



"مقاله پژوهشی"

تولید و ارزیابی پیتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز ضایعات گوشت مرغ و پودر آب پنیر با استفاده از اتوکلاو و فرآیند تخمیر زیستی

وحید یکانی^۱, حامد خلیل‌وندی بهروزیار^۲, رسول پیرمحمدی^۳, مریم دنبادوست چلان^۴ و بهرام محتشمی^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه
۲- استادیار تغذیه دام، گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه، (نوبنده مسؤول: h.khalilvandi@urmia.ac.ir)
۳ و ۴- استاد و دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه
۴- واحد تحقیق و توسعه شرکت دانش بنیان کیمیا دانش‌الوند
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۲
صفحه: ۷۸ تا ۸۸

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: ضایعات گوشت مرغ و پودر آب پنیر به عنوان محصولات جانبی اغلب سرشار از پروتئین‌های با کیفیت بالا هستند و می‌توانند توسط آنزیم‌های پروتئازی تولید شده توسط میکروگانیسم‌ها، هیدرولیز شوند. این پژوهش، با هدف تولید پیتیدهای زیست فعال از ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر، از طریق تخمیر زیستی توسط باکتری‌های باسیلوس سابتلیس، باسیلوس لینکنوفورمیس، قارچ آسپریچلیوس اوراینا، و هیدرولیز توسط اتوکلاو، انجام پذیرفت. همچنین، ارزیابی منابع پروتئینی ایزوله و هیدرولیز شده در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: ضایعات گوشت مرغ ابتدا چریکی شده و سپس از طریق فرآیند استخراج قلیایی و رسوب اسیدی، پروتئین آن جداسازی شد. میکروگانیسم‌ها نیز در محیط کشت اختصاصی، کشت داده شده و سپس به پروتئین جداسازی شده در مرحله قبل، افروده شدند و فرآیند هیدرولیز تخمیری انجام گرفت. همچنین از دستگاه اتوکلاو نیز برای انجام هیدرولیز استفاده شد. منابع پروتئین جداسازی شده و هیدرولیز شده، برای تعیین مقادیر پروتئین خام، ماده آلی، خاکستر، ماده خشک، عصاره اتری، و میزان گاز تولیدی در شرایط برونشت تی، مورد ارزیابی آزمایشگاهی قرار گرفتند. درنهایت، داده‌های حاصل از ارزیابی آزمایشگاهی با استفاده از مدل آماری طرح کاملاً تصادفی توسط نرم‌افزار SAS ۹/۴ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تولید و ارزیابی منابع پروتئینی ایزوله و هیدرولیز، تغییرات جزیی در ترکیب شیمیایی ایجاد شد اما میزان تولید پیتیدهای با وزن مولکولی بین ۱۰۰-۴۰۰ دارای کارایی متفاوتی است. به طوری که در بین محصولات ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر، بیشترین میزان پیتیدهای با وزن مولکولی بین ۱/۲۲۷ و ۷۸۶ میکروگرم بر میلی لیتر تولید شد. اتوکلاو نیز منجر به شکستن پیوندهای شیمیایی ضعیف و افزایش تولید پیتیدهای کوچک گردید. همچنین، نتایج حاصل از تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که هیدرولیز ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر با استفاده از قارچ اورایزا منجر به افزایش میزان گاز تولیدی (به ترتیب ۱۳۹/۷۷ و ۱۸۹/۲۱) گردید و تمام تیمارهای هیدرولیزی منجر به بهبود قابلیت هضم ماده خشک شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج کلی تحقیق نشان داد که هیدرولیز ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر از طریق تخمیر زیستی و هیدرولیز توسط اتوکلاو، میزان تولید پیتیدهای زیست فعال را افزایش داد و باکتری باسیلوس سابتلیس بیشترین میزان پیتید را تولید کرد. همچنین، تیمار آسپریچلیوس اورایزا نسبت به سایر تیمارها، بیشترین افزایش را در میزان گاز تولیدی و پخش قابل تخمیر ایجاد و بخش قابل تخمیر ایجاد مثبت تولید پروتئین هیدرولیز شده با این روش در افزایش فعالیت زیستی پروتئین ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر است.

واژه‌های کلیدی: آنزیمهای پروتئازی، پودر آب‌پنیر، پروتئین ایزوله، ضایعات گوشت مرغ، قابلیت هضم

اکنون دیگر به عنوان ماده زاید در نظر گرفته نمی‌شود، زیرا مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که پروتئین‌های آب‌پنیر به دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا و طیف گسترده‌ی فعالیت زیستی پیتیدهایی که آزاد می‌کند، منبع خوبی برای پیتیدهای زیست فعال می‌باشدند^(۲). فراورده‌های فرعی حیوانی اغلب غنی از پروتئین‌های باکیفیت بالا هستند که می‌توانند به منظور تولید پیتیدهای زیست فعال، توسط پروتئازها هیدرولیز شوند. یک ترکیب پروتئینی هیدرولیز شده مخلوطی از پیتیدها و آمینواسیدهایی است که از انجام عمل هیدرولیز توسط آنزیم، آسید یا قلیاً و یا تخمیر حاصل می‌شوند. این پیتیدها که در توالی اصلی پروتئینی خود به صورت غیرفعال هستند، پس از رها شدن از زنجیره پروتئینی فعالیت‌های بیولوژیکی مشخصی را از خود نشان می‌دهند. پیتیدهای زیست فعال اغلب از ۵ تا ۵۱ آسید‌آmine تشکیل شده‌اند و جرم مولکولی آن‌ها کمتر از ۱۰ کیلو دالتون است^(۱۵). در تغذیه حیوانات، این پیتیدها دارای فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد فشارخون، و خاصیت ایمنی هستند^(۳). به عنوان مثال، به فعال‌سازی پمپ

مقدمه
افزایش ارزش تغذیه‌ای فراورده‌های فرعی از طریق روش‌های مختلف ژنتیکی و تغذیه‌ای می‌تواند منجر به دستیابی همزمان به بیشترین راندمان رشد، تولید و سلامتی حیوانات شود و بدین طریق نیازهای غذایی جمعیت روبه رشد انسانی را تأمین کند. صنعت فرآوری محصولات دام و طیور مقادیر قابل توجهی مواد زاید شامل اعماء و احشاء، چربی یا پیه، پوست، پا، محتویات شکم و روده، استخوان، پر و خون تولید می‌کند. این ضایعات قابلیت تبدیل شدن به هیدرولیزات‌های پروتئینی را دارند^(۱۸). در حال حاضر تولید و مصرف جهانی محصولات حاصل از مرغ روند افزایشی یافته است. این افزایش مصرف مرغ، منجر به افزایش تولید محصولات جانبی به عنوان ضایعات، شده است^(۱۸). پودر آب‌پنیر نیز محصول جانبی از تولید کازئین و پنیر در صنایع لبنی است و حاوی پروتئین‌هایی با ارزش تغذیه‌ای بالا است. در گذشته، آب‌پنیر یک آلاتی‌زده محیط زیستی قوی در نظر گرفته می‌شد زیرا حاوی مقدار زیادی ماده آلی است^(۳). اما

می‌شود. با توجه به مطالب بیان شده، این پژوهش با هدف تولید پیتیدهای زیست فعال از ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر از طریق هیدرولیز تخمیری توسط باکتری‌های باسیلوس ساپتیلیس و باسیلوس لیکنیفورمیس و 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 ۶ ماه از تیرماه سال ۱۳۹۸ تا آذرماه ۱۳۹۸ در آزمایشگاه تغذیه و میکروبیولوژی گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه، و بخشی نیز در آزمایشگاه مرکزی واقع در پردیس دانشگاه ارومیه، صورت گرفت. ضایعات گوشت مرغ صنعتی که شامل اعماء و احشاء، گوشت، پیه و پوست مرغ بود، از بازار محلی ارومیه خریداری شد و پس از شستشو، توسط دستگاه چرخ‌گوشت چرخ گردیده و ترکیب شیمیایی آن بر اساس روش استاندارد AOAC (۱) مورد ارزیابی قرار گرفت که بدین صورت بود؛ ماده خشک ۵۲ درصد، ماده آبی ۹۴ درصد، عصاره اتری ۵۸ درصد، و پروتئین ۳۰ درصد. سپس بهمنظور انجام آزمایش‌های بعدی در یخچال فریزی‌دار (شرکت گروک، فریزیز تحقیقاتی، ایران) و دمای -۲۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پودر آب‌پنیر مورد استفاده برای این مطالعه از شرکت به تام پودر واقع در کرج خریداری شد و ترکیب شیمیایی آن مورد ارزیابی قرار گرفت که بدین صورت بود؛ ماده خشک ۹۵ درصد، ماده آبی ۹۳ درصد، چربی ۸ درصد، و پروتئین ۱۰ درصد. به منظور استفاده از مایع شکمبه برای انجام آزمون تولید گاز در شرایط برون‌تنی، از دو رأس گاو نر بالغ هلشتاین که دارای فیستولای شکمبهای بودند، استفاده شد. سویه‌های باکتری و قارچ موردنیاز که شامل باکتری‌های *Bacillus licheniformis* 1595(DSM 1969) و *Bacillus subtilis* 1156(ATCC 12711) و *Aspergillus oryzae* 5163(ATCC 20423) قارچ (۲۹) از ذخیره‌گاه ژنتیکی سازمان تحقیقات علمی- صنعتی ایران خریداری شدند.

تیمارهای آزمایشی

در این پژوهش، هیدرولیز ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر با استفاده از چهار روش مختلف صورت گرفت. باید اشاره کرد که ابتدا از این دو منبع خوارکی، پروتئین ایزوله تهیه گردید و سپس فرآیند هیدرولیز بر روی این پروتئین ایزوله انجام گرفت. لذا بهمنظور انجام این پژوهش، شش تیمار برای هر یک از منابع خوارکی تنظیم گردید که بدین صورت بودند؛ تیمار یک به عنوان تیمار کنترل منفی به منظور ارزیابی اثر ایزوله کردن و هیدرولیز منابع ایزوله شده در مقایسه با گروه کنترل؛ حاوی منابع خوارکی، تیمار دو (شاهد)؛ پروتئین ایزوله منابع خوارکی، تیمار هیدرولیزی یک؛ هیدرولیز پروتئین ایزوله توسط باکتری باسیلوس ساپتیلیس، تیمار هیدرولیزی دو؛ هیدرولیز پروتئین ایزوله توسط باکتری باسیلوس لیکنیفورمیس، تیمار هیدرولیزی سه؛ هیدرولیز پروتئین ایزوله توسط قارچ آسپرژیلوس اورایزا، و تیمار

سدیم-پتاسیم ATP آز در روده باریک و سایر بافت‌ها کمک می‌کنند. همچنین، پیتیدهای زیست فعال می‌توانند در پیشگیری از ایجاد وضعیت اکسیداتیو، تعديل واکنش‌های التهایی و تضمین هم‌زمان دستیابی به بیشترین راندمان رشد و تولید شیر، نقشی حیاتی داشته باشند (۳). امروزه، میکرووارکانیسم‌های که برای هیدرولیز آنزیمی یا تخمیری برای جیره‌های دام و طیور استفاده می‌شوند، عمدتاً شامل *Bacillus Bacillus licheniformis* (Streptococcus faecium, L.plantarum, subtilis, Aspergillus oryzae, Trichoderma (reesei, Saccharomyces cerevisiae) (۲۰). درواقع، آنزیم‌های پروتئازی حاصل از این میکرووارکانیسم‌ها در هیدرولیز آنزیمی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در هیدرولیز تخمیری نیز، این میکرووارکانیسم‌ها به طور مستقیم به سوبسترای مربوطه افزوده می‌شوند. *Bacillus licheniformis* به طور عمده، پروتئازهای قلیایی و خنثی تولید می‌کنند و در بین قارچ‌ها نیز قارچ رشته‌ای آسپرژیلوس اورایزا بیشترین فعالیت پروتولتیکی را دارد و پروتئازهای متعددی تولید می‌کند که در محدوده pH وسیع (۱۱-۴) (۱۱-۱۲). تیمار با اتوکلاو یک روش آبی-گرمایی مؤثر و در اصل یک فرآیند حرارتی تحت فشار است که در آن عمل هیدرولیز در محفظه‌ی بسته در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۲۰ بار انجام می‌شود (۴). تیمار با اتوکلاو همچنین می‌تواند به عنوان یک پیش تیمار برای هیدرولیز آنزیمی و تخمیری استفاده شود (۵). بلاک و همکاران (۴) تأثیر پیش تیمار اتوکلاو روی پروتئین ایزوله آب‌پنیر و سپس تیمار توسط پروتئازهای جانوری را مطالعه کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که این امر باعث افزایش میزان هیدرولیز و درنتیجه، افزایش میزان تولید پیتیدهای با وزن مولکولی پایین می‌شود. هیدرولیز پروتئین موجود در محصولات جانبی طیور، منجر به تولید هیدرولیزات‌هایی می‌شود که به آسانی قابل جذب هستند و در داخل بدن حیوانات نقش‌های متنوعی ایفا می‌کنند. این امر در تغذیه‌ی حیوانات شیرخوار بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد. علاوه بر این، پیتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاصل از هیدرولیز محصولات جانبی حیوانات می‌توانند بهمنظور تقویت محتوای آنتی‌اکسیدانی جیره غذایی استفاده شوند (۱۶). به عنوان مثال، گزارش شده است که آمینو اسیدهای فیل الائین، ترپیتوفان، هیستیدین، گلیسین، تیروزین، متیونین، لوسمین و والین از خود فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهند (۲۹). هیدرولیزات‌های پروتئینی حیوانی همچنین ممکن است حاوی پیتیدهای شبه اپوئیدی باشند که می‌توانند به عنوان عوامل ضد تنش رفتاری یا عوامل کنترل اشتها و سیری استفاده گردد (۱۶). افزودن این پیتیدها در جیره گوساله‌ها، طیور و ماهی سبب بهبود در وضعیت تغذیه‌ای، عملکرد روده و توانایی مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی شده است (۱۲). با توجه به تمام این خصوصیات، عدم استفاده یا استفاده‌ی کم از فرآورده‌های جانبی نه تنها منجر به از دست رفتن مزایا و درآمدهای احتمالی حاصل از آن‌ها می‌شود، بلکه منجر به افزایش هزینه دفع این محصولات نیز

سرد شدن در دمای اتاق به زیر هود منتقل گردید. مقدار مشخصی از هر یک از باکتری‌های از قبیل کشت شده در محیط کشت NA به درون هر ارلن منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی انکوباتور شیکردار (پویش طب آدک، ایران) با سرعت rpm ۱۵۰ قرار داده شدند (۹). پس از گذشت این مدت، باکتری‌ها به صورت کامل رشد کرده بودند.

کشت قارچ *Aspergillus oryzae*

به منظور فعالسازی، ابتدا قارچ خریداری شده، در محیط کشت PDA^۱ (حاوی ۲ گرم دکستروز، ۰/۴ گرم ناشاسته سیبازمینی، ۱/۵ گرم آگار)، در زیر هود میکروبیولوژیکی کشت داده شده و به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند (۱۴). سپس کشت مایع قارچ صورت گرفت. بدین منظور، ابتدا ۲۵۰ گرم سیبازمینی در ۱ لیتر آب مقطر جوشانده شده، آب سیبازمینی حاصل صاف گردیده و به درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس ۱۵ گرم کنجاله سویا و ۵ گرم ساکارز به آن اضافه گردید (۱۴). محلول حاصل در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید و پس از سرد شدن در دمای اتاق به زیر هود منتقل گردید. مقدار مشخصی از قارچ از قبیل کشت شده در محیط کشت PDA به درون هر ارلن منتقل شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکرداری سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند (۳۴). پس از گذشت این مدت، قارچ به صورت کامل رشد کرد بود.

تئهیه پروتئین هیدرولیز شده

بدین منظور، پروتئین ایزوله ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر پس از بخ زدایی، به مقدار ۴۰ گرم از هر کدام در ظرف‌های مخصوص شیشه‌ای در دار 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 توکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد استریل شدند (۲۶). در ادامه‌ی فرآیند در زیر هود، جهت انجام هیدرولیز تخمیری توسط باکتری‌ها و قارچ، بر اساس روش رشد و همکاران (۲۷) با اندکی اصلاحات، به درون هر شیشه‌ی حاوی منابع پروتئینی ایزوله، به صورت جداگانه ۲۰ میلی‌لیتر از محلول‌های حاوی باکتری و قارچ انتقال داده شد. در پایان عمل انتقال، درب ظروف بسته شده و به داخل انکوباتور انتقال یافتند. ظروف حاوی باکتری در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴ روز و ظرف حاوی قارچ در دمای ۲۸ درجه به مدت ۷ روز در داخل انکوباتور نگهداری شدند و در این مدت فرآیند تخمیر صورت گرفت (۳۴). در پایان این مدت‌ها، تمامی ظروف از انکوباتورها خارج شده و به منظور توقف فرآیند هیدرولیز و همچنین خشک شدن، به داخل آون (ایران خودساز، مدل OD720، ایران) انتقال یافتند و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز نگهداری شدند (۳۲). درنهایت بعد از گذشت این مدت، نمونه‌ها از آون خارج شده، توزین شده و در دمای معمولی نگهداری شدند.

هیدرولیزی چهار: هیدرولیز پروتئین ایزوله توسط دستگاه توکلاو.

تئهیه پروتئین ایزوله شده

در ابتداء، ضایعات گوشت مرغ چربی‌گیری شدند. بدین منظور از روش فولج و همکاران (۱۰) استفاده شد. در این روش ۵ گرم از نمونه چرخ شده، با ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم و متانول (۲ به ۱) توسط هموژنايزر اولتراسونیک sv004ie5-1, industrial systems ۱، ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ توسط سانتریفیوژ یخچال دار CL5 (چین) سانتریفیوژ و پس از آن با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد. سپس مخلوط فیلتر شده که حاوی متانول، کلروفرم و چربی بود، حذف شد و محتویات روی کاغذ صافی به عنوان ضایعات چربی‌گیری شده، جمع‌آوری شدند (۱۰). سپس از این محتویات، پروتئین ایزوله ضایعات گوشت مرغ با استفاده از روش بویه و همکاران (۶) با اندکی اصلاحات در نسبت آب مقطر تهیه شد. در این روش، فرآیند 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 سود یک نرمال به pH ۱۲ رسانده شد. نمونه به خوبی با استفاده از هموژنايزر اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط و با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول شفاف رویی pH ۵/۵ جدا و با استفاده از اسید کلریدریک یک نرمال به pH ۵/۵ pH رسانده شد (۷). ایزو الکتریک پروتئین ضایعات گوشت مرغ (رسانده شد) این سوسپانسیون به طور کامل توسط هموژنايزر اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط و با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا رسوب پروتئینی جدا گردد. رسوب حاصل در ظروف دردار در دمای ۸۰-درجۀ سلسیوس در یخچال فریزر (شرکت گروک، فریزر تحقیقاتی -۸۰، ایران) نگهداری شد (۶).

فرآیند استخراج و نگهداری پروتئین ایزوله از پودر آب‌پنیر نیز از طریق فرآیند استخراج قلیایی و رسوب اسیدی صورت گرفت، با این تفاوت که pH ایزو الکتریک برای پودر آب‌پنیر ۴/۵ در نظر گرفته شد (۲۵).

کشت باکتری‌های *Bacillus* و *Bacillus licheniformis* و *subtilis*

به منظور فعالسازی، ابتدا باکتری‌های خریداری شده، در محیط کشت NA (حاوی ۰/۵ گرم پپتون، ۰/۳ گرم عصاره مخمیر، ۰/۵ گرم سدیم کلرید، ۱ گرم آگار)، در زیر هود میکروبیولوژیکی (class2, lamin air flow) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در انکوباتور (کاوهش mega)، ایران) نگهداری شدند (۳۲). سپس کشت مایع باکتری‌ها صورت گرفت. بدین منظور، 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 Na₂HPO₄, ۱ گرم KH₂PO₄, ۰/۰۱ گرم CaCl₂, ۰/۰۰۵ گرم CuSO₄, ۰/۰۰۲ گرم FeSO₄ به آن اضافه شد (۳۲). محلول حاصل در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه توکلاو (ریحان طب، RT-2، ایران) استریل گردید و پس از

فلاسک‌ها با درپوش پلاستیکی و سپس درپوش آلومینیومی به‌طور محکم بسته شده و در آون با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. فلاسک‌ها هر نیم ساعت یک‌بار تکان داده شدند. میزان گاز تولیدی در ساعت‌های ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت پس از انکوباسیون، با استفاده از دستگاه فشارستنج (Grow, 05H-8432027) ایران، 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 خوارک کم شده و مقدار صحیح گاز تولیدی ناشی از تخمیر نمونه فراوری شده به دست آید. حجم گاز تولیدی در فلاسک‌های حاوی نمونه ماده خوارکی در هر ساعت از انکوباسیون، توسط معادله $F = \frac{A - B}{A} \times 100$ مورد ترجیح شد (۲۲,۲۱) برای اندازه‌گیری درصد گوارش‌پذیری ماده خشک نیز چهار تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد و میزان گاز تولیدی در ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون قرائت و با استفاده از دستگاه ثبت فشار، اندازه‌گیری شد. سپس درپوش شیشه‌ها باز شده و محتویات درون شیشه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، صاف شد. کاغذ صافی حاصل به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد و درصد گوارش‌پذیری ماده خشک با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$F = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A: وزن نمونه قرار داده شده درون شیشه
B: وزن نمونه باقی‌مانده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

روش‌های آماری مورداد استفاده

در این پژوهش، داده‌های حاصل از ارزیابی آزمایشگاهی در ارتباط با ترکیب شیمیابی، گوارش‌پذیری ماده خشک، آنالیز وزن پیتید به روش SDS-PAGE و فرانسنجه‌های تولید گاز، با استفاده از مدل آماری طرح کاملاً تصادفی با اثر ثابت تیمار مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS ۹.۴ و دستور PROC GLM انجام شد و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون توکی و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

Yi = $\mu + Ti + ei$
Yi: مشاهده، μ : میانگین کل مشاهدات، Ti: اثر تیمار و ei: اشتباه آزمایشی

در ارتباط با داده‌های تکرار شده در واحد زمان، داده‌ها با استفاده از مدل آماری دارای اثر زمان به عنوان 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 ۹.۴ انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین حداقل مربعات و خطای استاندارد در جداول مربوطه گزارش شده و تصحیح

به منظور انجام فرآیند هیدرولیز توسط دستگاه اتوکلاو نیز مشابه آنچه قبلاً اشاره شد، چهار تکرار از پروتئین ایزوله در نظر گرفته شد و مشابه روش بلاک و همکاران (۴) با اندکی تغییر، فراوری توسط اتوکلاو صورت گرفت. بدین‌صورت که مقدار ۴۰ گرم از هر نمونه داخل ظروف دردار ریخته شده و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطار 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. پس از این مدت، تمامی ظروف از اتوکلاو خارج شده و به منظور خنک شدن در دمای معمولی قرار گرفتند. درنهایت نمونه‌ها خشک گردیده، توزین شده و جهت انجام ارزیابی‌های آزمایشگاهی، در دمای معمولی نگهداری شدند.

ازریابی آزمایشگاهی

منابع پروتئین ایزوله و هیدرولیز شده تولیدی برای تعیین ارزش تغذیه‌ای همانند مقدار پروتئین خام، ماده آلی، خاکستر، AOAC ماده خشک و عصاره اتری بر اساس روش استاندارد (۱) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین به منظور اطمینان از موقوفیت‌آمیز بودن فرآیند هیدرولیز و بررسی شکسته شدن زنجیره‌های پلی پیتیدی، آنالیز پیتیدها بر اساس روش آنالیز SDS-PAGE (سدیم دودسیل سولفات‌پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز) در شرکت فن گستر اسپوتا صورت پذیرفت.

ازریابی آزمایشگاهی منابع پروتئینی ایزوله و هیدرولیز شده بر اساس روش تولید گاز

به منظور تعیین تأثیر هیدرولیز بر میزان گاز تولیدی در آزمایشگاه از روش تتدورو و همکاران (۳۰) استفاده شد. بدین منظور، مایع شکمبه از گاوها نر هلشتاین فیستولا گذاری شده (با میانگین وزنی ۵۷۰ کیلوگرم) به دست آمد. این گاوها دو بار در روز با جیره حاوی ۴ کیلوگرم یونجه، ۳ کیلوگرم سیلائز ذرت و ۱/۵ کیلوگرم جو خردشده تغذیه می‌شدند و هنگام گرفتن مایع شکمبه، ناشتا بودند. جایگاه دام نیمه باز و مسقف و کف آن بتونی بود. مایع به دست آمده، پس از مخلوط شدن در فلاسک محتوی گازکربنیک سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید. مایع شکمبه پس از صاف کردن همراه با محلول‌های محیط کشت (محلول ماقرورومینرال، محلول میکرورومینرال، محلول احیاکننده، محلول بافر و محلول رسازورین) مطابق روش منکه و همکاران (۲۲) و روش تصحیح شده (۲۱) به نسبت یک قسمت مایع شکمبه (۵۰۰ میلی‌لیتر) و دو قسمت محیط کشت (۴۷۶ میلی‌لیتر آب، ۳۳۷ میلی‌لیتر محلول بافر، ۲۳۷ میلی‌لیتر محلول ماقرورومینرال، ۰۱۲ میلی‌لیتر محلول میکرورومینرال، ۱۰۱ 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. در عین حال، تمامی نمونه‌های آزمایشی با آسیاب دارای غربال یک میلی‌متر آسیاب شده و ۵۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه به صورت 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

ایزوله، به دلیل انجام فرآیند استخراج پروتئین در محیط مایع و افزودن آب، اسید و قلیا بوده و تمام این موارد باعث افزایش رطوبت در پروتئین ایزوله شده‌اند، و گرنه هدر رفت ماده خشک بسیار کم بوده است (۳۱). افزایش در محتوای ماده آلی پروتئین ایزوله نیز می‌تواند به علت فرآیند استخراج پروتئین باشد زیرا درنتیجه‌ی این فرآیند برخی املاح معدنی محلول در آب، از منابع خوراکی جدا شده، در آب حل گردیده و دفع شد. لذا محتوای ماده آلی پروتئین ایزوله نسبت به ماده اولیه، به صورت تناسبی افزایش یافته است. همچنین، کاهش در میزان عصاره اتری در پروتئین ایزوله می‌تواند به دلیل سانتریفیوژ نمونه‌ها باشد که باعث می‌شود در طی سانتریفیوژ با دور بالا، چربی به پروتئین‌های نامحلول متصل شده و همراه آن‌ها رسوب کند. همچنین مقداری از چربی نیز به صورت یک لاشه مجزا، بعد از سانتریفیوژ روی آب دیده شد که همراه با آب دفع گردید. باید اشاره کرد که پروتئین ایزوله به عنوان یک فراورده‌ی کم‌چرب شناخته می‌شود. نتایج مطالعه تیان و همکاران (۳۱) نشان داد که فرآیند تهیه پروتئین ایزوله سویا منجر به کاهش ماده خشک و عصاره اتری، و افزایش پروتئین و ماده آلی در پروتئین ایزوله نسبت به کنحاله سویا می‌شود. این نتایج، تقریباً با مشاهدات مارتینز و همکاران (۱۹) مطابقت دارد. آن‌ها همچنین پروتئین ایزوله سویا را با خلوص ۹۰ درصد به دست آوردند. افزایش در محتوای پروتئین، پروتئین ایزوله نیز مربوط به فرآیند استخراج و تهیه پروتئین ایزوله است زیرا درنتیجه‌ی این فرآیند، اغلب بخش‌های غیرپروتئینی از بخش‌های پروتئینی جدا و حذف شد. بدین صورت محتوای پروتئینی، پروتئین ایزوله نسبت به ماده اولیه، افزایش یافت (۱۹).

داده‌ها با استفاده از آزمون توکی و مقایسه میانگین‌ها با گزینه PDIFF در سطح احتمال آماری ۰/۰۵ انجام گرفت.

$$Y_{ij} = \mu + Ti + Tj + Tit_{ij} + e_{ij}$$

μ : میانگین جامعه؛ Ti : اثر تیمار؛ Tj : اثر زمان انکوباسیون؛ ij : اثر متقابل زمان انکوباسیون و تیمار فراوری؛ e_{ij} : اثر اشتباہ آزمایشی همچنین داده‌های مربوط به کینتیک تولید گاز و فراسنجه‌های آزمون تولید گاز، قبل از آغاز توسط نرم‌افزار SAS به وسیله‌ی Fitcurve نرم‌افزار برآش شدن. تمامی آنالیزهای آزمایشگاهی انجام شده در ارتباط با تعیین ترکیبات شیمیایی، آنالیز وزن پیتید به روش SDS-PAGE، کینتیک تولید گاز و فراسنجه‌های آزمون تولید گاز با چهار تکرار آزمایشی انجام شدن.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی

نتایج مربوط به تغییرات ترکیبات شیمیایی ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر فراوری شده توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف، به ترتیب در جداول ۱ و ۲ اورده شده است. به طور کلی، فراوری این دو منبع خوراکی توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف، تغییرات چندانی در ترکیب شیمیایی محصولات ایجاد نکرده است اما فرآیند تهیه پروتئین ایزوله منجر به کاهش ماده خشک و چربی و افزایش پروتئین و ماده آلی در پروتئین ایزوله منبع خوراکی نسبت به خود منابع خوراکی گردیده است. مقدار ماده خشک پروتئین ایزوله منابع خوراکی نسبت به خود منابع خوراکی کاهش یافته است. باید اشاره کرد که این حجم از کاهش در ماده خشک پروتئین

جدول ۱- ترکیب شیمیایی ضایعات گوشت مرغ فراوری شده توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف

Table 1. Chemical composition of processed chicken meat waste with different hydrolysis methods

ترکیب	ضایعات ایزوله ضایعات*	سباتلیس	لیکنیفورمیس	اورایزا	اتوکلاو	تیمارها		SEM	p-value
						ضایعات	ایزوله ضایعات*		
ماده خشک	۰/۵۲ ^a	۰/۱۵ ^c	۰/۱۷ ^b	۰/۱۷ ^b	۰/۱۳ ^d	۰/۱۳ ^d	۰/۱۷ ^b	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱
ماده آلی	۰/۹۴ ^b	۰/۹۷ ^a	۰/۹۷ ^a	۰/۹۸ ^a	۰/۹۷ ^a	۰/۹۸ ^a	۰/۹۷ ^a	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱
عصاره اتری	۰/۵۸ ^a	۰/۱۵ ^b	۰/۱۴ ^b	۰/۱۳ ^c	۰/۱۴ ^b	۰/۱۴ ^b	۰/۱۴ ^b	۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۱
پروتئین	۰/۳۰ ^d	۰/۸۰ ^{ab}	۰/۷۸ ^b	۰/۸۱ ^a	۰/۷۹ ^b	۰/۷۹ ^b	۰/۸۱ ^a	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۱

حروف بالاترین متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی دار در سطح آماری ۰/۰۵ می‌باشد.
*: تیمار شاهد p-value: خطای استاندارد میانگین

تری و پروتئین نیز کاهش می‌یابد. علاوه بر این، کاهش غیرمنتظره در محتوای پروتئین ضایعات گوشت مرغ هیدرولیز شده توسط باکتری باسیلوس سباتلیس، مشاهده می‌شود (۰/۰۶۲). این کاهش می‌تواند به علت خطا آزمایشی، آلودگی میکروبی و یا عدم توقف فرآیند هیدرولیز تخمیری در این تیمار صورت گرفته باشد. ژانگ و همکاران (۳۳) گزارش دادند که در طی هیدرولیز تخمیری محتوای پروتئین تغییر چندانی پیدا نمی‌کند اما زنجیره‌های پلی پیتیدی شکسته می‌شوند بدین صورت که زنجیره‌های با وزن مولکولی زیاد (بزرگ‌تر از ۱۰۰۰۰ دالتون) به پیتیدهای با وزن مولکولی کم (کوچک‌تر از ۱۰۰۰۰ دالتون) تبدیل می‌شوند. به طور کلی، تغییرات در

اگر تیمارهای هیدرولیزی باکتری‌های باسیلوس سباتلیس، باسیلوس لیکنیفورمیس، قارچ اورایزا و دستگاه اتوکلاو را با پروتئین ایزوله منابع خوراکی (تیمار شاهد) مقایسه کنیم، تغییرات چندانی در ترکیبات شیمیایی ایجاد نشده است. افزایش جزئی در مقدار ماده خشک پروتئین هیدرولیزی نسبت به تیمار پروتئین ایزوله، می‌تواند در نتیجه‌ی رشد و متابولیسم میکرووارگانیسم‌ها صورت گرفته باشد. کاهش جزئی ماده آلی در برخی تیمارهای نیز می‌تواند به علت رشد و متابولیسم میکرووارگانیسم‌ها باشد، زیرا میکرووارگانیسم‌ها به منظور رشد نیازمند منابع انرژی، کربن و نیتروژن هستند (۱۱). لذا با مصرف ماده آلی، محتوای کربوهیدرات، عصاره

آزمایش می‌شود، زیرا قند به عنوان منبع کربن مصرف می‌شود و رطوبت نیز به علت تولید گرما و مصرف رطوبت توسط میکرووارگانیسم کاهش می‌یابد. همچنین آن‌ها کاهش جزئی در ماده آلی مشاهده کردند.

ترکیب شیمیایی می‌تواند در نتیجه‌ی رشد و متابولیسم میکرووارگانیسم‌ها صورت گرفته باشد. چانچارونپونگ و همکاران (۸) گزارش دادند که رشد قارچ اورایزا در مرحله‌ی هیف (رشته‌های یا ریشه‌های نخی شبکه موجود در ساختار قارچ) باعث کاهش رطوبت و محتوای قند در ماده خوارکی مورد

جدول ۲- ترکیب شیمیایی پودر آب‌پنیر فراوری شده توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف

Table 2. Chemical composition of processed whey powder with different hydrolysis methods

تیمارها									
p-value	SEM	اتوکلاو	اورایزا	لیکنیفورمیس	سابتلیس	ایزوله آب‌پنیر*	آب‌پنیر	ترکیبات	
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۴	۰/۲۱ ^d	۰/۲۷ ^b	۰/۲۸ ^b	۰/۲۵ ^b	۰/۲۳ ^c	۰/۹۵ ^a	ماده خشک	
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۹۸ ^a	۰/۹۸ ^a	۰/۹۷ ^a	۰/۹۷ ^a	۰/۹۸ ^a	۰/۹۳ ^b	ماده آلی	
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۴ ^c	۰/۰۶ ^b	۰/۰۶ ^b	۰/۰۶ ^b	۰/۰۷ ^{ab}	۰/۰۸ ^a	عصاره اتری	
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۶۳ ^a	۰/۶۱ ^b	۰/۶۱ ^b	۰/۶۱ ^b	۰/۶۲ ^{ab}	۰/۱۰ ^b	پروتئین	

حروف بالاترین متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح آماری ۰/۰۵ می‌باشد.
SEM: خطای استاندارد میانگین *: تیمار شاهد p-value

ختنی تولید می‌کند (۲۴). همچنین Yin و همکاران (۳۲) که تخمیر سویا با استفاده از باکتری *Bacillus subtilis* را مورد مطالعه قرار دادند، گزارش کردند که آنزیم‌های غالباً که این باکتری تولید می‌کند عمدتاً پروتئاز و کربوکسی پیپتیداز هستند. ژانگ و همکاران (۳۳) گزارش دادند که در طی هیدرولیز زنجیره‌های بلی پیپتیدی با وزن مولکولی زیاد (بزرگ‌تر از ۱۰۰۰۰ دالتون) به پیپتیدهای با وزن مولکولی کم (کوچک‌تر از ۱۰۰۰۰ دالتون) شکسته می‌شوند. این امر توسط آنزیم‌های پروتئازی صورت می‌گیرد. سانگرونویس و همکاران (۲۸) گزارش کردند که در طی هیدرولیز، اندوپیپتیدازها پروتئین‌ها را تجزیه کرده و الیگوپیپتید تولید می‌کنند، الیگوپیپتیدها بیز توسط اگزوپیپتیدازها کوچک‌تر شده و تشکیل پروتئین‌های با وزن مولکولی کم و اسیدهای آمینه افزایش دهنده است. یافته شده است که محتوای اسیدآمینه افزاد سویا تخمیر شده توسط سویه‌های پروتئولیتیک باسیلوس سابتلیس، ۱۰ الی ۲۰ برابر افزایش می‌یابد (۲۹). در اثر فرآیند اتوکلاو نیز بخشی از پروتئین‌ها واپرستانه شده و به پروتئین‌های کوچک‌تر تبدیل می‌شوند و محتوای پیپتیدهای با وزن مولکولی پایین افزایش می‌یابد. تیمار توسط اتوکلاو منجر به شکستن پیوندهای شیمیایی ضعیف می‌شود، اما بر روی پیوندهای کووالانسی تأثیر نمی‌گذارد (۱۷). کیم و همکاران (۱۳) تأثیر تیمار توسط اتوکلاو را بر روی کنجاله سویا مطالعه کردند و دریافتند که این امر باعث افزایش محتوای آمینواسیدهای افزاد و پیپتیدهای با وزن مولکولی کم می‌شود.

ارزیابی میزان تولید پیپتیدهای با وزن مولکولی پایین بر اساس روش SDS-PAGE
تأثیر انواع فرآیندهای هیدرولیز بر میزان تولید پیپتیدهای با وزن مولکولی پایین (کوچک‌تر از ۱۰ کیلو دالتون) از پروتئین ایزوله ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر (برحسب میکروگرم بر میلی لیتر) در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، هر چهار تیمار هیدرولیزی (باسیلوس سابتلیس، باسیلوس لیکنیفورمیس، قارچ اورایزا، اتوکلاو) نسبت به تیمار شاهد (پروتئین ایزوله)، میزان تولید پیپتیدهای با وزن مولکولی پایین را افزایش داده‌اند. این امر نشان‌دهنده موققیت‌آمیز بودن فرآیند هیدرولیز و شکسته شدن پروتئین‌های بزرگ به قطعات کوچک‌تر می‌باشد. همچنین بین تیمارهای مختلف هیدرولیزی تفاوت‌های معنی‌دار در سطح آماری ۰/۰۵ دیده شد به طوری که در بین محصولات ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر، بیشترین میزان پیپتیدهای با وزن مولکولی پایین، توسط باکتری باسیلوس سابتلیس (به ترتیب ۱/۲۷۷ و ۰/۷۸۶ میکروگرم بر میلی لیتر) تولید شد. تفاوت در میزان تولید پیپتیدهای با وزن مولکولی پایین در بین منابع خوارکی می‌تواند به علت تفاوت در نوع سوبسترا و در بین گونه‌های باکتریایی و قارچی می‌تواند به علت تفاوت در نوع آنزیم‌های تولیدی باشد. مثلاً مشخص شده است که مختلف مواد غذی را دراد و آنزیم‌های مختلف هیدرولیتیک تولید و ترشح می‌کند و به طور عمده، پروتئازهای قلبیایی و

جدول ۳- تأثیر انواع فرآیندهای هیدرولیز بر میزان تولید پیپتیدهای با وزن مولکولی پایین (برحسب میکروگرم بر میلی لیتر)

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

تیمارها								
p-value	SEM	اتوکلاو	اورایزا	لیکنیفورمیس	سابتلیس	پروتئین ایزوله*	منبع خوارکی	
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۲۴۹ ^d	۰/۵۷۹ ^c	۰/۷۲۶ ^b	۰/۷۸۶ ^a	۰/۰۶۳ ^c	پودر آب‌پنیر	
۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۲	۰/۲۳۷ ^d	۰/۹۸۱ ^b	۰/۴۹۰ ^c	۱/۲۲۷ ^a	۰/۰۴۹ ^e	ضایعات گوشت مرغ	

حروف بالاترین متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۰/۰۵ می‌باشد. SEM: خطای استاندارد میانگین *: تیمار شاهد p-value

علت تفاوت در نوع آنزیم‌های تولیدی باش. مثلاً اورایزا علاوه بر پروتئاز، آنزیمهای سلولاز و گلوکوآمیلاز ترشح می‌کند که می‌توانند از طریق تخریب دیواره سلولی و شکستن پلیمرهای پیچیده‌ی کربوهیدراتی، به عمل هیدرولیز کمک کنند (۳۴). در بخش قابل تخمیر در زمان (b) نیز بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار یافت شد، به طوری که بیشترین میزان به تیمار ایزوله خسایعات گوشت مرغ تعاق بگرفت. همچنین بین تیمارهای مختلف از نظر نرخ تولید گاز (c) تفاوت معنی‌دار یافت شد، به طوری که بیشترین مقدار به تیمار اورایزا تعلق گرفت. از نظر درصد گوارش‌پذیری ماده خشک نیز بیشترین مقدار به تیمار باسیلوس سابتلیس (۶۸) درصد) و باسیلوس لیکنیفورمیس (۵۲ درصد) تعاق گرفت. افزایش درصد گوارش‌پذیری ماده خشک را می‌توان به تأثیر آنزیم‌ها بر ترکیبات دیواره سلولی و افزایش قابلیت دسترسی به بخش‌های قابل مربوط دانست (۳۴). به طور کلی، می‌توان توجه گرفت که تیمار اورایزا نسبت به تیمار شاهد منجر به افزایش میزان گاز تولیدی گردید و تیمارهای هیدرولیزی باسیلوس سابتلیس، باسیلوس لیکنیفورمیس، و اورایزا نیز منجر به بهبود قابلیت هضم ماده خشک شدند.

نتایج حاصل از ارزیابی منابع پروتئینی ایزوله و هیدرولیز شده بر اساس روش تولید گاز آزمایشگاهی (*In vitro*) کینتیک و فرانستجه‌های تولید گاز محصولات خسایعات گوشت مرغ (بر اساس ۵۰۰ میلی گرم ماده خشک) در جدول ۴ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تولید گاز تجمعی در تمامی تیمارها با افزایش ساعت انکوباسیون، افزایش یافته است. اگر تیمار شاهد (پروتئین ایزوله) را با تیمارهای هیدرولیزی مقایسه کنیم، مشاهده می‌شود که از ساعت ۴ به بعد، تیمار اورایزا در تمام ساعات انکوباسیون بیشترین مقدار تولید گاز داشته است. بعد از تیمار اورایزا بیشترین میزان تولید گاز در تیمارهای باسیلوس لیکنیفورمیس و ایزوله خسایعات مرغ (شاهد) مشاهده شد. علاوه بر این، کمترین میزان تولید گاز در ساعت ۱۴۴ انکوباسیون به تیمار باسیلوس سابتلیس (۱۱۰/۰۲) متعلق بود. این امر می‌تواند به دلیل خطای آزمایشی و عدم توقف فرآیند هیدرولیز و دنتیجه، مصرف بخشی از کربوهیدرات‌های سهل‌الهضم توسعه باکتری باسیلوس سابتلیس، صورت گرفته باشد. تفاوت در بین گونه‌های باکتریایی و قارچ از نظر تولید گاز، می‌تواند به

جدول ۴- کینتیک و فرانستجه‌های تولید گاز خسایعات گوشت مرغ فرآوری شده توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف (بر اساس ۵۰۰ میلی گرم ماده خشک)

Table 4. Kinetics and parameters of gas production of processed chicken meat waste with different hydrolysis methods (Based on 500 mg of dry matter)

تیمارها								
p-value	SEM	اتوکلاو	اورایزا	لیکنیفورمیس	سانتلیس	خسایعات گوشت مرغ*	ایزوله گوشت مرغ*	ساعت
.۰۵۴۱۱	۲/۵۷۱	۷/۹۳	۱۱/۵۳	۸/۹۰	۹/۱۷	۷/۶۳	۸/۵۵	۲
.۰/۰۳۱۷	۲/۵۷۱	۱۶/۱۶ ^{ab}	۲۲/۵۷ ^a	۱۷/۲۱ ^{ab}	۱۷/۵۹ ^{ab}	۱۴/۱۷ ^b	۱۷/۹۴ ^{ab}	۴
.۰/۰۰۱۵	۲/۵۷۱	۲۲/۳۶ ^b	۳۳/۵۴ ^a	۲۵/۲۶ ^b	۲۴/۶۸ ^b	۲۰/۱۴ ^b	۲۶/۷۱ ^{ab}	۶
.۰/۰۱۷۴	۲/۵۷۱	۲۹/۹۱ ^{bc}	۴۴/۴۲ ^a	۳۳/۱. ^{bc}	۳/۱۸ ^{bc}	۲۴/۹۵ ^c	۳۵/۵۷ ^b	۸
.۰/۰۰۹۷	۲/۵۷۱	۳۵/۷۸ ^c	۵۶/۶۸ ^a	۴۲/۱۵ ^b	۳۷/۹. ^{bc}	۳۰/۶۱ ^c	۴۳/۱۵ ^b	۱۲
.۰/۰۲۱۴	۲/۵۷۱	۴۴/۱۰. ^c	۷۱/۸۲ ^a	۵۵/۷۴ ^b	۵۷/۱۴ ^b	۴۰/۰۱ ^c	۵۵/۸۴ ^b	۲۴
.۰/۰۲۸۷	۲/۵۷۱	۵۲/۱۴ ^c	۸۶/۸۴ ^a	۷۰/۰۲ ^b	۷۲/۳۱ ^b	۵۶/۶۰ ^c	۶۶/۴۳ ^b	۴۸
.۰/۰۴۵۸	۲/۵۷۱	۶۶/۴۸ ^c	۱۰/۱۰. ^{bc}	۸/۱۷ ^b	۸/۱۴ ^b	۷۶/۳۷ ^b	۷۶/۷۷ ^b	۷۲
.۰/۰۰۷۷	۲/۵۷۱	۸۱/۸۴ ^d	۱۱۳/۳۸ ^a	۹۱/۲۳ ^{bc}	۸۸/۶. ^{cd}	۹۶/۹۱ ^b	۸۷/۱۱ ^{cd}	۹۶
.۰/۰۱۰۵	۲/۵۷۱	۱۰۲/۴۱ ^{bc}	۱۲۵/۱۵ ^a	۱۰۹/۶۴ ^b	۱۰۰/۸۴ ^c	۱۱۸/۰۶ ^a	۱۰۵/۲۰ ^{bc}	۱۲۰
.۰/۰۴۰۰	۲/۵۷۱	۱۲۱/۰۲ ^b	۱۳۹/۷۷ ^a	۱۲۶/۶۷ ^b	۱۱۰/۰۲ ^c	۱۳۶/۶۰. ^a	۱۱۹/۳۳ ^b	۱۴۴
فرانستجه‌های تولید گاز								
.۰/۰۰۰۱	۱۲/۸۰۲	۱۲۴/۲۰. ^b	۱۲۰/۸۷ ^b	۱۰۹/۲۹ ^{bc}	۹۸/۳۰. ^c	۱۸۳/۴۶ ^a	۱۰۱/۶۸ ^{bc}	b(mL)
.۰/۰۰۰۱	.۰/۰۰۵	.۰/۰۱۴ ^c	.۰/۰۴. ^a	.۰/۰۲۹ ^b	.۰/۰۳۵ ^a	.۰/۰۰۸ ^c	.۰/۰۳۰ ^b	c(%)/h)
.۰/۰۰۰۱	۸/۹۴۹	۱۴/۰۰. ^a	۳۰/۰.. ^c	۵۲/۰۰.. ^b	۶۸/۰.. ^a	۱۸/۰.. ^d	۲۶/۰.. ^c	DMD(%)

حروف بالاتر متفاوت در هر سطر شان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح آماری ۰/۰۵-۰/۰۰۵ می‌باشد (p-value<0/05).

*: تیمار شاهد p-value: احتمال معنی‌داری

b: بخش قابل تخمیر(میلی لیتر بر گرم) c: نرخ تولید گاز (درصد در ساعت) DMD: درصد گوارش‌پذیری ماده خشک SEM: خطای استاندارد میانگین

جدول ۵- کیتیک و فراسنجه‌های تولید گاز پودر آب‌پنیر فراوری شده توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف (بر اساس ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)

Table 5. Kinetics and parameters of gas production of processed whey powder with different hydrolysis methods (Based on 500 mg of dry matter)

p-value	SEM	تیمارها								ساعت
		اتوكلاو	اورایزا	لیکنیفورمیس	سابلیس	ایزوله آب‌پنیر*	آب‌پنیر	آب‌پنیر	آب‌پنیر	
۰/۱۷۴۹	۳/۰۶	۹/۹۶	۱/۰/۸۵	۷/۰/۳	۸/۷۴	۶/۳/۳۶	۶/۱۴	۶/۱۴	۲	
۰/۰۴۰۱	۳/۰۶	۱۹/۴۳	۲۲/۶۳	۱۵/۱۸	۱/۷۴	۱۴/۷۵	۱۵/۳۴	۱۵/۳۴	۴	
۰/۰۱۴۴	۳/۰۶	۲۹/۴۸ ^b	۲۳/۱۶ ^a	۲۳/۱۸ ^b	۲۸/۸ ^{ab}	۲۶/۵۸ ^{ab}	۳۱/۷۵ ^b	۳۱/۷۵ ^b	۶	
۰/۰۰۲۰	۳/۰۶	۳۸/۷۹ ^{bc}	۴۵/۵۰ ^b	۳۱/۱۵ ^c	۳۷/۶۸ ^{bc}	۴۱/۲۵ ^{bc}	۶۴/۲۶ ^a	۶۴/۲۶ ^a	۸	
۰/۰۳۹۹	۳/۰۶	۴۶/۴۹ ^{cd}	۵۷/۱۳ ^b	۴۰/۰/۸۷ ^d	۴۹/۴۸ ^{bc}	۵۴/۴۸ ^{bc}	۹۹/۹۱ ^a	۹۹/۹۱ ^a	۱۲	
۰/۰۴۵۱	۳/۰۶	۵۷/۰/۰ ^a	۷۲/۷۹ ^{bc}	۵۸/۰/۳ ^d	۶۹/۳/۸ ^c	۸۱/۱۵ ^d	۱۲۸/۹۸ ^a	۱۲۸/۹۸ ^a	۲۴	
۰/۰۰۴۹	۳/۰۶	۶۲/۹۶ ^a	۶۹/۴۶ ^b	۷۸/۸/۱۵ ^c	۸۴/۰/۰ ^c	۱۰۴/۱۴ ^b	۱۴۶/۷۳ ^a	۱۴۶/۷۳ ^a	۴۸	
۰/۰۰۵۷	۳/۰۶	۶۹/۱۲ ^e	۱۲۶/۱۸ ^b	۹۴/۰/۷ ^d	۹۵/۴۳ ^d	۱۱۷/۴۹ ^c	۱۵۹/۵۲ ^a	۱۵۹/۵۲ ^a	۷۲	
۰/۰۰۰۱	۳/۰۶	۷۷/۲۵ ^e	۱۵/۰/۳۶ ^b	۱۰/۶/۹۳ ^d	۱۰/۵/۸ ^a	۱۲۹/۱۶ ^c	۱۶۹/۰/۳ ^a	۱۶۹/۰/۳ ^a	۹۶	
۰/۰۴۲۱	۳/۰۶	۹۱/۳/۵ ^e	۱۷۲/۹۱ ^b	۱۲۲/۸/۸ ^a	۱۱۷/۹/۰ ^a	۱۴۲/۴/۰ ^c	۱۸۲/۹/۷ ^a	۱۸۲/۹/۷ ^a	۱۲۰	
۰/۰۱۲۱	۳/۰۶	۱۰/۱/۶۱ ^e	۱۸۹/۲/۱ ^a	۱۳۴/۵/۲ ^d	۱۲۷/۳/۲ ^d	۱۵۰/۰/۶ ^c	۱۹۱/۲/۸ ^a	۱۹۱/۲/۸ ^a	۱۴۴	
فراسنجه‌های تولید گاز										
۰/۰۰۰۱	۶/۷۹۱	۷۸/۷۷۳ ^c	۲۱۷/۹۹. ^a	۱۳۸/۲۹. ^b	۱۱۱/۶۴۱ ^b	۱۳۹/۶۱۸ ^b	۱۹۴/۴۹۱ ^a	b (ml)		
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۴	۰/۰۲۰ ^{bc}	۰/۰۱۰ ^c	۰/۰۱۵ ^{bc}	۰/۰۲۶ ^{bc}	۰/۰۳۱ ^b	۰/۰۶۵ ^a	c (%/h)		
۰/۰۰۰۱	۱/۰۹۸	۴۲/۰/۰ ^c	۶۷/۰/۰ ^b	۳۰/۰/۰ ^a	۵۶/۰/۰ ^b	۲۶/۰/۰ ^a	۷۶/۰/۰ ^a	DMD(%)		

حروف بالاترین متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح آماری $0/0/5$ می‌باشد ($p\text{-value} < 0/0/5$).

*: تیمار شاهد p-value : اختصار معنی‌داری
b: بخش قابل تحریر (میلی لیتر بر گرم) c: نرخ تولید گاز (درصد در ساعت) DMD: درصد گوارش پذیری ماده خشک SEM: خطای استاندارد میانگین

میکروبی باشد (۳۴). همچنین بین تیمارهای مختلف از نظر نرخ تولید گاز (c) تفاوت معنی‌دار مشاهده شد، به طوری که بیشترین مقدار به تیمار پودر آب‌پنیر تعلق گرفت. از نظر درصد گوارش پذیری ماده خشک نیز بیشترین مقدار به تیمار پودر آب‌پنیر (۷۶ درصد) و اورایزا (۶۲ درصد) تعلق گرفت و در تیمارهای اتوكلاو، سابلیس، لیکنیفورمیس و دستگاه اتوكلاو بهبود معنی‌دار نسبت به پروتئین ایزوله (شاهد) مشاهده شد. می‌توان نتیجه گرفت که به طور کلی تیمار اورایزا نسبت به تیمار شاهد منجر به افزایش میزان گاز تولیدی و بخش قابل تخمیر گردید و تمام تیمارهای هیدرولیزی و ایزوله آب‌پنیر (شاهد) افزایش نیز منجر به بهبود قابلیت هضم ماده خشک شدند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات پیشین می‌توان نتیجه گرفت که عدم استفاده یا استفاده‌کم از فرآوردهای جانبی حیوانی نه تنها منجر به از دست رفتن درآمدهای احتمالی می‌شود بلکه منجر به افزایش هزینه دفع این محصولات می‌شود. به همین دلیل، صنعت باید برای استفاده از این خایعات، عمدهاً به صورت محصولات با ارزش افزوده، شروع به توسعه فناوری‌های مختلفی کند و در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

کیتیک و فراسنجه‌های تولید گاز محصولات پودر آب‌پنیر (بر اساس ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) در جدول ۵ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده شود، پودر آب‌پنیر در تمام ساعات انکوباسیون بیشترین مقدار گاز تولیدی را داشته است. علت این امر را می‌توان به وجود کربوهیدرات‌های سهل‌الهضم و محتوای کربوهیدراتی و کازتین بینش در پودر آب‌پنیر، مربوط دانست. مقدار گاز تولیدی به میزان کربوهیدرات‌ها بستگی دارد (۲۲). اگر تیمار شاهد (پروتئین ایزوله) را با تیمارهای هیدرولیزی مقایسه کنیم، مشاهده می‌شود که میزان تولید گاز در تیمار اورایزا نسبت به سایر تیمارهای هیدرولیزی و ایزوله آب‌پنیر (شاهد) افزایش یافته است. همان‌طور که قبل اشاره شد، تفاوت در بین گونه‌های باکتریایی و قارچی از نظر تولید گاز، می‌تواند به علت تفاوت در نوع آنزیم‌های تولیدی باشد (۲۴). در بخش قابل تخمیر در زمان (b) نیز بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌دار مشاهده شد، به طوری که بیشترین میزان به تیمار اورایزا (۲۱۷/۹۹) تعلق گرفت. همان‌طور که قبل اشاره شد، افزایش در بخش قابل تخمیر (b) در تیمار اورایزا ممکن است درنتیجه‌ی آنزیم‌های تولیدی قارچ اورایزا و بهبود دسترسی بخش کربوهیدراتی برای تخمیر

منابع

- AOAC. 2000. Official methods of analysis. 17th ed. Gaithersburg, M.D., USA, Association of Official Analytical Chemists International.
- Bacenetti, J., L. Bava, A. Schievano and M. Zucali. 2018. Whey protein concentrate (WPC) production: Environmental impact assessment. *Journal of Food Engineering*, 224: 139-147.
- Ballatore, M.B., M. del Rosario Bettoli, N.L.V. Braber, C.A. Aminahuel, Y.E. Rossi, G. Petroselli and M.A. Montenegro. 2020. Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin. *Food Chemistry*, 319: 126472.
- Blayo, C., O. Vidcoq, F. Lazennec and E. Dumay. 2016. Effects of high pressure processing (hydrostatic high pressure and ultra-high pressure homogenisation) on whey protein native state and susceptibility to trypic hydrolysis at atmospheric pressure. *Food Research International*, 79: 40-53.
- Boukil, A., S. Suwal, J. Chamberland, Y. Pouliot and A. Doyen. 2018. Ultrafiltration performance and recovery of bioactive peptides after fractionation of trypic hydrolysate generated from pressure-treated β -lactoglobulin. *Journal of Membrane Science*, 556: 42-53.
- Boye, J., F. Zare and A. Pletch. 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *J. Food Research International* 43: 414-431.
- Cercel, F., M. Stroiu, P. Alexe and D. Ianițchi. 2015. Characterization of myofibrillar chicken breast proteins for obtain protein films and biodegradable coatings generation. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6: 197-205.
- Chancharoonpong, C., P.C. Hsieh and S.C. Sheu. 2012. Effect of different combinations of soybean and wheat bran on enzyme production from *Aspergillus oryzae* S. APCBEE Procedia, 2: 68-72.
- Dos Santos Aguilar, J.G. and H.H. Sato. 2018. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103: 253-262.
- Folch, J., M. Lees and G. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1): 497- 509.
- Hajieghrari, B. and N. Farrokhi. 2020. Investigation on the conserved microRNA genes in higher pPlants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1-14.
- Hou, Y., Z. Wu, Z. Dai, G. Wang and G. Wu. 2017. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1): 1-13.
- Kim, M.Y., G.Y. Jang, N.S. Oh, S.Y. Baek, S.H. Lee, K.M. Kim and H.S. Jeong. 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 & Emerging Technologies*, 43: 84-91.
- Kupski, L., M.A. de Carvalho Silvello, M.R.V. Fontes, T.S. Lima, H. Treichel and E. Badiale Furlong. 2015. R. oryzae Cellulases: A new approach to degrading lignocellulosic material. *Journal of Food Biochemistry*, 39(2): 129-138.
- Lasekan, A., F. Abu Bakar and D. Hashim. 2013. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Management*, 33(3): 552-565.
- Lee, S.Y. and S.J. Hur. 2017. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228: 506-517.
- Lozano-Ojalvo, D., L. Pérez-Rodríguez, A. Pablos-Tanarro, R. López-Fandiño and E. Molina. 2017. Pepsin treatment of whey proteins under high pressure produces hypoallergenic hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43: 154-162.
- Martinez Alvarez, O., S. Chamorro and A. Brenes. 2015. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*, 73(1): 204-212.
- Martins, V.B. and F.M. Netto. 2006. Physicochemical and functional properties of soy protein isolate as a function of water activity and storage. *Journal of Food Research International*, 39: 145-153.
- Meale, S.J., A.V. Chaves, M.L. He and T.A. McAllister. 2014. Dose-response of supplementing marine algae (*Schizochytrium* spp.) On production performance, fatty acid profiles and wool parameters of growing lambs. *J. Anim. Sci*, 92(5): 2202-2213.
- 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.
- Menke, K.H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz and W. Schneider. 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.
- Nasehi, M., N.M. Torbatinejad, S. Zerehdaran and A.R. Safaei. 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.

24. Parrado, J., B. Rodriguez-Morgado, M. Tejada, T. Hernandez and C. Garcia. 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.
25. Pelegrine, D.H.G. and C.A. Gasparetto. 2005. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT-Food Science and Technology*, 38(1): 77-80.
26. Piota, R., M. Tonelotto, P. Delabona, R. Fonseca, D. Paixão, F. Baleiro, V. Bertucci-Neto and C. Farinas. 2016. Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33: 21-31.
27. Rashad, M.M., A.E. Mahmoud, H.M. Abdou and M.U. Nooman. 2011. Improvement of nutritional Quality and antioxidant activities of yeast fermented soybean curd residue, *Afr Journal Biotechnol*, 10: 5504-5513.
28. Sangronis, E., M. Rodríguez, R. Cava and A. Torres. 2006. Protein quality of germinated *Phaseolus vulgaris*. *European Food Research and Technology*, 222(1-2): 144.
29. Sanjukta, S., A.K. Rai, A. Muhammed, K. Jeyaram and N.C. Talukdar. 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.
30. Theodorou, M.K., B.A. Williams, M.S. Dhanoa, A.B. McAllan and J. France. 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.
31. Tian, H., G. Guo, X. Fu, Y. Yao, L. Yuan and A. Xiang. 2018. Fabrication, properties and applications of soy-protein-based materials: A review. *International journal of biological macromolecules*, 120: 475-490.
32. Yin, H., F. Jia and J. Huang. 2019. The variation of two extracellular enzymes and soybean meal bitterness during solid-state fermentation of *Bacillus subtilis*. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2): 39-43.
33. Zhang, Y., B. Dai, Y. Deng and Y. Zhao. 2016. In vitro anti-inflammatory and antioxidant activities and protein quality of high hydrostatic pressure treated squids (*Todarodes pacificus*). *Food chemistry*, 203: 258-266.
34. Zhao, Y., D. Sun-Waterhouse, M. Zhao, Q. Zhao, C. Qiu and G. Su. 2018. Effects of solid-state fermentation and proteolytic hydrolysis on defatted soybean meal. *LWT*, 97: 496-502.

Production and Evaluation of Bioactive Peptides Resulting from Hydrolysis of Chicken Meat Waste and Whey Powder Through Autoclave and Bio-Fermentation Process

Vahid Yakani¹, Hamed Khalilvandi Behroziar², Rasoul Pirmohammadi³, Maryam Donyadoust Chelan⁴ and Bahram Mohtashami⁵

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Sciences, Urmia University

2- Assistant Professor in Animal Nutrition, Department of Animal Sciences, Urmia University,
(Corresponding Author: h.khalilvandi@urmia.ac.ir)

3 and 5- Professor and PhD Student in Animal Nutrition, Department of Animal Sciences, Urmia University
4- Research and Development Units of Danesh Bonyan Kimia Danesh Alvand Company

Received: 7 Februrary, 2021 Accepted: 12 Jun, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: Chicken meat waste and whey powder as by-products are often rich in high quality proteins and can be hydrolyzed by protease enzymes produced by microorganisms. The aim of this study was to produce bioactive peptides from chicken meat waste and whey powder by bio-fermentation by *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, and hydrolysis by autoclave. Also, isolated and hydrolyzed protein sources were evaluated under *in vitro* condition.

Material and Methods: Chicken meat wastes were first degreased and then their protein was isolated through alkaline extraction and acid precipitation. The microorganisms were cultured in a specific culture medium and then added to the protein isolated in the previous step, and the fermentation hydrolysis process was performed. An autoclave was also used for hydrolysis. Isolated and hydrolyzed protein sources were evaluated *in vitro* to determine the amounts of crude protein, organic matter, ash, dry matter, ether extract, and the amount of gas produced *in vitro*. Finally, the data obtained from the laboratory evaluation were statistically analyzed using a completely randomized statistical model using SAS 9.4 software

Results: The results of production and evaluation of isolated and hydrolyzed protein sources showed that during hydrolysis, minor changes were made in the chemical composition, but the production of low molecular weight peptides increased. Also, it was found that the production of bioactive peptides from different sources by different methods has different efficiencies. Among the products of chicken meat waste and whey powder, the highest amount of low molecular weight peptides was produced by *Bacillus subtilis* (1.227 and 0.786 µg / ml, respectively). Autoclave treatment also led to the breaking of weak chemical bonds and increased production of small peptides. Also, the results of *in vitro* gas production method showed that hydrolysis of chicken meat waste and whey powder using *Oryzae*, increased the amount of gas produced (139.77 and 189.21, respectively) and all hydrolysis treatments improved the digestibility of dry mater.

Conclusion: The general results of the study showed that hydrolysis of chicken meat waste and whey powder through bio-fermentation and hydrolysis by autoclave increased the production of bioactive peptides and *Bacillus subtilis* produced the highest amount of peptides. Also, *Aspergillus oryzae* 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 chicken meat waste and whey protein.

Keywords: Chicken meat waste, Digestibility, Isolated protein, Protease enzymes, Whey powder