نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد نهم، شماره چهارم، ۱۴۰۰
http://ejrr.gau.ac.ir
۱-۱۸
DOI: 10.22069/ejrr.2021.18949.1784

تولید و ارزیابی آزمایشگاهی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز کنجاله سویا با استفاده از اتوکلاو و فرایند تخمیر زیستی

وحید یکانی[۱]، *حامد خلیل وندی بهروزیار[۲]، رسول پیرمحمدی[۳] و مریم دنیادوست چلان[۴]

[۱]دانش‌آموخته کارشناس‌ارشد تغذیه دام، [۲]استادیار و [۳]استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه
[۴]گروه تحقیق و توسعه شرکت دانش بنیان کیمیادانش الوند

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۲۸

چکیده

سابقه و هدف: کنجاله سویا به دلیل داشتن محتوای پروتئینی زیاد و توازن نسبتاً مطلوب الگوی اسیدآمینه، به‌طور گسترده‌ای در تولید خوراک دام مورد استفاده قرار می‌گیرد. بااین‌حال، حاوی تعدادی عوامل ضد تغذیه‌ای است که می‌توانند بر هضم و جذب مواد مغذی اثر بگذارند. هیدرولیز کنجاله سویا از طریق تخمیر، می‌تواند یک راه‌حل بهینه برای از بین بردن عوامل ضد تغذیه‌ای و بهبود گوارش‌پذیری مواد مغذی آن باشد. یک ترکیب پروتئینی هیدرولیز شده، مخلوطی از پپتیدها و اسیدآمینه‌هایی است که پپتید زیست فعال نامیده می‌شوند. این پپتیدها پس از رها شدن از زنجیره پروتئینی، فعالیت‌های بیولوژیکی مشخصی را از خود نشان می‌دهند و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد دیابتی و ضد سرطانی نیز هستند. این پژوهش، با هدف تولید پپتیدهای زیست فعال از پروتئین سویا، از طریق تخمیر زیستی توسط باکتری‌های *باسیلوس سابتلیس*، *باسیلوس لیکنیفورمیس*، قارچ *آسپرژیلوس اورایزا*، و هیدرولیز توسط اتوکلاو، انجام پذیرفت. همچنین، ارزیابی منابع پروتئینی جداسازی شده و هیدرولیز شده در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: کنجاله سویا ابتدا آسیاب شده و سپس از طریق فرایند استخراج قلیایی و رسوب اسیدی، پروتئین آن جداسازی شد. میکروارگانیسم‌ها نیز در محیط کشت اختصاصی، کشت داده شده و سپس به پروتئین جداسازی شده در مرحله قبل، افزوده شدند و فرایند هیدرولیز تخمیری انجام گرفت. همچنین از دستگاه اتوکلاو برای انجام هیدرولیز استفاده شد. منابع پروتئین جداسازی شده و هیدرولیز شده، برای تعیین ارزش تغذیه‌ای همانند مقدار پروتئین خام، ماده آلی، خاکستر، ماده خشک و عصاره اتری بر اساس روش استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمون ارزیابی میزان گاز تولیدی در شرایط برون تنی با هدف ارزیابی تأثیر هیدرولیز منابع پروتئینی و تولید منابع پپتیدی بر میزان فعالیت زیستی منابع پروتئینی انجام شد. به‌منظور استفاده از مایع شکمبه برای انجام آزمون تولید گاز در شرایط برون‌تنی، از سه رأس گاو نر بالغ هلشتاین که دارای فیستولای شکمبه‌ای بودند، استفاده شد. درنهایت، داده‌های حاصل از ارزیابی آزمایشگاهی با استفاده از مدل آماری طرح کاملاً تصادفی توسط نرم‌افزار SAS 9.4 مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون توکی و در سطح آماری ۰/۰۵ انجام شد.

یافته‌ها: نتایج مربوط به تغییرات ترکیب شیمیایی در طی هیدرولیز، نشان داد که تنها افزایش معنی‌دار ($P<0/05$) در مقدار ماده خشک تیمار *آسپرژیلوس اورایزا* نسبت به سایر تیمارها دیده شد (۲۸ درصد). همچنین، مشخص شد که میزان تولید پپتیدهای

*نویسنده مسئول: h.khalilvandi@urmia.ac.ir

زیست فعال از پروتئین سویا با روش‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که بیشترین میزان پپتیدهای با وزن مولکولی پایین، توسط باکتری *باسیلوس لیکنیفورمیس* (۰/٤٨٣ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تولید شد. همچنین، نتایج حاصل از روش تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که هیدرولیز پروتئین سویا با استفاده از قارچ *آسپرژیلوس اورایزا* به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش میزان گاز تولیدی و بخش قابل تخمیر (به ترتیب ۳۱۸/۱۸ و ٤۲۱/۰۵ میلی‌لیتر بر گرم) شد (P<۰/۰۵). ازنظر نرخ تولید گاز و انرژی قابل متابولیسم نیز در تیمار اتوکلاو نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) یافت شد (به ترتیب ۰/۰۲۷درصد و ۲۵۵/۹۲ کیلوژول بر گرم). ازنظر درصد قابلیت هضم ماده آلی نیز در تیمار *باسیلوس سابتلیس* نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) مشاهده شد (۷۸/۱۰درصد).

نتیجه‌گیری: نتایج کلی تحقیق نشان داد که هیدرولیز کنجاله سویا از طریق تخمیر زیستی و هیدرولیز توسط اتوکلاو، میزان تولید پپتیدهای زیست فعال را افزایش داد و باکتری *باسیلوس لیکنیفورمیس* بیشترین میزان پپتید را تولید کرد. همچنین، تیمار *آسپرژیلوس اورایزا* نسبت به سایر تیمارها، بیشترین افزایش را در میزان گاز تولیدی و بخش قابل تخمیر ایجاد نمود که نشان دهنده تأثیر مثبت تولید پروتئین هیدرولیز شده با این روش در افزایش فعالیت زیستی پروتئین کنجاله سویا است.

واژه‌های کلیدی: اتوکلاو، پپتید زیست فعال، پروتئین جداسازی شده، کنجاله سویا، هیدرولیز تخمیری

مقدمه

کنجاله سویا شناخته‌شده‌ترین منبع پروتئین گیاهی است. سویا علاوه بر پروتئین، حاوی ترکیبات اساسی تغذیه‌ای، ازجمله لیپیدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، قندهای آزاد و هم‌چنین شامل ایزوفلاون‌ها، فلاوانوئیدها، ساپونین‌ها و پپتیدهای که دارای ارزش درمانی هستند، است (**Error! Reference source not found.**42). کنجاله سویا به دلیل داشتن محتوای پروتئینی زیاد (تقریباً ٤٨-٤٢ درصد) و توازن نسبتاً مطلوب الگوی اسیدآمینه، به‌طور گسترده‌ای در تولید خوراک دام مورداستفاده قرار می‌گیرد (17). بااین‌حال، این ماده خوراکی حاوی تعدادی عوامل ضد تغذیه‌ای نیز است. عوامل ضد تغذیه‌ای، ازجمله مهارکننده تریپسین و پروتئین‌های حساسیت‌زا، می‌توانند بر هضم و جذب مواد مغذی اثر بگذارند و دسترسی تغذیه‌ای کنجاله سویا در خوراک حیوانات جوان را محدود سازند (28). برای غلبه بر این محدودیت‌ها، پیش‌فراوری کنجاله سویا می‌تواند یک راه‌حل بهینه برای از بین بردن عوامل ضد تغذیه‌ای و بهبود گوارش‌پذیری مواد مغذی باشد(4). در طی فرآیندهایی مانند تخمیر، ترکیبات آلی پیچیده توسط میکروارگانیسم‌ها به مولکول‌های کوچک‌تر شکسته می‌شوند. یک ترکیب پروتئینی هیدرولیز شده مخلوطی از پپتیدها و اسیدآمینه‌هایی است که از انجام عمل هیدرولیز توسط آنزیم، اسید یا قلیا و یا تخمیر حاصل می‌شوند. این پپتیدها که در توالی اصلی پروتئینی خود به‌صورت غیرفعال هستند، پس از رها شدن از زنجیره پروتئینی فعالیت‌های بیولوژیکی مشخصی را از خود نشان می‌دهند. پپتیدهای زیست فعال اغلب از ۵ تا ۵۱ اسیدآمینه تشکیل‌شده‌اند و جرم مولکولی آن‌ها کمتر از ۱۰ کیلو دالتون است (23). در حین تخمیر، آنزیم‌های پروتئولیتیکی تولیدشده توسط جمعیت میکروبی، پروتئین‌ها را به پپتیدها و آمینواسیدهای آزاد هیدرولیز می‌کنند. علاوه بر این، وجود پپتیدهای بیولوژیکی بالقوه نیز در سویای خام گزارش‌شده است (21). لوناسین، یک پپتید حاوی ٤۳ اسیدآمینه است که از گونه‌های مختلف سویا جداشده است و گزارش‌شده که خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضدالتهابی نشان می‌دهد (۱۸،۳۱). پپتیدهای زیست فعال موجود در سویای تخمیر شده

به‌منظور خواص درمانی مختلفی مانند خواص آنتی‌اکسیدانی (43)، ضد فشارخون (20 **Error! Reference source not found.**)، ضد تومور (49)، ضد دیابت (27) و همچنین برای جلوگیری از تصلب شرایین (47) مطالعه شده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که مهارکننده تریپسین از طریق تخمیر توسط *نوروسپورا کراسا* کاملاً حذف می‌شود. قارچ *نوروسپورا کراسا*، پروتئاز و سلولاز با فعالیت بالا و کاروتنوئید تولید می‌کند که باعث بهبود قابل‌توجهی در ارزش غذایی کنجاله سویای تخمیر شده می‌شود و محتوای عوامل ضد تغذیه‌ای(اسید فایتیک و مهارکننده تریپسین) را کاهش می‌دهد (40). گزارش‌شده است که *باسیلوس سابتلیس*، *باسیلوس لیکنیفورمیس*، و قارچ‌ها عوامل اصلی در تولید محصولات تخمیری سویا هستند (28). در بین قارچ‌ها نیز قارچ رشته‌ای *آسپرژیلوس اوریزا* بیشترین فعالیت پروتئولتیکی را دارد (22). گزارش‌شده است که الگوی اسیدهای آمینه ضروری پس از تخمیر بدون تغییر باقی می‌ماند، در عوض، تخمیر مقدار پپتیدهای کوچک‌تر را افزایش می‌دهد (52) (<۱۰ کیلو دالتون) چو و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که تخمیر سویا توسط میکروارگانیسم‌های مختلف به دلیل افزایش ایزوفلاون‌ها و پپتیدهای آزاد، باعث بهبود خواص زیست عملکردی آن می‌شود (12). پیناس و همکاران (۲۰۰۶) تأثیر پیش تیمار اتوکلاو بر روی کنجاله سویا و سپس هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز را مطالعه کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که این امر باعث افزایش نرخ هیدرولیز و افزایش میزان پپتیدهای با وزن مولکولی کم می‌شود (37). یوان و همکاران (۲۰۱۷) از *باسیلوس سابتلیس*، *هانسنولا آنومالا* و *لاکتوباسیلوس کازئی* برای تخمیر کنجاله سویا استفاده کردند و دریافتند که کنجاله سویای تخمیر شده، در خوک‌های جوان اثرات مثبتی بر روی گوارش‌پذیری مواد مغذی و میکروفلورای مدفوع می‌گذارد (51). همچنین گزارش‌شده است که استفاده از پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز سویا در جیره جوجه‌های گوشتی سبب کاهش تأثیرات بیماری کوکسیدیوز می‌شود (35). افزودن این پپتیدها در جیره گوساله‌ها، طیور و ماهی نیز سبب بهبود در وضعیت تغذیه‌ای، عملکرد روده و توانایی مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی شده است (22). با توجه به مطالب بیان‌شده، مطالعه حاضر با هدف تولید پپتیدهای زیست فعال از کنجاله سویا از طریق هیدرولیز تخمیری توسط باکتری‌های *باسیلوس سابتلیس*، *باسیلوس لیکنیفورمیس*، قارچ *آسپرژیلوس اورایزا*، هیدرولیز توسط اتوکلاو و هم‌چنین ارزیابی آزمایشگاهی محصولات تولیدی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

محل و زمان اجرای آزمایش، مواد مورد نیاز: این تحقیق به مدت ٤ ماه از آذرماه سال ۱۳۹۸ تا اسفندماه ۱۳۹۸ در آزمایشگاه تغذیه و میکروبیولوژی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه و بخشی نیز در آزمایشگاه مرکزی واقع در پردیس دانشگاهی ارومیه، صورت گرفت. کنجاله سویا از بازار محلی ارومیه خریداری شد. سپس آسیاب شده و ترکیب شیمیایی آن بر اساس روش استاندارد AOAC (6) مورد ارزیابی قرار گرفت که بدین‌صورت بود؛ ماده خشک ۹۵ درصد، ماده آلی ۹۳ درصد، عصاره اتری ۸ درصد، و پروتئین ٤۳ درصد. به‌منظور استفاده از مایع شکمبه برای انجام آزمون تولید گاز در شرایط برون‌تنی، از سه رأس گاو نر بالغ هلشتاین (با میانگین وزنی ۵۷۰ کیلوگرم) که دارای فیستولای شکمبه‌ای بودند، استفاده گردید. این گاوها دو بار در روز با جیره حاوی ٤ کیلوگرم یونجه، ۳ کیلوگرم سیلاژ ذرت و ۱/۵ کیلوگرم جو خردشده

تغذیه می‌شدند و گرفتن مایع شکمبه قبل از خوراک‌دهی وعده صبح، انجام شد. جایگاه دام نیمه‌باز و مسقف و کف آن بتونی بود. سویه‌های باکتری و قارچ موردنیاز که شامل باکتری‌های *باسیلوس لیکنیفورمیس* (DSM 1969)1595 و *باسیلوس سابتلیس* (ATCC 12711)1156 و هم‌چنین قارچ *آسپرژیلوس اورایزا* (ATCC 20423)5163 بودند، از ذخیره‌گاه ژنتیکی سازمان تحقیقات علمی- صنعتی ایران خریداری شدند.

تیمارهای آزمایشی: در این پژوهش، هیدرولیز پروتئین سویا با استفاده از چهار روش مختلف صورت گرفت. ابتدا از کنجاله سویا، پروتئین جداسازی شد و سپس فرایند هیدرولیز بر روی این پروتئین انجام گرفت. لذا به‌منظور انجام این پژوهش، پنج تیمار شامل؛ تیمار یک (شاهد): پروتئین جداسازی شده کنجاله سویا، تیمار دو: هیدرولیز پروتئین سویا توسط باکتری *باسیلوس سابتلیس*، تیمار سه: هیدرولیز پروتئین سویا توسط باکتری *باسیلوس لیکنیفورمیس*، تیمار چهار: هیدرولیز پروتئین سویا توسط قارچ *آسپرژیلوس اورایزا*، و تیمار پنج: هیدرولیز پروتئین سویا توسط دستگاه اتوکلاو، تنظیم گردید.

تهیه پروتئین جداسازی شده: در ابتدا، آرد کنجاله سویا از طریق آسیاب کردن کنجاله سویا توسط آسیاب چکشی (Jesma-Matodor AS، ۳۱۵/٦۵۰، دانمارک) با الک یک میلی‌متر به دست آمد (25). سپس پروتئین جداسازی شده سویا، از آرد سویا با استفاده از روش بویه و همکاران (۲۰۱۰) با اندکی اصلاحات در نسبت آرد سویا به آب مقطر تهیه شد (9). در این روش، فرایند استخراج قلیایی و رسوب اسیدی پروتئین صورت گرفت. بدین گونه که محتویات به نسبت ۱ به ۱۵ با آب مقطر مخلوط شده و به کمک محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال، pH محلول به ۱۲ رسانده شد. نمونه به‌خوبی با استفاده از هموژنایزر اولتراسونیک (korea, svoo4ie5-1, industrial systems) به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط و با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار (CL5، چین) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول شفاف رویی جدا و pH آن با استفاده از اسیدکلریدریک یک نرمال به ٤/۳ (pH ایزو الکتریک پروتئین سویا) رسانده شد. این سوسپانسیون به‌طور کامل توسط هموژنایرز اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط و با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا رسوب پروتئینی جدا گردد. رسوب حاصل در ظروف دردار در دمای ۸۰- درجه سلسیوس در یخچال فریزر (شرکت گروک، فریزر تحقیقاتی ۸۰- ، ایران) نگهداری شد (3،1).

باید اشاره کرد که در مطالعات مختلف از نسبت‌های مختلف آرد سویا به آب مقطر استفاده شده بود (برای مثال ۱ به ۱۰ (111)، ۱ به ۱۵ (11)). لذا به‌منظور دستیابی به نسبت صحیح آرد سویا به آب مقطر، آزمایشی با استفاده از نسبت‌های ۱ به ۵، ۱ به ۱۰، و ۱ به ۱۵، انجام شد. نتایج این آزمایش در جدول ۱ آورده شده است. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، نسبت ۱ به ۱۵ آرد سویا به آب مقطر در مقایسه با سایر نسبت‌ها، بازدهی بسیار بالاتری داشت و به‌عنوان نسبت صحیح در فرایند استخراج مورداستفاده قرار گرفت.

جدول ۱- تأثیر نسبت‌های مختلف آرد سویا به آب مقطر بر روی میزان استخراج پروتئین از کنجاله سویا

Table 1. The effect of different ratios of soy flour to distilled water on the amount of protein extraction from soybean meal

نسبت Ratios	آرد سویا(گرم) Soy flour (g)	آب مقطر(میلی‌لیتر) Distilled water (ml)	سود (میلی‌لیتر) NaOH (ml)	اسید (میلی‌لیتر) HCl (ml)	پروتئین (وزن مرطوب (گرم)) Protein (wet weight (g))	بازده استخراج(%) Extraction efficiency (%)
1 به 5	200	1000	150	85	130	34.6
1 به 10	200	2000	185	125	190	50.6
1 به 15	200	3000	250	200	270	71.8

راندمان استخراج پروتئین بر اساس رابطه زیر محاسبه شد (44):

$$\% \text{ بازده استخراج} = \frac{M2 \times DM2 \times CP2}{M1 \times DM1 \times CP1} \times 100$$

برای مثال، راندمان استخراج پروتئین برای نسبت ۱ به ۱۵ بدین‌صورت محاسبه شد:

$$\frac{270 \times 0.25 \times 0.87}{200 \times 0.95 \times 0.43} \times 100 = 71.8 \text{ درصد}$$

M2 مقدار پروتئین جداسازی شده، DM2 ماده خشک پروتئین جداسازی شده (۲۵درصد)، CP2 درصد پروتئین در پروتئین جداسازی شده (۸۷درصد)، M1 مقدار ماده اولیه، DM1 ماده خشک ماده اولیه (۹۵ درصد)، CP1 درصد پروتئین در ماده اولیه (۴۳درصد)

کشت باکتری‌های باسیلوس سابتلیس، باسیلوس لیکنیفورمیس: ابتدا ۲/۳ گرم از پودر *نوترینت آگار (NA)* (حاوی ۰/۵ گرم پپتون، ۰/۳ گرم عصاره مخمر، ۰/۵ گرم سدیم کلرید، ۱ گرم آگار) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و در دستگاه اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد استریل شد. به‌منظور فعال‌سازی، باکتری‌ها در محیط کشت NA، در زیر هود میکروبیولوژیکی (lamin air flow class2,) به‌صورت خطی کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در انکوباتور (kavoosh mega، ایران) نگهداری شدند (50). سپس کشت مایع باکتری‌ها صورت گرفت. در محیط کشت مایع، ابتدا ۵۰ گرم کنجاله سویا، ۵ گرم سبوس گندم، و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به درون ارلن‌های ۱ لیتری ریخته شدند. سپس محلول مواد معدنی حاوی، ۲ گرم Na_2HPO_4، ۱ گرم KH_2PO_4، ۰/۰۱ گرم $CaCl_2$، ۰/۰۰۵ گرم $CuSO_4$، ۰/۰۰۲ گرم $FeSO_4$، به آن اضافه گردید (5051). محلول حاصل در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو (ریحان طب، RT-2، ایران) استریل گردید و پس از سرد شدن در دمای اتاق به زیر هود منتقل گردید. با استفاده از لوپ باکتریایی به میزان ۱ گرم از هر یک از باکتری‌های از قبل کشت شده در محیط کشت *NA* به درون هر ارلن منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر روی انکوباتور شیکردار (پویش طب آداک، ایران) با سرعت ۱۵۰*rpm* قرار داده شدند (14). پس از گذشت این مدت، باکتری‌ها به‌صورت کامل رشد کرده بودند.

کشت قارچ *آسپرژیلوس اورایزا:* ابتدا ۳/۹ گرم از پودر *پوتیتو دکستروز آگار (PDA)* (حاوی ۲ گرم دکستروز، ۰/۴ گرم نشاسته سیب‌زمینی، ۱/۵ گرم آگار)، در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل‌شده و در دستگاه اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد استریل شد. به‌منظور فعال‌سازی قارچ در محیط کشت PDA، در زیر هود میکروبیولوژیکی کشت داده شده و به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند (26). سپس کشت مایع قارچ صورت گرفت. بدین منظور، ابتدا ۲۵۰ گرم سیب‌زمینی در ۱

لیتر آب مقطر به مدت ۹۰ دقیقه جوشانده شده، آب سیب‌زمینی حاصل صاف‌شده و به درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس ۱۵ گرم کنجاله سویا و ۵ گرم ساکارز به آن اضافه شد (7). محلول حاصل در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شده و پس از سرد شدن در دمای اتاق به زیر هود منتقل شد. سپس به میزان یک برش ۱ گرمی از قارچ کشت‌شده در محیط کشت *PDA* به درون هر ارلن منتقل شد و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر دارای سرعت ۱۵۰*rpm* قرار داده شدند (53). پس از گذشت این مدت، قارچ به‌صورت کامل رشد کرده بود.

تهیه پروتئین هیدرولیز شده: بدین منظور، پروتئین جداسازی شده از کنجاله سویا پس از یخ‌زدایی، به مقدار ٤٠ گرم در ظرف‌های مخصوص شیشه‌ای دردار ریخته شد. به ازای هر تیمار، چهار تکرار (ظرف شیشه‌ای) در نظر گرفته شد. سپس تمام ظروف حاوی نمونه جهت استریل کردن و حذف سایر میکروارگانیسم‌ها، با استفاده از دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد استریل شدند (38). در ادامه‌ی فرایند در زیر هود، جهت انجام هیدرولیز تخمیری توسط باکتری‌ها و قارچ، بر اساس روش Rashad و همکاران (۲۰۱۱) با اندکی اصلاحات، به درون هر شیشه حاوی پروتئین جداسازی شده، به‌صورت جداگانه ۲۰ میلی‌لیتر از محلول‌های حاوی باکتری و قارچ انتقال داده شد. در پایان عمل انتقال، درب ظروف بسته‌شده و به داخل انکوباتور انتقال یافتند(38). ظروف حاوی باکتری در دمای ۳۷ درجه به مدت ٤ روز و ظرف حاوی قارچ در دمای ۲۸ درجه به مدت ۷ روز در داخل انکوباتور نگهداری شدند و در این مدت فرایند تخمیر صورت گرفت (16،53). در پایان این مدت‌ها، تمامی ظروف از انکوباتورها خارج‌شده و به‌منظور توقف فرایند هیدرولیز و هم‌چنین خشک شدن، به داخل آون (ایران خودساز، مدل OD720، ایران) انتقال یافتند و در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز نگهداری شدند (50). درنهایت بعد از گذشت این مدت، نمونه‌ها از آون خارج‌شده، توزین شده و در دمای معمولی نگهداری شدند.

به‌منظور انجام فرایند هیدرولیز توسط دستگاه اتوکلاو نیز مشابه آنچه قبلاً اشاره شد، چهار تکرار از پروتئین جداسازی شده در نظر گرفته شد و مشابه روش Blayo و همکاران (۲۰۱٦) با اندکی تغییر، فراوری توسط اتوکلاو صورت گرفت. بدین‌صورت که مقدار ٤٠ گرم از هر نمونه داخل ظروف دردار ریخته شده و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه گردید. سپس ظروف حاوی نمونه به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۲۰ بار در داخل دستگاه اتوکلاو قرار گرفتند. پس‌ازاین مدت، تمامی ظروف از اتوکلاو خارج‌شده و به‌منظور خنک شدن در دمای معمولی قرار گرفتند (8). درنهایت نمونه‌ها خشک گردیده، توزین شده و جهت انجام ارزیابی‌های آزمایشگاهی، در دمای معمولی نگهداری شدند.

ارزیابی آزمایشگاهی: منابع پروتئین جداسازی شده و هیدرولیز شده تولیدی برای تعیین ارزش تغذیه‌ای همانند مقدار پروتئین خام، ماده آلی، خاکستر، ماده خشک و عصاره اتری بر اساس روش استاندارد *AOAC* (6) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین به‌منظور اطمینان از موفقیت‌آمیز بودن فرایند هیدرولیز و بررسی شکسته شدن زنجیره‌های پلی پپتیدی، آنالیز پپتیدها بر اساس روش آنالیز *SDS-PAGE* صورت پذیرفت. ابتدا، به‌منظور استخراج پروتئین ۱۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه را وزن کرده و به میکرو تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس به هر

میکروتیوب میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر پتاسیم (۰/۲۷ گرم سوربیتول، ۰/۱٦ گرم پتاسیم گلوکونات، ۰/۲۱ گرم منیزیم کلرید، ۰/۰۱٤ گرم سدیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۰۹۵ گرم هپس) و ۵ میلی‌لیتر آنتی پروتئاز *(PMSF)* اضافه شد و روی یخ هموژنیزه شد (14). سنجش پروتئین هر نمونه توسط دستگاه بیوفتومتر صورت گرفت. بدین‌صورت که ابتدا استاندارد آلبومین سرم گاوی *(BSA)* برای دستگاه در نظر گرفته شد و از طریق میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر غلظت هر نمونه با رقت (۱۰+۳۹۰ میکروگرم) برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

ارزیابی آزمایشگاهی منابع پروتئینی جداسازی شده و هیدرولیز شده بر اساس روش تولید گاز: آزمون ارزیابی میزان گاز تولیدی در شرایط برون تنی باهدف ارزیابی تأثیر هیدرولیز منابع پروتئینی و تولید منابع پپتیدی بر میزان فعالیت زیستی منابع پروتئینی انجام شد .به‌منظور تعیین تأثیر هیدرولیز بر میزان گاز تولیدی در آزمایشگاه از روش تئودروس و همکاران (45) استفاده شد. بدین منظور، مایع شکمبه از گاوهای نر هلشتاین فیستولا گذاری شده به دست آمد. این گاوها دو بار در روز با جیره حاوی ٤ کیلوگرم یونجه، ۳ کیلوگرم سیلاژ ذرت و ۱/۵ کیلوگرم جو خردشده تغذیه می‌شدند و هنگام گرفتن مایع شکمبه، ناشتا بودند. مایع به‌دست‌آمده، پس از مخلوط شدن در فلاسک محتوی گازکربنیک سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. مایع شکمبه پس از صاف نمودن همراه با محلول‌های محیط کشت (محلول ماکرومینرال، محلول میکرومینرال، محلول احیاکننده، محلول بافر و محلول ریزازورین) مطابق روش منکه و همکاران (۱۹۷۹) و روش تصحیح‌شده (32، 33) به نسبت یک قسمت مایع شکمبه (۵۰۰ میلی‌لیتر) و دو قسمت محیط کشت (٤۷٤ میلی‌لیتر آب, ۲۳۷ میلی‌لیتر محلول بافر, ۲۳۷ میلی‌لیتر محلول ماکرومینرال, ۰/۱۲ میلی‌لیتر محلول میکرومینرال، ۱/۲۲ میلی‌لیتر محلول رسازورین و تا رسیدن به حجم یک لیتر محلول احیا) به داخل بالن سه دهانه مخصوص ریخته شده و در مجاورت گاز دی‌اکسید کربن گرفته و تا زمان انتقال به شیشه‌های حاوی نمونه در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. درعین‌حال، تمامی نمونه‌های آزمایشی با آسیاب دارای غربال یک میلی‌متر آسیاب شده و ۵۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه به‌صورت چهار تکرار در فلاسک‌های مخصوص گاز تست (۱۲۵ میلی‌لیتری) ریخته شد. درنهایت، به هر فلاسک ۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمبه و محیط کشت اضافه گشته و درب فلاسک‌ها با درپوش پلاستیکی و سپس درپوش آلومینیومی به‌طور محکم بسته‌شده و در آون با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. فلاسک‌ها هر نیم ساعت یک‌بار تکان داده شدند. میزان گاز تولیدی در ساعات ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۲، ۲٤، ٤۸، ۷۲، ۹٦، ۱۲۰ و ۱٤٤ ساعت پس از انکوباسیون، با استفاده از دستگاه فشارسنج (ایران، 05H-8432027,Grow)، اندازه‌گیری و قرائت شد. به‌منظور تصحیح گاز تولیدی توسط خود محتویات مایع شکمبه، چهار شیشه فاقد نمونه که تنها حاوی ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط مایع شکمبه و محیط کشت بودند در نظر گرفته شد. تا میزان تولید گاز آن‌ها از کل گاز تولیدی توسط نمونه خوراک کم شده و مقدار صحیح گاز تولیدی ناشی از تخمیر نمونه فراوری‌شده به دست آید. حجم گاز تولیدی در فلاسک‌های حاوی نمونه ماده خوراکی در هر ساعت از انکوباسیون، توسط معادله (V=(5.4146*G)+1.9453) تصحیح گردید.

اندازه‌گیری درصد قابلیت هضم ماده آلی و مقدار انرژی قابل متابولیسم: قابلیت هضم ماده آلی و نیز انرژی قابل متابولیسم با روش تعیین میزان گاز تولیدی حاصل از تخمیر نمونه‌ها طی ۲٤ ساعت،

انجام پذیرفت و بر اساس رابطه‌های زیر محاسبه شد (32)

درصد قابلیت هضم ماده آلی = 14.88 + 0.8893 GP + 0.0448 CP + 0.0651 XA

GP: میلی‌لیتر گاز تولیدی طی ٢٤ ساعت (به ازای ٢٠٠ میلی‌گرم ماده خشک)

CP: پروتئین خام (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

XA: خاکستر خام (گرم در کیلوگرم ماده خشک)

انرژی قابل متابولیسم = 2.2 + 0.1357 GP + 0.057 CP + 0.0002589 Cp^2

GP: میلی‌لیتر گاز تولیدی طی ٢٤ ساعت (به ازای ٢٠٠ میلی‌گرم ماده خشک)

CP: پروتئین خام (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

روش‌های آماری مورداستفاده

در این پژوهش، داده‌های حاصل از ارزیابی آزمایشگاهی در ارتباط با ترکیب شیمیایی، آنالیز وزن پپتید به روش SDS-PAGE و فرا سنجه‌های تولید گاز، با استفاده از مدل آماری طرح کاملاً تصادفی با اثر ثابت تیمار مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS ٩/٤ و دستور PROC GLM صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون توکی و در سطح آماری ۰/۰۵ انجام شد.

$$Yi= \mu + Ti + ei$$

Yi: مشاهده، μ: میانگین کل مشاهدات

Ti: اثر تیمار، ei: خطای تصادفی

در ارتباط با داده‌های تکرار شده در واحد زمان، داده‌ها با استفاده از مدل آماری دارای اثر زمان به‌عنوان عامل تکرارشونده مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. بدین‌صورت که کینتیک تولید گاز در قالب طرح کاملاً تصادفی با داده‌های تکرارشونده در زمان صورت پذیرفت. اثر متقابل زمان انکوباسیون و نوع روش فرآوری در مدل آماری قرار گرفت. آنالیز این داده‌ها با استفاده از PROC MIXED در نرم‌افزار SAS ٩/٤ انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین حداقل مربعات و خطای استاندارد در جداول مربوطه گزارش شده و تصحیح داده‌ها با استفاده از آزمون توکی و مقایسه میانگین‌ها با گزینه PDIFF در سطح احتمال آماری ۰/۰۵ انجام گرفت.

$$Yi= \mu+Ti+Itj+ Tit\ ij+ eij$$

μ: میانگین جامعه؛ Ti: اثر تیمار

Itj: اثر زمان انکوباسیون، eij: اثر اشتباه آزمایشی

Tit ij: اثر متقابل زمان انکوباسیون و تیمار فرآوری

همچنین داده‌های مربوط به کینتیک تولید گاز، و فراسنجه‌های آزمون تولید گاز، قبل از آنالیز توسط نرم‌افزار SAS به‌وسیله نرم‌افزار Fitcurve برازش شدند. تمامی آنالیزهای آزمایشگاهی انجام‌شده در ارتباط با تعیین ترکیبات شیمیایی، آنالیز وزن پپتید به روش SDS-PAGE، کینتیک تولید گاز، و فراسنجه‌های آزمون تولید گاز با چهار تکرار آزمایشی انجام شدند.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی: نتایج مربوط به تغییرات ترکیبات شیمیایی پروتئین سویا فراوری‌شده توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف، در جدول ۲ آورده شده است. به‌طورکلی، فرایند فراوری کنجاله سویا توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف، تغییرات چندانی در ترکیب شیمیایی محصولات ایجاد نکرده است تنها افزایش معنی‌دار در مقدار ماده خشک تیمارهای هیدرولیزی *باسیلوس سابتلیس*، *باسیلوس لیکنیفورمیس*، *آسپرژیلوس اورایزا*، نسبت به تیمار شاهد، دیده شد (P<۰/۰۵). که می‌تواند درنتیجه‌ی رشد و متابولیسم میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته (12). کاهش جزئی ماده آلی در برخی تیمارها نیز می‌تواند به علت رشد و متابولیسم میکروارگانیسم‌ها باشد، زیرا میکروارگانیسم‌ها به‌منظور رشد نیازمند منابع انرژی، کربن و نیتروژن هستند (19). این نتایج با نتایج سایر

محققان همخوانی دارد. ژانگ و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که در طی هیدرولیز تخمیری، محتوای پروتئین تغییر چندانی پیدا نمی‌کند اما زنجیره‌های پلی پپتیدی شکسته می‌شوند (52). چان چارون پونگ و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که رشد قارچ *آسپرژیلوس اورایزا* در مرحله‌ی هیف باعث کاهش رطوبت و محتوای قند در ماده خوراکی مورد آزمایش می‌شود، زیرا قند به‌عنوان منبع کربن مصرف می‌شود و رطوبت نیز به علت تولید گرما و مصرف رطوبت توسط میکروارگانیسم کاهش می‌یابد. همچنین آن‌ها کاهش جزئی در ماده آلی مشاهده کردند (10).

جدول ۲- ترکیب شیمیایی پروتئین سویای هیدرولیز شده توسط روش‌های مختلف

Table 2. Chemical composition of hydrolyzed Soybean protein using different methods

ترکیب شیمیایی Chemical composition	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments					اشتباه استاندارد میانگین SEM	احتمال معنی‌داری p-value
	شاهد *Control*	*سابتلیس* *subtilis*	*لیکنیفورمیس* *licheniformis*	*اورایزا* *oryzea*	*اتوکلاو* *Autoclave*		
ماده خشک (٪) Dry matter	25.00^{ab}	27.00^{a}	27.00^{a}	28.00^{a}	20.00^{b}	0.891	<0.01
ماده آلی (٪) Organic matter	98.00	97.00	96.00	96.00	98.00	0.444	0.48
عصاره اتری (٪) Ether extract	7.00	5.00	5.00	5.00	4.20	0.520	0.36
پروتئین (٪) Protein	87.00	85.00	85.00	85.00	88.00	0.615	0.23

در هر ردیف, داده‌های با حروف متفاوت در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

In each row, datas with different letters have significant difference (P<0.05).

ارزیابی میزان تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین بر اساس روش SDS-PAGE: تأثیر انواع فرایندهای هیدرولیز بر میزان تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین (کوچک‌تر از ۱۰ کیلو دالتون) از پروتئین جداسازی شده سویا (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) در جدول۳ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، هر چهار تیمار هیدرولیزی (*باسیلوس سابتلیس*، *باسیلوس لیکنیفورمیس*، *آسپرژیلوس اورایزا*، اتوکلاو) نسبت به تیمار شاهد ، میزان تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین را افزایش داده‌اند (P<۰/۰۵). این امر نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن فرایند هیدرولیز و شکسته شدن پروتئین‌های بزرگ به قطعات کوچک‌تر است. چو و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که تخمیر سویا توسط میکروارگانیسم‌های مختلف سبب افزایش ایزوفلاون‌ها و پپتیدهای آزاد می‌شود (12). هم‌چنین بین تیمارهای مختلف هیدرولیزی تفاوت‌های معنی‌دار در سطح آماری (۰/۰۵) دیده شد به‌طوری‌که بیشترین میزان پپتیدهای با وزن مولکولی پایین، توسط باکتری *باسیلوس لیکنیفورمیس* (۰/۴۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تولید شد (P<۰/۰۵). تفاوت در بین گونه‌های باکتریایی و قارچی می‌تواند به علت تفاوت در نوع آنزیم‌های تولیدی باشد. مشخص‌شده است که *باسیلوس لیکنیفورمیس* توانایی رشد با استفاده از منابع مختلف مواد مغذی را دارد و آنزیم‌های مختلف هیدرولیتیک تولید و ترشح می‌کند و به‌طور عمده، پروتئازهای قلیایی و خنثی تولید می‌نماید (36). هم‌چنین یین و همکاران (۲۰۱۹) که تخمیر سویا با استفاده از باکتری *باسیلوس سابتلیس* را موردمطالعه قراردادند، گزارش کردند که آنزیم‌های

غالبی که این باکتری تولید می‌کند عمدتاً پروتئاز و کربوکسی پپتیداز هستند (50). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج سایر محققان همخوانی دارد.

ژانگ و همکاران (٢٠١٦) گزارش دادند که در طی هیدرولیز زنجیره‌های پلی پپتیدی با وزن مولکولی زیاد (بزرگ‌تر از ١٠٠٠٠ دالتون) به پپتیدهای با وزن مولکولی کم (کوچک‌تر از ١٠٠٠٠ دالتون) شکسته می‌شوند (52). این امر توسط آنزیم‌های پروتئازی صورت می‌گیرد. سانگ رونیس و همکاران (٢٠٠٦) گزارش کردند که در طی هیدرولیز، اندوپپتیدازها پروتئین‌ها را تجزیه کرده و الیگوپپتید تولید می‌کنند، الیگوپپتیدها نیز توسط اگزوپپتیدازها کوچک‌تر شده و تشکیل پروتئین‌های با وزن موکولی کم و اسیدهای آمینه آزاد می‌دهند (41). گزارش‌شده است که محتوای اسیدآمینه آزاد سویای تخمیر شده توسط سویه‌های پروتئولیتیک *باسیلوس سابتلیس*، ١٠ الی ٢٠ برابر افزایش می‌یابد (43). در اثر فرآیند اتوکلاو نیز بخشی از پروتئین‌ها واسرشته شده و به پروتئین‌های کوچک‌تر تبدیل می‌شوند و محتوای پپتیدهای با وزن مولکولی پایین افزایش می‌یابد. تیمار توسط اتوکلاو منجر به شکستن پیوندهای شیمیایی ضعیف می‌شود، اما بر روی پیوندهای کووالانسی تأثیر نمی‌گذارد (30). کیم و همکاران (٢٠١٧) تأثیر تیمار توسط اتوکلاو را بر روی کنجاله سویا مطالعه کردند و دریافتند که این امر باعث افزایش محتوای آمینواسیدهای آزاد و پپتیدهای با وزن مولکولی کم می‌شود (24).

جدول ٣- تأثیر انواع فرایندهای هیدرولیز بر میزان تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

Table 3. Effect of various hydrolysis processes on the production of peptides with low molecular weight (µg/ml)

منبع Source	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments					اشتباه استاندارد میانگین SEM	احتمال معنی‌داری p-value
	شاهد *Control*	*سابتلیس* *subtilis*	*لیکنیفورمیس* *licheniformis*	*اورایزا* *oryzae*	*اتوکلاو* *Autoclave*		
سویا Soybean	0.187^{d}	0.213^{c}	0.483^{a}	0.211^{c}	0.335^{b}	0.005	<0.01

در هر ردیف, داده‌های با حروف متفاوت در سطح آماری ٠/٠٥ دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

In each row, datas with different letters have significant difference (P<0.05).

نتایج حاصل از ارزیابی منابع پروتئینی جداسازی شده و هیدرولیز شده بر اساس روش تولید گاز آزمایشگاهی (*in vitro*): کینتیک و فراسنجه‌های تولید گاز محصولات سویا (بر اساس ١ گرم ماده خشک) در جدول ٤ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تولید گاز تجمعی در تمامی تیمارها با افزایش ساعات انکوباسیون، افزایش‌یافته است. بین تیمارهای مختلف تا ساعت ٢٤ انکوباسیون تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد اما از ساعت ٢٤، مقدار گاز تولیدی در بین تیمارهای مختلف، تفاوت آماری معنی‌دار داشته است (٠/٠٥). به‌طوری‌که در پایان ساعات انکوباسیون (ساعت ١٤٤)، تیمار *آسپرژیلوس اورایزا* نسبت به سایر تیمارها بیشترین میزان تولید گاز تجمعی (٣١٨/١٨ میلی‌لیتر بر گرم) را داشته است (٠/٠٥). همچنین، در پایان ساعات انکوباسیون (ساعت ١٤٤)، بین تیمار شاهد (پروتئین جداسازی شده) و تیمارهای هیدرولیزی باکتری‌های *باسیلوس سابتلیس*، *باسیلوس لیکنیفورمیس*، تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد. اما نسبت به تیمار اتوکلاو تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (٠/٠٥) و تیمار اتوکلاو کمترین

میزان تولید گاز تجمعی را داشته است (۲٤۷/۰۵ میلی‌لیتر بر گرم). عوامل زیادی بر میزان گاز تولیدی در هنگام تخمیر تأثیر دارند ازجمله ماهیت و سطح الیاف و قدرت مایعات شکمبه مورد استفاده. به‌طورکلی تولید گاز منعکس‌کننده ترکیبات تجزیه‌پذیر است و بنابراین مقدار گاز تولیدشده به مقدار کربوهیدرات‌ها بستگی دارد (34). درنتیجه‌ی فرایند جداسازی پروتئین از کنجاله سویا اغلب بخش‌های الیافی و عوامل ضد تغذیه‌ای آن حذف می‌شوند اما نه به‌صورت کامل. تیان و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که میزان الیاف در پروتئین جداسازی شده از کنجاله سویا، ۰/۲۵ درصد است (46). همچنین، الیبهای و همکاران (۲۰۰٦) گزارش کردند که بخشی از عوامل ضد تغذیه‌ای ازجمله اسید فایتیک از پروتئین جداسازی شده، حذف نمی‌شوند (4). تفاوت در بین گونه‌های باکتریایی و قارچی ازنظر تولید گاز، می‌تواند به علت تفاوت در نوع آنزیم‌های تولیدی باشد (36). اورایزا علاوه بر پروتئاز، آنزیم‌های سلولاز و گلوکوآمیلاز ترشح می‌کند که می‌توانند از طریق تخریب دیواره‌سلولی و شکستن پلیمرهای پیچیده‌ی کربوهیدراتی، به‌عمل هیدرولیز کمک کنند (53). همچنین یین و همکاران (۲۰۱۹) که تخمیر سویا با استفاده از باکتری *باسیلوس سابتلیس* را مورد مطالعه قرار دادند، گزارش کردند که آنزیم‌های غالبی که این باکتری تولید می‌کند عمدتاً پروتئاز و کربوکسی پپتیداز هستند (50). افزایش میزان گاز تولیدی را می‌توان به تأثیر آنزیم‌ها بر ترکیبات دیواره‌سلولی و افزایش قابلیت دسترسی به بخش‌های قابل‌هضم مربوط دانست (2).

در بخش قابل تخمیر در زمان (b) نیز تنها تفاوت معنی‌دار بین تیمار *آسپرژیلوس اورایزا* و سایر تیمارها، یافت شد (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بیشترین میزان بخش قابل تخمیر در این تیمار مشاهده شد (٤۲۱/۰۵ میلی‌لیتر بر گرم). همان‌طور که قبلاً اشاره شد، ممکن است این امر درنتیجه‌ی آنزیم‌های تولیدی قارچ *آسپرژیلوس اورایزا* و بهبود دسترسی بخش کربوهیدراتی برای تخمیر میکروبی باشد (53).

ازنظر نرخ تولید گاز (c) نیز بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار یافت شد (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بیشترین مقدار نرخ تولید گاز در تیمار اتوکلاو مشاهده شد (۰/۰۲۷درصد). ازنظر درصد قابلیت هضم ماده آلی (OMD) نیز بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌دار یافت شد (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بیشترین مقدار در تیمار *باسیلوس سابتلیس* مشاهده شد (۷۸/۱۰درصد). ازنظر انرژی قابل متابولیسم (ME) نیز بین تیمارهای مختلف، تفاوت معنی‌دار یافت شد (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که بیشترین مقدار در تیمار اتوکلاو مشاهده شد (۲۵۵/۹۲ کیلوژول بر گرم).

جدول .Error! No text of specified style in document- کینتیک تولید گاز تجمعی پروتئین سویای هیدرولیز شده توسط روش‌های مختلف (میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک)

Table 4. Kinetics of cumulative gas production of hydrolyzed soybean protein using different methods (ml/g dry matter)

اشتباه استاندارد میانگین SEM	تیمارهای آزمایشی Experimental treatments					زمان Time(h)
	اتوکلاو *Autoclave*	*اورایزا* *oryzae*	*لیکنیفورمیس* *licheniformis*	*سابتلیس* *subtilis*	*شاهد* *Control*	
6.365	17.37	16.07	13.85	16.77	16.39	2
6.365	33.45	35.89	30.74	36.32	36.54	4
6.365	52.24	52.02	46.93	55.97	56.52	6
6.365	70.76	71.62	63.34	73.84	73.46	8
6.365	90.36	90.68	83.43	94.36	93.50	12
6.365	112.88^{b}	113.10^{b}	122.47^{ab}	130.37^{a}	123.76^{ab}	24
6.365	143.47^{b}	157.39^{a}	156.41^{a}	160.04^{a}	165.51^{a}	48
6.365	165.89^{c}	204.01^{a}	185.06^{b}	184.79^{b}	198.49^{a}	72
6.365	186.11^{d}	245.16^{a}	215.87^{c}	214.84^{c}	228.21^{b}	96
6.365	218.95^{c}	286.07^{a}	252.47^{b}	253.93^{b}	264.22^{b}	120
6.365	247.05^{c}	318.18^{a}	282.57^{b}	287.77^{b}	294.54^{b}	144
	فراسنجه‌های تولید گاز Parameters of gas production					
17.289	231.36^{b}	421.05^{a}	293.51^{b}	292.39^{b}	304.62^{b}	b(ml/g)
0.002	0.027^{a}	0.016^{b}	0.025^{a}	0.023^{ab}	0.025^{a}	C(%/h)
0.450	75.69^{b}	75.68^{b}	77.35^{ab}	78.10^{a}	77.17^{ab}	OMD
0.901	255.92^{a}	240.77^{c}	241.03^{c}	241.24^{c}	251.11^{b}	ME

در هر ردیف, داده‌های با حروف متفاوت در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار هستند.

In each row, datas with different letters have significant difference (P<0.05).

در این جدول، فراسنجه‌های b و c و OMD و ME همگی دارای p-value <0/01 می‌باشند.

b: بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر بر گرم) c: نرخ تولید گاز (درصد در ساعت) ME: انرژی قابل متابولیسم (کیلوژول بر گرم ماده خشک)

OMD: درصد قابلیت هضم ماده آلی

نتیجه‌گیری کلی

نتایج کلی تحقیق نشان داد که هیدرولیز کنجاله سویا از طریق تخمیر زیستی توسط باکتری‌های *باسیلوس سابتلیس*، *باسیلوس لیکنیفورمیس*، قارچ *آسپرژیلوس اورایزا*، و هیدرولیز توسط اتوکلاو، میزان تولید پپتیدهای زیست فعال را افزایش و باکتری *باسیلوس لیکنیفورمیس* بیشترین میزان پپتید را ایجاد کرد. همچنین، تیمار *آسپرژیلوس اورایزا* نسبت به سایر تیمارها، بیشترین افزایش را در میزان گاز تولیدی و بخش قابل تخمیر ایجاد نمود. ازنظر نرخ تولید گاز و انرژی قابل متابولیسم نیز در تیمار اتوکلاو نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌دار یافت شد(P<۰/۰۵). ازنظر درصد قابلیت‌هضم ماده‌آلی نیز در تیمار *باسیلوس سابتلیس* نسبت به سایر تیمارها افزایش معنی‌دار یافت شد(P<۰/۰۵).

منابع

1. Akdeniz, N., Sahin, S. and Sumnu, G. 2006. Functionality of batters containing different gums for deep-fat frying of carrot slices. Journal of Food Engineering, 75: 522-526.
2. Akinfemi, A. 2010. Nutritive value and *in vitro* gas production of fungal treated maize cobs. African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development, 10(8): 25-38.
3. Albert, S. and Mittal, G. S. 2002. Comparative evaluation of edible coatings to reduce fat uptake in a deep-fried cereal product. Food Research International, 35(5): 445-458.
4. Alibhai, Z., Mondor, M., Moresoli, C., Ippersiel, D. and Lamarche, F. 2006. Production of soy protein concentrates/isolates: traditional and membrane technologies. Desalination, 191(1-3): 351-358.
5. Ansia, I. and Drackley, J. K. 2020. Graduate student literature review: The past and future of soy protein in calf nutrition. Journal of Dairy Science.
6. AOAC .2000. Official Methods of Analysis.17th ed. Gaithersburg, M.D., USA, Association of Official Analytical Chemists International.
7. Begum, M. F. and Absar, N. 2009. Purification and characterization of intracellular cellulase from Aspergillus oryzae ITCC-4857.01. Mycobiology, 37(2): 121-127.
8. Blayo, C., Vidcoq, O., Lazennec, F. and Dumay, E. 2016. Effects of high pressure processing (hydrostatic high pressure and ultra-high pressure homogenisation) on whey protein native state and susceptibility to tryptic hydrolysis at atmospheric pressure. Food Research International, 79: 40-53.
9. Boye, J., Zare, F. and Pletch, A. 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. J. Food Research International 43: 414–431.
10. Chancharoonpong, C., Hsieh, P.-C. and Sheu, S.-C. 2012. Effect of different combinations of soybean and wheat bran on enzyme production from Aspergillus oryzae S. APCBEE Procedia, 2: 68-72.
11. Cho, S. Y. and Rhee, C. 2004. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. LWT-Food Science and Technology, 37(8): 833-839.
12. Cho, Y. S., Kim, S. K., Chang, B. A. and Jae, Y. J. 2011. Preparation, characterization and antioxidant properties of gallic acid-grafted-chitosans. Carbohydrate Polymers, 83: 1617-1622.
13. Chou, C.-C. and Ling, M.-Y. 1998. Biochemical changes in soy sauce prepared with extruded and traditional raw materials. Food Research International, 31(6): 487-492.
14. Clegg, M. T., Gaut, B. S., Learn, G. H. and Morton, B. R. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(15), 6795-6801.
15. Dos Santos Aguilar, J. G. and Sato, H. H. 2018. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. Food Research International, 103: 253-262.
16. Feng, J., Liu, X., Xu, Z. R., Liu, Y. Y. and Lu, Y. P. 2007. Effects of Aspergillus oryzae 3.042 fermented soybean meal on growth performance and plasma biochemical parameters in broilers. Animal Feed Science and Technology, 134(3-4): 235-242.
17. Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., J Souza, E., Stone, D., Wilson, R. and Wurtele, E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. Aquacultur Research, 38: 551-579.
18. Gonzalez de Mejia, E., Vasconez, M., de Lumen, B. O. and Nelson, R. 2004. Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 5882-5887.
19. Hajieghrari, B. and Farrokhi, N. 2020. Investigation on the Conserved MicroRNA Genes in Higher Plants. Plant Molecular Biology Reporter, 1-14.

20. Hanafi, M. A., Hashim, S. N., Chay, S. Y., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Muhammad, K., Abdul- Hamid, A. and Saari, N. 2018. High angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (Glycine max) hydrolysates. Food Research International, 106: 589-597.
21. Hernandez-Ledesma, B., Hsieh, C. C. and de Lumen, B. O. 2009. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. Peptides, 30: 426-430.
22. Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G. and Wu, G. 2017. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. Journal of Animal Science and Biotechnology, 8(1): 1-13.
23. Jacobsen, H. J., Kousoulaki, K., Sandberg, A. S., Carlsson, N. G., Ahlstrøm, Ø. and Oterhals, Å. 2018. Enzyme pre-treatment of soybean meal: Effects on non-starch carbohydrates, protein, phytic acid, and saponin biotransformation and digestibility in mink (Neovison vison). Animal Feed Science and Technology, 236: 1-13.
24. Kim, M. Y., Jang, G. Y., Oh, N. S., Baek, S. Y., Lee, S. H., Kim, K. M. and Jeong, H. S. 2017. Characteristics and *in vitro* anti-inflammatory activities of protein extracts from pre-germinated black soybean [Glycine max (L.)] treated with high hydrostatic pressure. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 43: 84-91.
25. Krochta. J. M. 1997. Edible protein films and coating .In Damodaran, Food Protein and their Application, 529-544.
26. Kupski, L., de Carvalho Silvello, M. A., Fontes, M. R. V., Lima, T. S., Treichel, H. and Badiale Furlong, E. 2015. R. oryzae Cellulases: A new approach to degrading lignocellulosic material. Journal of Food Biochemistry, 39(2): 129-138.
27. Kwon, D. Y., Hong, S. M., Ahn, I. S., Kim, M. J., Yang, H. J. and Park, S. 2011. Isoflavonoids and peptides from meju, long-term fermented soybeans, increase insulin sensitivity and exert insulinotropic effects *in vitro*. Nutrition, 27: 244-252.
28. Kwon, D. Y., James, W. D., III, Kim, H. J. and Park, S. 2010. Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. Nutrition Research, 30: 1-13.
29. Li, J., Zhou, R. L., Ren, Z. Q., Fan, Y. W., Hu, S. B., Zhuo, C. F. and Deng, Z. Y. 2019. Improvement of protein quality and degradation of allergen in soybean meal fermented by Neurospora crassa. Lwt, 101: 220-228.
30. Lozano-Ojalvo, D., Pérez-Rodríguez, L., Pablos-Tanarro, A., López-Fandiño, R. and Molina, E. 2017. Pepsin treatment of whey proteins under high pressure produces hypoallergenic hydrolysates. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 43: 154-162.
31. Lule, V. K., Garg, S., Pophaly, S. D., Hitesh, and Tomar, S. K. 2015. Potential health benefits of lunasin: a multifaceted soy-derived bioactive peptide. Journal of Food Science, 80: 485-494.
32. Menke, K. H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research and Development, 28: 7-55.
33. Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. The Journal of Agricultural Science, 93(1): 217-222.
34. Nasehi, M., Torbatinejad, N. M., Zerehdaran, S. and Safaie, A. R. 2017. Effect of solid-state fermentation by oyster mushroom (*Pleurotus Florida*) on nutritive value of some agro by-products. Journal of Applied Animal Research, 45(1): 221-226.
35. Osho, S.O., Xiao, W.W. and Adeola, O. 2019. "Response of broiler chickens to dietary soybean bioactive peptide and coccidia challenge." Poultry Science, 98(11): 5669-5678.
36. Parrado, J., Rodriguez–Morgado, B., Tejada, M., Hernandez, T. and Garcia, C. 2014. Proteomic analysis of enzyme production by Bacillus licheniformis using different feather wastes as the sole fermentation media. Enzyme and Microbial Technology, 57: 1-7.
37. Peñas, E., Prestamo, G., Polo, F. and Gomez, R. 2006. Enzymatic proteolysis, under high pressure of soybean whey: Analysis of peptides and the allergen Gly m 1 in the hydrolysates. Food Chemistry, 99(3): 569-573.

38. Pirota, R., Tonelotto, M., Delabona, P., Fonseca, R., Paixão, D., Baleeiro, F., Bertucci-Neto, V. and Farinas, C. 2016. Bioprocess developments for cellulase production by aspergillus oryzae cultivated under solid-state fermentation. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 33: 21-31.
39. Rashad, M.M., Mahmoud, A.E., Abdou, H.M. and Nooman, M.U. 2011. Improvement of nutritional Quality andantioxidant activities of yeas tfermented soybean curd residue. African Journal of Biotechnology, 10: 5504–5513.
40. Ren, H., Liu, H., Endo, H., Takagi, Y. and Hayashi, T. 2006. Anti-mutagenic and antioxidative activities found in Chinese traditional soybean fermented products furu. Food Chemistry, 95: 71-76.
41. Sangronis, E., Rodríguez, M., Cava, R. and Torres, A. 2006. Protein quality of germinated Phaseolus vulgaris. European Food Research and Technology, 222(1-2): 144.
42. Sanjukta, S. and Rai, A. K. 2016. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. Trends in Food Science and Technology, 50: 1-10.
43. Sanjukta, S., Rai, A.K., Muhammed, A., Jeyaram, K. and Talukdar, N.C. 2015. Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic Bacillus subtilis fermentation. Journal of Functional Foods, 14: 650-658.
44. Selling, G. W., Hojilla-Evangelista, M. P., Evangelista, R. L., Isbell, T., Price, N. and Doll, K. M. 2013. Extraction of proteins from pennycress seeds and press cake. Industrial Crops and Products, 41: 113-119.
45. Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. and France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48(3-4): 185-197.
46. Tian, H., Guo, G., Fu, X., Yao, Y., Yuan, L. and Xiang, A. 2018. Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review. International Journal of Biological Macromolecules, 120: 475-490.
47. Tsai, T. Y., Chu, L. H., Lee, C. L. and Pan, T. M. 2009. Atherosclerosis-preventing activity of lactic acid bacteria-fermented milk-soymilk supplemented with Momordica charantia. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57: 2065-2071.
48. Watanabe, N., Fujimoto, K. and Aoki, H. 2007. Antioxidant activities of the watersoluble fraction in tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh). International Journal of Food Science and Nutrition, 58: 577-587.
49. Yang, H. J., Kwon, D. Y., Kim, M. J., Kang, S. and Park, S. 2012. Meju, unsalted soybeans fermented with Bacillus subtilis and Aspergilus oryzae, potentiates insulinotropic actions and improves hepatic insulin sensitivity in diabetic rats. Nutrition and Metabolism, 9(1): 37.
50. Yin, H., Jia, F. and Huang, J. 2019. The variation of two extracellular enzymes and soybean meal bitterness during solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. Grain and Oil Science and Technology, 2(2): 39-43.
51. Yuan, L., Chang, J., Yin, Q., Lu, M., Di, Y., Wang, P., Lu, F. 2017. Fermented soybean meal improves the growth performance, nutrient digestibility, and microbial flora in piglets. Animal Nutrition, 3(1): 19–24.
52. Zhang, Y., Dai, B., Deng, Y. and Zhao, Y. 2016. *In vitro* anti-inflammatory and antioxidant activities and protein quality of high hydrostatic pressure treated squids (Todarodes pacificus). Food chemistry, 203: 258-266.
53. Zhao, Y., Sun-Waterhouse, D., Zhao, M., Zhao, Q., Qiu, C. and Su, G. 2018. Effects of solid-state fermentation and proteolytic hydrolysis on defatted soybean meal. LWT, 97: 496-502.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 9(4), 2021
http://ejrr.gau.ac.ir

Production and evaluation of bioactive peptides resulting from hydrolysis of soybean meal through autoclave and bio-fermentation process

V. Yekani[1], H. Khalilvandi-Behroozyar[2] R. Pirmohammadi[3] and M. Donyadoust Chelan[4]

[1]M.Sc. Graduated, [2]Assistant Prof., and [3]Professor, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Iran

[4]Research and Development Department, Kimiya Danesh Alvand Knowledge-Based Company, Iran

Received: 03/09/2021; Accepted: 05/18/2021

Abstract

Background and objectives: Soybean meal is widely used in animal feed production due to its high protein content and relatively good amino acid pattern balance. However, soybean meal contains several anti-nutritional agents that can affect the digestion and absorption of nutrients. Pre-processing of soybean meal through fermentation can be an optimal solution to eliminate anti-nutritional agents and improve the digestibility of nutrients. A hydrolyzed protein compound is a mixture of peptides and amino acids called bioactive peptides. Once released from the protein chain, these peptides exhibit specific biological activities and have antioxidant, antimicrobial, antidiabetic, and anti-cancer properties. This study aimed to produce bioactive peptides from soybean meal via fermentation by *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzea*, and hydrolysis by autoclave. Also, isolated and hydrolyzed protein sources were evaluated under *in vitro* conditions.

Materials and methods: Soybean meal was first ground, and then its protein was extracted through alkaline extraction and acid precipitation. Microorganisms were cultured in a specific culture medium, and then they were added to the isolated protein and the fermentation hydrolysis process was performed. Also, the autoclave was used to perform the hydrolysis process. The isolated and hydrolyzed protein sources were evaluated according to the standard methods to determine the nutritional value such as the amount of crude protein, organic matter, ash, dry matter, and ether extract. *In vitro* gas production test was performed to assess the effects of hydrolysis methods and extent on the biological functionality of protein sources. Three adult Holstein bulls with ruminal fistula were used in order to obtain ruminal fluid to perform the *in vitro* gas production test. Finally, the collected data were subjected to a completely randomized design statistical model using SAS 9.4 software, and the Tukey test was applied to compare the means at a 0.05 significance level.

Results: The results of chemical composition changes during hydrolysis showed that only a significant increase ($P<0.05$) was observed in the amount of dry matter of *A. oryzea* treatment compared to other treatments (28%). Moreover, it was found that the production of bioactive peptides from soy protein by different methods was significantly different ($P<0.05$). The highest amount of peptides with low molecular weight was produced by *B. licheniformis* (0.483 μg/ml). Also, the results from *in vitro* gas production method showed that hydrolysis of soy protein in *A. oryzea* treatment significantly increased the amount of gas production and the fermentable part (318.18 and 421.05 ml/g, respectively) ($P<0.05$). In terms of gas production rate and metabolizable

*Corresponding author: h.khalilvandi@urmia.ac.ir

energy, a significant increase (P<0.05) was observed in autoclave-treatment compared to other treatments (0.027% and 255.92 kj/g, respectively). In terms of digestibility of organic matter, a significant increase (P<0.05) was observed in *B. subtilis* treatment compared to other treatments (78.10%).

Conclusion: The general results of the study showed that hydrolysis of soybean meal through bio-fermentation and hydrolysis by autoclave increased the production of bioactive peptides and *B. licheniformis* produced the highest amount of peptides. Also, *A. oryzea* treatment compared to other treatments made the largest increase in the amount of gas production and fermentable part, which shows the positive effect of hydrolyzed protein production by this method in increasing the biological activity of soybean meal protein.

Keywords: Autoclave, Bioactive peptide, Fermentation hydrolysis, Isolated protein, Soybean meal