اندازه ذرات کربنات کلسیم سبب افزایش معنی‌دار استحکام استخوان در پرندگان شد ($P < 0/05$). استفاده از فیتاز نیز

جدول ۷- اثرات اندازه ذرات کربنات کلسیم، آنزیم فیتاز و تغذیه شبانه بر شاخص‌های درشت‌نی مرغان تخم‌گذار در سنین ۶۰ تا ۷۲ هفتگی.

اثرات اصلی ^۰	طول (میلی‌متر)	قطر (میلی‌متر)	استحکام (نیوتون/میلی متر مربع)	خاکستر (درصد)	کلسیم (درصد)	فسفر (درصد)
اندازه ذرات کربنات کلسیم						
ریز	۱۱۵/۰۲	۶/۵۴	۱۸۲/۷۸ ^b	۵۱/۵۴	۲۱/۸۱	۹/۳۰
درشت	۱۱۵/۶۸	۶/۶۵	۱۹۲/۱۵ ^a	۵۲/۱۳	۲۲/۴۴	۹/۵۸
P-value	۰/۴۵	۰/۵۶	۰/۰۳	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۷
SEM	۰/۵۸۹	۰/۱۲۹	۲/۷۹۴	۰/۳۵۵	۰/۲۷۴	۰/۱۱۱
فیتاز						
صفر	۱۱۵/۸۷	۶/۵۷	۱۸۴/۴۹	۵۱/۱۰ ^b	۲۱/۶۶ ^b	۹/۲۸ ^b
۳۰۰	۱۱۴/۸۳	۶/۶۲	۱۹۰/۴۴	۵۲/۵۷ ^a	۲۲/۵۷ ^a	۹/۶۰ ^a
P-value	۰/۲۳	۰/۸۰	۰/۱۵	۰/۰۰۶	۰/۰۳	۰/۰۴
SEM	۰/۵۸۹	۰/۱۲۹	۲/۸۶۳	۰/۳۵۵	۰/۲۷۴	۰/۱۱۱
تغذیه شبانه						
بدون	۱۱۴/۴۳	۶/۷۳	۱۹۱/۳۲	۵۱/۴۴	۲۱/۷۰	۹/۵۷
با	۱۱۵/۲۷	۶/۴۶	۱۸۳/۶۱	۵۱/۲۳	۲۱/۵۵	۹/۳۱
P-value	۰/۸۵	۰/۱۶	۰/۰۶	۰/۰۹۰	۰/۱۱	۰/۱۰
SEM	۰/۵۷۴	۰/۱۲۹	۲/۷۹۴	۰/۳۵۵	۰/۲۷۴	۰/۱۱۱

بحث

همکاران (۲۰۱۰) مشاهده کردند که افزایش سایز ذرات کربنات کلسیم از ۰/۸ تا ۲ میلی‌متر نیز در مقایسه با ذرات ریزتر (کمتر از ۰/۵ میلی‌متر) سبب افزایش تولید تخم مرغ و بهبود ضریب تبدیل خوراک در مرغان تخم‌گذار مسن شد. در مقابل، سایر مطالعات اثر معناداری از سایز ذرات کربنات کلسیم بر عملکرد مرغان تخم-

در ارتباط با تأثیر اندازه ذرات کربنات کلسیم و در تطابق با نتایج حاضر، Hervo و همکاران (۲۰۲۳)، گزارش کردند که با افزایش اندازه ذرات کربنات کلسیم (۲-۴ میلی‌متر)، ضریب تبدیل خوراک به‌طور معناداری در مرغان ۳۷ هفته بهبود یافت؛ به‌طوری که ضریب تبدیل خوراک از ۱/۶۲ به ۱/۵۷ رسید. Skřivan و

استخوان درشت‌نی نسبت دادند (Jardim Filho و همکاران، ۲۰۰۵). بر اساس نتایج مطالعه حاضر و مطالعات دیگر، از آنجایی که افزایش مقاومت استخوان در انتهای دوره تولید در طیور تغذیه شده با ذرات کربنات کلسیم بزرگ‌تر وجود دارد، می‌توان نتیجه گرفت که حفظ کیفیت استخوان در طیور یک مزیت است که با تغییر اندازه ذرات کربنات کلسیم در جیره آن‌ها به دست می‌آید (Liu و همکاران، ۲۰۲۳؛ Saunders-Blades و همکاران، ۲۰۰۹؛ Salehi و همکاران، ۲۰۲۵).

در ارتباط با افزودن فیتاز به جیره و در موافقت با نتایج مطالعه‌ی پیش رو، Habibollahi و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که استفاده از فیتاز به میزان ۲۵۰ واحد در کیلوگرم جیره، در مرغان تخم‌گذار سبب بهبود معنادار ضریب تبدیل خوراک شد. عوامل متعددی در اثر فیتاز بر عملکرد پرندگان نقش دارند که می‌توان به نسبت کلسیم به فسفر، مقدار ویتامین D، اسیدهای آلی، تداخل یون‌های فلزی و برنامه‌های تغذیه‌ای و نوردهی اشاره کرد (Selle و Ravindran، ۲۰۰۷). Cabuk و همکاران (۲۰۰۴) مشاهده کردند که استفاده از فیتاز (۳۰۰ واحد فعالیت فیتازی/کیلوگرم) در جیره مرغ‌های تخمگذار، ضریب تبدیل خوراک را بهبود بخشید. Bello و همکاران (۲۰۲۰) نیز اثرات مثبت فیتاز بر ضریب تبدیل خوراک پرندگان را گزارش کردند. آن‌ها بیان کردند که افزودن فیتاز به جیره‌ها، اثرات منفی کمبود کلسیم و فسفر در جیره بر وزن بدن را کاهش داد. علاوه بر این، گفته شده است که اضافه کردن فیتاز، دسترسی به مواد معدنی در دستگاه گوارش مرغ‌های تخم‌گذار را افزایش می‌دهد (Bello و همکاران، ۲۰۲۰). بیان شده است که اثرات مثبت فیتاز بر حذف فسفر فیتیک، زمانی که از جیره‌های حاوی سنگ آهک درشت و ریز استفاده شود، نسبت به استفاده از ذرات فقط ریز معنی‌دارتر است (Jafari Arvari و همکاران، ۲۰۲۳). اگرچه این پارامتر در آزمایش حاضر اندازه‌گیری نشد، مطالعات دیگر نشان داده‌اند که تشکیل کمپلکس کلسیم-فیتات به طور قابل توجهی تحت تأثیر اندازه ذرات کربنات کلسیم در جوجه‌های گوشتی قرار دارد و ذرات کوچک‌تر تشکیل این کمپلکس را تسهیل می‌کنند (Manangi

گذار مشاهده نکردند و عنوان کردند که تغییر در اندازه ذرات کربنات کلسیم تاثیر چشمگیری بر مصرف خوراک و متعاقباً عملکرد پرنده نداشت (Saunders و همکاران، ۲۰۰۹؛ Oliveira و همکاران، ۲۰۱۳). مطالعه‌ی Guo و Kim (۲۰۱۲) نشان داد که میزان تولید تخم مرغ تحت تاثیر اندازه ذرات کربنات کلسیم قرار نگرفت که مطابق با مطالعه‌ی حاضر بود. همچنین این محققین اشاره کردند که وزن تخم مرغ و استحکام و ضخامت پوسته‌ی تخم مرغ در پرندگانی که جیره پایه + ۱۰ درصد ذرات ریز کربنات کلسیم را مصرف کردند به طور معناداری از سایر تیمارها کمتر بود. در مقابل، Akpiruo (۲۰۲۰) نیز بهبود در عملکرد نیمچه‌های تخم‌گذار را در اثر مصرف ذرات ریزتر کربنات کلسیم مشاهده کرد. بیان شده است که سنگ آهک با ذرات درشت‌تر و انحلال آهسته‌تر (در شرایط برون تنی)، به دلیل زمان ماندگاری بیشتر در سنگدان، کلسیم را به مرور زمان و به صورت پایدارتری آزاد می‌کنند (Anwar و همکاران، ۲۰۱۷). یک مطالعه نشان داد که ضریب هضم ظاهری کلسیم از سنگ آهک ریز (۰/۷۲) بیشتر از سنگ آهک درشت (۰/۳۵) است (Diana و همکاران، ۲۰۲۳).

در مطالعه‌ی حاضر، استحکام استخوان درشت‌نی به طور معناداری تحت تاثیر افزایش اندازه ذرات کربنات کلسیم قرار گرفت؛ به طوری که در پرندگان مصرف کننده‌ی ذرات درشت‌تر سنگ آهک نیروی شکست استخوان ۱۹۲/۱۵ نیوتن، در حالی که برای تیمارهای حاوی ذرات ریز کربنات کلسیم این عدد ۱۸۲/۷۸ نیوتن بود. گزارش شده است که افزودن منابع کلسیمی حاوی ذرات درشت‌تر، به حفظ یکپارچگی استخوان‌ها در مرغان تخم‌گذار کمک می‌کند (Oliveira و همکاران، ۲۰۱۳). Blades و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که جیره‌های حاوی ذرات کربنات کلسیم بزرگ‌تر استئوپروز را کاهش دادند و رفاه طیور را در انتهای دوره تخم‌گذاری بهبود بخشیدند. با این حال، Jardim Filho و همکاران (۲۰۰۵) هیچ اثر معنی‌داری از اندازه ذرات کربنات کلسیم مشاهده نکردند. آن‌ها این تنوع را به عواملی مانند سن پرندگان و تجهیزات استفاده شده برای اندازه‌گیری استحکام

افزایش یافت و آن‌ها دلیل این امر را افزایش معدنی شدن استخوان توسط فیتاز عنوان کردند.

در مطالعه‌ی حاضر، تغذیه‌ی شبانه سطح آلکالین فسفاتاز را افزایش و سطوح کلسیم و فسفر سرم را کاهش داد. سطح آلکالین فسفاتاز سرم به عنوان شاخصی در بررسی پرکاری پاراتیروئید در انسان و سوخت و ساز غیرطبیعی استخوان در طیور در نظر گرفته می‌شود (Wei و همکاران، ۲۰۲۱). افزایش سطوح و فعالیت آلکالین فسفاتاز در مرغانی که تغذیه‌ی شبانه داشتند، به افزایش برداشت کلسیم به استخوان نسبت داده می‌شود (Wei و همکاران، ۲۰۲۱). بنابراین، فعالیت بالای نسبی آلکالین فسفاتاز در پلاسما و کاهش سطوح کلسیم و فسفر در مرغان تغذیه شده با جیره‌ی شبانه می‌تواند نتیجه‌ای از افزایش ذخیره‌ی کلسیم در پوسته‌ی تخم مرغ باشد (Cransberg و همکاران، ۲۰۰۱). در مطالعه‌ی حاضر برنامه‌ی تغذیه‌ی شبانه نیز کیفیت پوسته‌ی تخم مرغ را به طور قابل توجهی بهبود داد. de Los Mozos و Sanchez (۲۰۱۴) اثرات تغذیه‌ی چند وعده‌ای را بر مرغان مسن (۹۵-۹۸ هفته‌گی) بررسی کردند و افزایش در وزن و ضخامت پوسته‌ی تخم مرغ و کاهش ۳۰ درصدی در تعداد تخم مرغ‌های ترک دار را گزارش کردند. بیان شده است که کیفیت پوسته‌ی تخم مرغ در اثر روشن کردن چراغ‌ها در نیمه شب و به راه انداختن فیدرها به مدت ۴۵ دقیقه بهبود یافته است (Harms و همکاران، ۱۹۹۶). در مطالعه‌ی حاضر، مرغان مصرف کننده‌ی جیره‌ی شبانه در مقایسه با پرندگان که تغذیه‌ی شبانه نشدند، وزن تخم مرغ بیشتری داشتند (۶۴/۷۶ گرم در مقایسه با ۶۳/۵۱ گرم، به ترتیب). تقسیم کردن خوراک مصرفی پرنده به دو وعده طی روز، دسترسی مواد مغذی را در رابطه با تشکیل تخم مرغ و پوسته‌ی آن بهبود داده و سبب افزایش بهره‌وری کلسیم خواهد شد (Roland و Farmer، ۱۹۸۴). سطوح فسفر پلاسما هنگامی که تخم مرغ‌ها در هنگام صبح گذاشته می‌شوند بیشتر بوده و کیفیت پوسته در این تخم مرغ‌ها بالاتر می‌باشد (Molnar و همکاران، ۲۰۱۸). Lee و Ohh (۲۰۰۲) گزارش کردند که کاهش در سطح کلسیم در هنگام صبح و افزایش آن در هنگام عصر منجر به افزایش ضخامت

و Coon، ۲۰۰۷). بهبود ضریب تبدیل خوراک با فیتاز را می‌توان به چندین عامل نسبت داد. ابتدا، افزایش قابلیت زیستی فسفر و سایر مواد معدنی نیاز به استفاده‌ی بیش از حد مواد معدنی را کاهش داده و اجازه می‌دهد تا مرغ‌ها خوراک را به طور کارآمدتری استفاده کنند. ثانیاً، تجزیه فیتات ممکن است هضم‌پذیری سایر مواد مغذی را بهبود بخشد که منجر به استفاده کلی بهتر از خوراک می‌شود (Ponnuvel و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعه‌ی حاضر، فیتاز درصد پوسته‌ی تخم مرغ را بهبود داد؛ به طوری که درصد پوسته‌ی تخم مرغ در جیره‌های حاوی فیتاز و بدون فیتاز به ترتیب ۸/۷۱ و ۸/۴۵ درصد بود. مطالعات مختلفی در زمینه‌ی اثر فیتاز بر کیفیت پوسته‌ی تخم مرغ وجود دارد. برخی از آن‌ها اثرات مفید فیتاز (Habibollahi و همکاران، ۲۰۱۹) و برخی عدم تاثیر (Waters و همکاران، ۲۰۲۴) آن را گزارش کردند. Englmaierova و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ی خود اثر فیتاز را بر مرغان تخم گذار در سنین ۳۸ تا ۵۲ هفته بررسی کردند و مشاهده کردند که فیتاز سبب بهبود ضخامت پوسته‌ی تخم شد، در حالی که اثری بر روی استحکام پوسته نداشت. Kim و همکاران (۲۰۱۷) نیز اثر معنی‌داری از فیتاز (سوپر دوزینگ: ۱۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ واحد) بر ضخامت پوسته‌ی تخم مرغ و قدرت پوسته‌ی تخم مرغ در مرغان ۴۷ هفته مشاهده نکردند. بهبود کیفیت پوسته توسط فیتاز به دلیل آزاد سازی مواد معدنی کیلات شده (مانند روی، کلسیم و فسفر) می‌باشد. به طوری که آزمایشات نشان دادند که فیتاز سبب بهبود قابلیت دسترسی این عناصر و کیفیت پوسته‌ی تخم مرغ می‌شود (kim و همکاران، ۲۰۱۷). در مطالعه‌ی ما، استفاده از فیتاز در جیره نیز به طور معناداری سبب افزایش درصد خاکستر، کلسیم و فسفر درشت‌نی شد. Zhai و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که فیتاز به طور قابل توجهی درصد کلسیم و فسفر استخوان درشت‌نی را افزایش داد، این در حالی بود که میزان خاکستر استخوان در تیمارهای شاهد (بدون فیتاز) بالاتر بود. Kocabağlı (۲۰۰۱) نیز گزارش کرد که با افزودن ۷۰۰-۳۰۰ واحد فیتاز در جیره‌ی جوجه‌های گوشتی، مقاومت استخوان در برابر شکستن و وزن خاکستر استخوان

- 47(1), 197-207.
<https://doi.org/10.51791/njap.v47i1.230>.
- Anwar, M. N., Ravindran, V., Morel, P. C. H., Ravindran, G., & Cowieson, A. J. (2017). Effect of calcium source and particle size on the true ileal digestibility and total tract retention of calcium in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 224, 39-45.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.12.002>.
- Ao, T., Pierce, J. L., Pescatore, A. J., Cantor, A. H., Dawson, K. A., Ford, M. J., & Shafer, B. L. (2007). Effects of organic zinc and phytase supplementation in a maize-soybean meal diet on the performance and tissue zinc content of broiler chicks. *British Poultry Science*, 48(6), 690-695.
<https://doi.org/10.1080/00071660701694072>.
- ardim Filho, R. D. M., Stringhini, J. H., Café, M. B., Andrade, M. A., Sakamoto, M. I., & Franco, J. R. G. (2005). Influence of limestone source and particle size on the density, strength and mineral content of laying hens' tibia bone.
- Bouvalet, I., Nys, Y., & Lescoat, P. (2011). Hen nutrition for sustained egg quality. In *Improving the safety and quality of eggs and egg products* (pp. 261-299). Woodhead Publishing.
<https://doi.org/10.1533/9780857093912.3.261>.
- Cransberg, P. H., Parkinson, G. B., Wilson, S., & Thorp, B. H. (2001). Sequential studies of skeletal calcium reserves and structural bone volume in a commercial layer flock. *British poultry science*, 42(2), 260-265.
<https://doi.org/10.1080/00071660120048528>
- de Los Mozos, J., & Sanchez, F. (2014). Split feeding system for more sustainable egg production. Accessed August, 26, 2021.
- Diana, T. F., Calderano, A. A., Rostagno, H. S., Marques, M. R. D. L., Tavernari, F. D. C., Veroneze, R., & Albino, L. F. T. (2022). Apparent calcium retention and digestibility coefficients of limestone with different particle sizes in laying hens. *Scientia Agricola*, 80, e20210258.
<https://doi.org/10.1590/1678-992x-2021-0258>
- El Boushy, A. R. (1979). Available phosphorus in poultry. 1. Effect of phosphorus levels on the performance of laying hens and their egg quality, hatchability, bone analysis and strength in relation to calcium and phosphorus in blood plasma. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 27(2), 176-183.
<https://doi.org/10.18174/njas.v27i2.17064>.

پوسته‌ی تخم مرغ و پارامتر مقاومت به شکست می‌شود (در مقایسه با برنامه‌های غذایی با سطوح ثابت کلسیم).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که افزایش اندازه ذرات کربنات کلسیم در جیره‌ی مرغان تخم‌گذار سبب بهبود ضریب تبدیل خوراک، افزایش سطح کلسیم سرم و استحکام استخوان شد. استفاده از آنزیم فیتاز نیز موجب بهبود ضریب تبدیل خوراک و افزایش درصد پوسته‌ی تخم‌مرغ و همچنین بهبود ترکیب معدنی استخوان گردید. اثر متقابل فیتاز و اندازه ذرات کربنات کلسیم نشان داد که استفاده از فیتاز همراه با ذرات درشت کربنات کلسیم منجر به افزایش معنی‌دار سطح کلسیم خون نسبت به سایر تیمارها شد. علاوه بر این، تغذیه‌ی شبانه منجر به افزایش وزن تخم‌مرغ، بهبود درصد پوسته و تغییر در برخی شاخص‌های خونی از جمله افزایش آلکالین فسفاتاز و کاهش سطح سرمی کلسیم و فسفر شد. در مجموع، نتایج بیانگر آن است که استفاده از فیتاز به همراه ذرات درشت‌تر کربنات کلسیم در کنار تغذیه‌ی شبانه می‌تواند به‌عنوان یک راهکار تغذیه‌ای مؤثر جهت بهبود عملکرد تولیدی، کیفیت پوسته تخم‌مرغ و سلامت استخوان در مرغان تخم‌گذار تجاری مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- عبدعون جواد، محمد، مرادی، سودابه و عبداللهی، محمد رضا . (۱۴۰۲). تاثیر میانگین هندسی قطر ذرات کربنات کلسیم و آنزیم فیتاز بر عملکرد، کیفیت تخم مرغ و قابلیت هضم ظاهری کلسیم در مرغان تخم‌گذار تجاری. *علوم دامی ابران*. ۵۴ (۴) ۴۰۳-۴۱۷.
<https://doi.org/10.22059/ijas.2023.351169.653>
 919
- Abbasi, M., Zaghari, M., Ganjkanlo, M., & Khalaji, S. (2015). Is dietary iron requirement of broiler breeder hens at the late stage of production cycle influenced by phytase supplementation?. *Journal of Applied Animal Research*, 43(2), 166-176.
<https://doi.org/10.1080/09712119.2014.928634>.
- Akpiruo, C. E. (2020). Effect of calcium sources and particle sizes on performance characteristics, age at first egg and blood parameters of egg type chicken. *Nigerian Journal of Animal Production*,

- Englmaierova, M., Skřivan, M., Skřivanová, E., Bubancova, I., Čermák, L., & Vlčková, J. (2015). Effects of a low-phosphorus diet and exogenous phytase on performance, egg quality, and bacterial colonisation and digestibility of minerals in the digestive tract of laying hens. <https://doi.org/10.17221/8596-CJAS>.
- Grizzle, J., Iheanacho, M., Saxton, A., & Broaden, J. (1992). Nutritional and environmental factors involved in egg shell quality of laying hens. *British Poultry Science*, 33(4), 781-794. <https://doi.org/10.1080/00071669208417520>.
- Guo, X. Y., & Kim, I. H. (2012). Impacts of limestone multi-particle size on production performance, egg shell quality, and egg quality in laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(6), 839. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11468>.
- Habibollahi, M., Abousadi, M. A., & Nakhaee, P. (2019). The effect of phytase on production performance, egg quality, calcium and phosphorus excretion, and fatty acids and cholesterol concentration in hy-line layers fed diets containing rice bran. *Journal of Applied Poultry Research*, 28(3), 688-698. <https://doi.org/10.3382/japr/pfz020>.
- Hamdi, M., López-Vergé, S., Manzanilla, E.G., Barroeta, A.C. and Pérez, J.F. 2015a. Effect of different levels of calcium and phosphorus and their interaction on the performance of young broilers. *Poultry Science*, 94: 2144-2151. <https://doi.org/10.3382/ps/pev177>.
- Harms, R. H., Douglas, C. R., & Sloan, D. R. (1996). Midnight feeding of commercial laying hens can improve eggshell quality. *Journal of Applied Poultry Research*, 5(1), 1-5. <https://doi.org/10.1093/japr/5.1.1>
- Hervo, F., Létourneau-Montminy, M. P., Mème, N., Méda, B., Duclos, M. J., & Narcy, A. (2023). Effect of phytase and limestone particle size on mineral digestibility, performance, eggshell quality, and bone mineralization in laying hens. *Poultry Science*, 102(5), 102613. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102613>.
- Kim, J. H., Pitargue, F. M., Jung, H., Han, G. P., Choi, H. S., & Kil, D. Y. (2017). Effect of superdosing phytase on productive performance and egg quality in laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 30(7), 994. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0149>.
- Kocabağlı, N. (2001). The effect of dietary phytase supplementation at different levels on tibial bone characteristics and strength in broilers. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 25(5), 797-802.
- Lee, K. H., & Ohh, Y. S. (2002). Effects of nutrient levels and feeding regimen of am and pm diets on laying hen performances and feed cost.
- Leske, K., & Coon, C. (2002). The development of feedstuff retainable phosphorus values for broilers. *Poultry Science*, 81(11), 1681-1693. <https://doi.org/10.1093/ps/81.11.1681>.
- Lim, H. S., Namkung, H., & Paik, I. K. (2003). Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorous excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorous. *Poultry science*, 82(1), 92-99. <https://doi.org/10.1093/ps/82.1.92>.
- Liu, Y., Uyanga, V. A., Jiao, H., Wang, X., Zhao, J., Zhou, Y., & Lin, H. (2023). Effects of feeding strategies on eggshell quality of laying hens during late laying period. *Poultry Science*, 102(2), 102406. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102406>
- Manangi, M. K., & Coon, C. N. (2007). The effect of calcium carbonate particle size and solubility on the utilization of phosphorus from phytase for broilers. *Int. J. Poult. Sci*, 6(2), 85-90. <https://doi.org/10.3923/ijps.2007.85.90>.
- Mirakzehi, M. T., Kermanshahi, H., Golian, A., & Raji, A. R. (2013). The effects of dietary 1, 25-dihydroxycholecalciferol and hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* root on bone mineralisation, strength and histological characteristics in broiler chickens. *British Poultry Science*, 54(6), 789-800. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.850469>
- Molnár, A., Hamelin, C., Delezie, E., & Nys, Y. (2018). Sequential and choice feeding in laying hens: adapting nutrient supply to requirements during the egg formation cycle. *World's Poultry Science Journal*, 74(2), 199-210. <https://doi.org/10.1017/S0043933918000247>
- Nys, Y. (2001, September). Recent developments in layer nutrition for optimising shell quality. In *Proceedings of 13th European Symposium of Poultry Nutrition*. Blankenberge, Belgium (pp. 45-52).
- Nys, Y., & Guyot, N. (2011). Egg formation and chemistry. In *Improving the safety and quality of eggs and egg products* (pp. 83-132). Woodhead publishing.

- <https://doi.org/10.1533/9780857093912.2.83>.
Oliveira, A. N. D., Freitas, E. R., Filgueira, T. M. B., Cruz, C. E. B., & Nascimento, G. A. J. D. (2013). Limestone particle size and artificial light for laying hens in the second laying cycle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42, 481-488. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982013000700004>.
- Rao, K. S., Roland Sr, D. A., Adams, J. L., & Durboraw, W. M. (1992). Improved limestone retention in the gizzard of commercial leghorn hens. *Journal of applied poultry research*, 1(1), 6-10. <https://doi.org/10.1093/japr/1.1.6>.
- Ren, Z., Sun, W., Liu, Y., Li, Z., Han, D., Cheng, X., ... & Yang, X. (2019). Dynamics of serum phosphorus, calcium, and hormones during egg laying cycle in Hy-Line Brown laying hens. *Poultry science*, 98(5), 2193-2200. <https://doi.org/10.3382/ps/pey572>.
- Roland, D.A. and Farmer, M., (1984). Egg Shell Quality II: Importance of Time of Calcium Intake with Emphasis on Broiler Breeders 1. *World's Poultry Science Journal*, 40(3), pp.255-260. <https://doi.org/10.1079/WPS19840021>
- Salehi, V., Vakili, R., & Torshizi, M. E. (2025). Effects of Calcium Carbonate Particle Size, Phytase and Midnight Feeding on Performance, Egg and Bone Quality and Blood Parameters in Laying Hens. *Veterinary Medicine and Science*, 11(2), e70248. <https://doi.org/10.1002/vms3.70248>
- Saunders-Blades, J. L., MacIsaac, J. L., Korver, D. R., & Anderson, D. M. (2009). The effect of calcium source and particle size on the production performance and bone quality of laying hens. *Poultry science*, 88(2), 338-353. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00278>.
- Saunders-Blades, J. L., MacIsaac, J. L., Korver, D. R., & Anderson, D. M. (2009). The effect of calcium source and particle size on the production performance and bone quality of laying hens. *Poultry science*, 88(2), 338-353. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00278>
- Scott, M. L., Hull, S. J., & Mullenhoff, P. A. (1971). The calcium requirements of laying hens and effects of dietary oyster shell upon egg shell quality. *Poultry Science*, 50(4), 1055-1063. <https://doi.org/10.3382/ps.0501055>.
- Selle, P. H., & Ravindran, V. (2007). Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal feed science and technology*, 135(1-2), 1-41. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010>
- Skřivan, M., Marounek, M., Bubancova, I., & Podsedniček, M. (2010). Influence of limestone particle size on performance and egg quality in laying hens aged 24-36 weeks and 56-68 weeks. *Animal Feed Science and Technology*, 158(1-2), 110-114. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.018>.
- Swiatkiewicz, S., & Koreleski, J. (2008). The effect of zinc and manganese source in the diet for laying hens on eggshell and bones quality. *Veterinarni Medicina*, 53(10), 555. <https://doi.org/10.17221/1966-VETMED>.
- Um, J. S., & Paik, I. K. (1999). Effects of microbial phytase supplementation on egg production, eggshell quality, and mineral retention of laying hens fed different levels of phosphorus. *Poultry science*, 78(1), 75-79. <https://doi.org/10.1093/ps/78.1.75>.
- Waters, C. A., Wamsley, K. G. S., Elliot, M. A., Bedford, M., Wyatt, C., Kim, W. K., & Adhikari, P. A. (2024). The response of laying hen production, performance, bone health, and inositol levels to limestone particle size ratios and phytase levels supplemented during the post-peak period (40-60 wk of age). *Journal of Applied Poultry Research*, 33(2), 100407. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2024.100407>.
- Wei, H., Chen, Y., Nian, H., Wang, J., Liu, Y., Wang, J., ... & Bao, J. (2021). Abnormal bone metabolism may be a primary causative factor of keel bone fractures in laying hens. *Animals*, 11(11), 3133. <https://doi.org/10.3390/ani11113133>
- Zhai, H. X., Wang, J. P., Zhang, Q., Aureli, R., Tschambser, A., & Faruk, M. U. (2022). Evaluation of the efficacy of a novel phytase in short-term digestibility and long-term egg production studies with laying hens. *Poultry Science*, 101(6), 101894. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101894>.