دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

تولید و ارزیابی پپتیدهای 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 دنیادوست چلان[۴] و بهرام محتشمی[۵]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه
۲- استادیار تغذیه دام، گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه، (نویسنده مسوول: h.khalilvandi@urmia.ac.ir)
۳ و ۵- استاد و دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه
۴- واحد تحقیق و توسعه شرکت دانش بنیان کیمیا دانش الوند
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱ 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 می توانند توسط آنزیم های پروتئازی تولید شده توسط میکروارگانیسم ها، هیدرولیز شوند. این پژوهش، با هدف تولید پپتیدهای زیست فعال از ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر، از طریق تخمیر زیستی توسط باکتری‌های باسیلوس سابتلیس، باسیلوس لیکنیفورمیس، قارچ آسپرژیلوس اورایزا، 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 چربی‌گیری شده و سپس از طریق فرآیند 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 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 برون تنی، 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 تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تولید و ارزیابی منابع پروتئینی ایزوله و هیدرولیز شده نشان داد که در طی هیدرولیز، تغییرات جزیی در ترکیب شیمیایی ایجاد شد اما میزان تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین، افزایش ($p<۰/۰۱$). هم‌چنین، مشخص شد که تولید پپتیدهای زیست فعال از منابع مختلف با روش‌های مختلف دارای کارایی متفاوتی است. به‌طوری‌که در بین محصولات ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر، بیشترین میزان پپتیدهای با وزن مولکولی پایین، توسط باکتری باسیلوس سابتلیس (به‌ترتیب ۱/۲۲۷ و ۰/۷۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تولید شد. اتوکلاو نیز منجر به شکستن پیوندهای شیمیایی ضعیف و افزایش تولید پپتیدهای 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 (به‌ترتیب ۱۳۹/۷۷و 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 پپتیدهای زیست فعال را افزایش داد و باکتری باسیلوس سابتلیس 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 نشان‌دهنده تأثیر مثبت تولید پروتئین هیدرولیز شده با این روش در افزایش فعالیت زیستی پروتئین ضایعات گوشت مرغ و پودر آب پنیر است.

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

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 قابل‌توجهی مواد زاید شامل اعماء و احشاء، چربی یا پیه، پوست، پا، محتویات شکم و روده، استخوان، پر و خون تولید می‌کند. این ضایعات قابلیت تبدیل‌شدن 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 به‌عنوان 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. درگذشته، آب‌پنیر یک آلاینده‌ی محیط زیستی قوی در نظر گرفته می‌شد زیرا حاوی مقدار زیادی ماده آلی است (۳). اما اکنون دیگر به‌عنوان ماده زاید در نظر گرفته نمی‌شود، زیرا مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که پروتئین‌های آب‌پنیر به دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا و طیف گسترده‌ی فعالیت زیستی پپتیدهایی که آزاد می‌کند، منبع خوبی برای پپتیدهای زیست فعال می‌باشند (۲). فرآورده‌های فرعی حیوانی اغلب غنی از پروتئین‌های باکیفیت بالا هستند که می‌توانند به‌منظور تولید پپتیدهای زیست فعال، توسط پروتئازها هیدرولیز شوند. یک ترکیب پروتئینی هیدرولیز شده مخلوطی از پپتیدها و آمینواسیدهایی 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 تشکیل شده‌اند و جرم مولکولی آن‌ها کمتر از ۱۰کیلو دالتون است (۱۵). در تغذیه حیوانات، این پپتیدها دارای فعالیت‌های ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدفشارخون، و خاصیت ایمنی هستند (۳). به‌عنوان‌مثال، به فعال‌سازی پمپ

سدیم–پتاسیم ATP آز در روده باریک و سایر بافت‌ها کمک می‌کنند. همچنین، پپتیدهای زیست فعال می‌توانند در پیشگیری از ایجاد وضعیت اکسیداتیو، تعدیل واکنش‌های التهابی و تضمین هم‌زمان دستیابی به بیشترین راندمان رشد و تولید شیر، نقشی حیاتی داشته باشند (۳). امروزه، میکروارگانیسم‌هایی که برای هیدرولیز آنزیمی یا تخمیری برای جیره‌های دام و طیور استفاده می‌شوند، عمدتاً شامل چهار گونه باکتریایی (*Bacillus licheniformis* *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium*, *L.plantarum*) و سه گونه قارچی (*Aspergillus oryzea*, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*) هستند (۲۰). درواقع، آنزیم‌های پروتئازی حاصل از این میکروارگانیسم‌ها در هیدرولیز آنزیمی مورد استفاده قرار می‌گیرند و در هیدرولیز تخمیری نیز، این میکروارگانیسم‌ها به‌طور مستقیم به سوبسترای مربوطه افزوده می‌شوند. *Bacillus licheniformis* به‌طور عمده، پروتئازهای قلیایی و خنثی تولید می‌کنند و در بین قارچ‌ها نیز قارچ رشته‌ای آسپرژیلوس اورایزا بیشترین فعالیت پروتئولتیکی را دارد و پروتئازهای متنوع‌تری تولید می‌کند که در محدوده‌ی pH وسیع (۴-۱۱) فعال هستند (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 به‌عنوان یک پیش تیمار برای هیدرولیز آنزیمی و تخمیری استفاده شود (۵). بلایو 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 پپتیدهای با وزن مولکولی پایین می‌شود. هیدرولیز پروتئین موجود در محصولات جانبی طیور، منجر به تولید هیدرولیزات‌هایی می‌شود که به‌آسانی قابل‌جذب هستند و در داخل بدن حیوانات نقش‌های متنوعی ایفا می‌کنند. این امر در تغذیه‌ی حیوانات شیرخوار بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد. علاوه بر این، پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاصل از هیدرولیز محصولات جانبی حیوانات می‌توانند به‌منظور تقویت محتوای آنتی‌اکسیدانی جیره غذایی استفاده شوند (۱۶). به‌عنوان‌مثال، گزارش شده است که آمینواسیدهای فنیل آلانین، تریپتوفان، هیستیدین، گلیسین، تیروزین، متیونین، لوسین و والین از خود فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهند (۲۹). هیدرولیزات‌های پروتئینی حیوانی همچنین ممکن است حاوی پپتیدهای شبه اپوئیدی باشند که می‌توانند به‌عنوان عوامل ضد تنش رفتاری یا عوامل کنترل اشتها و سیری استفاده گردند (۱۶). افزودن این پپتیدها در جیره گوساله‌ها، طیور و ماهی سبب بهبود در وضعیت تغذیه‌ای، عملکرد روده و توانایی مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی‌شده است (۱۲). با توجه به تمام این خصوصیات، عدم استفاده یا استفاده‌ی کم از فرآورده‌های جانبی نه‌تنها منجر به از دست رفتن مزایا و درآمدهای احتمالی حاصل از آن‌ها می‌شود، بلکه منجر به افزایش هزینه دفع این محصولات نیز می‌شود. با توجه به مطالب بیان‌شده، این پژوهش با هدف تولید پپتیدهای زیست فعال از ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر از طریق هیدرولیز تخمیری توسط باکتری‌های باسیلوس سابتلیس 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 موردنیاز

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 دانشگاهی 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 شست‌وشو، توسط دستگاه چرخ‌گوشت چرخ گردیده و ترکیب شیمیایی آن بر اساس روش استاندارد AOAC (۱) مورد ارزیابی قرار گرفت که بدین‌صورت بود؛ ماده خشک ۵۲ درصد، ماده آلی ۹۴ درصد، عصاره اتری ۵۸ درصد، و پروتئین ۳۰ درصد. سپس به‌منظور انجام آزمایش‌های بعدی در یخچال فریزردار (شرکت گروک، فریزر تحقیقاتی، ایران) و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پودر آب‌پنیر مورداستفاده برای این مطالعه از شرکت به تام پودر واقع در کرج خریداری شد و ترکیب شیمیایی آن مورد ارزیابی قرار گرفت که بدین‌صورت بود؛ ماده خشک ۹۵ درصد، ماده آلی ۹۳ درصد، چربی ۸ درصد، و پروتئین ۱۰ درصد. به‌منظور 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 هم‌چنین قارچ *Aspergillus oryzae 5163(ATCC 20423)* بودند، 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 خوراکی، 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 خوراکی تنظیم گردید که بدین‌صورت بودند؛ تیمار یک به عنوان تیمار کنترل منفی به منظور ارزیابی اثر ایزوله کردن و هیدورلیز منابع ایزوله شده در مقایسه با گروه کنترل: حاوی منابع خوراکی، تیمار دو (شاهد): پروتئین ایزوله منابع خوراکی، تیمار هیدرولیزی یک: هیدرولیز پروتئین ایزوله توسط باکتری باسیلوس سابتلیس، تیمار هیدرولیزی دو: هیدرولیز پروتئین ایزوله توسط باکتری باسیلوس لیکنیفورمیس، تیمار هیدرولیزی سه: هیدرولیز پروتئین ایزوله توسط قارچ آسپرژیلوس اورایزا، و تیمار

هیدرولیزی چهار: هیدرولیز پروتئین ایزوله توسط دستگاه اتوکلاو.

تهیه پروتئین ایزوله شده

در ابتدا، ضایعات گوشت مرغ چربی‌گیری شدند. بدین منظور از روش فولچ و همکاران (۱۰) استفاده شد. در این روش ۵ گرم از نمونه چرخ شده، با ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم و متانول (۲ به ۱) توسط هموژنایزر اولتراسونیک (svoo4ie5-, 1, industrial systems کره) مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ توسط سانتریفیوژ یخچال دار (CL5، چین) سانتریفیوژ و پس‌از 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 به‌عنوان 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 به‌خوبی با استفاده از هموژنایزر اولتراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط و با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول شفاف رویی جدا و با استفاده از اسیدکلریدریک یک نرمال به pH ۵/۵ (pH ایزو الکتریک پروتئین ضایعات گوشت مرغ) رسانده شد (۷). 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 شد تا رسوب پروتئینی جدا گردد. رسوب حاصل در ظروف دردار در دمای ۸۰- درجه سلسیوس در یخچال‌فریزر (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 licheniformis* و *Bacillus subtilis*

به‌منظور فعال‌سازی، ابتدا باکتری‌های خریداری‌شده، در محیط کشت NA (حاوی ۰/۵ گرم پپتون، ۰/۳ گرم عصاره مخمر، 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 (kavoosh 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 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 شد (۳۲). 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. مقدار مشخصی 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 روی انکوباتور شیکردار (پویش طب آداک، ایران) با سرعت ۱۵۰rpm قرار داده شدند (۹). پس از گذشت این مدت، باکتری‌ها به‌صورت کامل رشد کرده بودند.

کشت قارچ *Aspergillus oryzae*

به‌منظور فعال‌سازی، ابتدا قارچ خریداری‌شده، در محیط کشت PDA[1] (حاوی ۲ گرم دکستروز، ۰/۴ گرم نشاسته سیب‌زمینی، 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 سیب‌زمینی در ۱ لیتر آب مقطر جوشانده شده، آب سیب‌زمینی 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 قبل کشت شده در محیط کشت PDA به درون هر ارلن منتقل شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر دارای سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند (۳۴). پس از گذشت این مدت، قارچ به‌صورت کامل رشد کرده بود.

تهیه پروتئین هیدرولیز شده

بدین منظور، پروتئین ایزوله ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر پس از یخزدایی، به مقدار ۴۰ گرم از هرکدام 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 (۲۶). در ادامه‌ی فرآیند در زیر هود، جهت انجام هیدرولیز تخمیری توسط باکتری‌ها و قارچ، بر اساس روش رشاد و همکاران (۲۷) با اندکی اصلاحات، به درون هر شیشه حاوی منابع پروتئینی ایزوله، به‌صورت 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 به‌منظور 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.

1-Potato Dextrose Agar

به‌منظور انجام فرآیند هیدرولیز توسط دستگاه اتوکلاو نیز مشابه آنچه قبلاً اشاره شد، چهار تکرار از پروتئین ایزوله در نظر گرفته شد و مشابه روش بلایو 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 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 خارج شده و به‌منظور خنک شدن در دمای معمولی قرار گرفتند. درنهایت نمونه‌ها خشک گردیده، توزین شده و جهت انجام ارزیابی‌های آزمایشگاهی، در دمای معمولی نگهداری شدند.

ارزیابی آزمایشگاهی

منابع پروتئین ایزوله 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 (۱) مورد ارزیابی قرار گرفتند. هم‌چنین به‌منظور اطمینان از موفقیت‌آمیز بودن فرآیند هیدرولیز و بررسی شکسته شدن زنجیره‌های پلی پپتیدی، آنالیز پپتیدها بر اساس روش آنالیز SDS-PAGE (سدیم دودسیل سولفات–پلی اکریل آمید ژل الکتروفورز) در شرکت فن گستر اسپوتا صورت پذیرفت.

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

به‌منظور تعیین تأثیر هیدرولیز بر میزان گاز تولیدی در آزمایشگاه از روش تئودورو و همکاران (۳۰) استفاده شد. بدین منظور، مایع شکمبه از گاوهای 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 سیلاژ 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 به‌دست‌آمده، 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 ماکرومینرال، محلول میکرومینرال، محلول احیاکننده، محلول بافر و محلول رسازورین) مطابق روش منکه و همکاران (۲۲) و روش تصحیح‌شده (۲۱) به نسبت یک قسمت مایع شکمبه (۵۰۰ میلی‌لیتر) و دو قسمت محیط کشت (۴۷۴ 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 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 ساعات ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت پس از انکوباسیون، با استفاده از دستگاه فشارسنج (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 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 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، ۶، ۸، ۱۲و 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:

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

F: درصد گوارش‌پذیری ماده خشک
A: وزن نمونه قرار داده شده درون شیشه
B: وزن نمونه باقی‌مانده پس از ۲۴ساعت انکوباسیون

روش‌های آماری مورداستفاده

در این پژوهش، داده‌های حاصل از ارزیابی آزمایشگاهی در ارتباط با ترکیب شیمیایی، گوارش‌پذیری ماده خشک، آنالیز وزن پپتید به روش SDS-PAGE و فراسنجه‌های تولید گاز، با استفاده از مدل آماری طرح کاملاً تصادفی با اثر ثابت تیمار مورد تجزیه‌وتحلیل 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 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 ۹.۴ انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین حداقل مربعات و خطا ی 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؛ Tit ij: اثر متقابل زمان انکوباسیون و تیمار فراوری؛ eij: اثر اشتباه آزمایشی همچنین داده‌های مربوط به کینتیک تولید گاز و فراسنجه‌های آزمون تولید گاز، قبل از آنالیز توسط نرم‌افزار SAS به‌وسیله‌ی نرم‌افزار Fitcurve برازش شدند. تمامی آنالیزهای آزمایشگاهی انجام شده 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 ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر فراوری‌شده توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف، به‌ترتیب در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. به‌طورکلی، 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 منابع 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 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، وگرنه هدر رفت ماده خشک بسیار کم بوده است (۳۱). فزایش 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 مواد آلی پروتئین ایزوله نسبت به ماده اولیه، به‌صورت 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 به‌صورت یک لایه مجزا، بعد از سانتریفیوژ روی آب دیده شد که همراه با آب دفع گردید. باید اشاره کرد که پروتئین ایزوله به‌عنوان 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 کنجاله 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).

جدول ۱- ترکیب شیمیایی ضایعات گوشت مرغ فراوری‌شده توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف
Table 1. Chemical composition of processed chicken meat waste with different hydrolysis methods

ترکیب	تیمارها						SEM	*p*-value
	ضایعات	ایزوله ضایعات*	سابتلیس	لیکنیفورمیس	اورایزا	اتوکلاو		
ماده خشک	۰/۵۲^{a}	۰/۱۵^{c}	۰/۱۷^{b}	۰/۱۷^{b}	۰/۱۷^{b}	۰/۱۳^{d}	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱
ماده آلی	۰/۹۴^{b}	۰/۹۷^{a}	۰/۹۷^{a}	۰/۹۷^{a}	۰/۹۷^{a}	۰/۹۸^{a}	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱
عصاره اتری	۰/۵۸^{a}	۰/۱۵^{b}	۰/۱۴^{b}	۰/۱۴^{b}	۰/۱۴^{b}	۰/۱۳^{c}	۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۱
پروتئین	۰/۳۰^{d}	۰/۸۰^{ab}	۰/۶۲^{c}	۰/۷۸^{b}	۰/۷۹^{b}	۰/۸۱^{a}	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۱

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

اگر تیمارهای هیدرولیزی باکتری‌های باسیلوس سابتلیس، 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 تیمارهای هیدرولیزی نسبت به تیمار پروتئین ایزوله، می‌تواند در نتیجه‌ی رشد و متابولیسم میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته باشد. کاهش جزیی 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 (۱۱). لذا با مصرف ماده آلی، محتوای کربوهیدرات، عصاره اتری و پروتئین نیز کاهش می‌یابد. علاوه بر این، کاهش غیرمنتظره در محتوای پروتئین ضایعات گوشت مرغ هیدرولیز شده توسط باکتری باسیلوس سابتلیس، مشاهده می‌شود (۰/۶۲). این کاهش می‌تواند به علت خطای 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 پپتیدی شکسته می‌شوند بدین‌صورت که زنجیره‌های با وزن مولکولی زیاد (بزرگ‌تر از ۱۰۰۰۰ دالتون) به پپتیدهای با وزن مولکولی کم (کوچک‌تر از ۱۰۰۰۰ دالتون) تبدیل می‌شوند. به‌طورکلی، تغییرات در

ترکیب شیمیایی می‌تواند در نتیجه‌ی رشد و متابولیسم میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته باشد. چانچارونپونگ و همکاران (۸) گزارش دادند که رشد قارچ اورایزا در مرحله‌ی هیف (رشته‌ها یا ریسه‌های نخی شکل موجود در ساختار قارچ) 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 جزیی در ماده آلی مشاهده کردند.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی پودر آب‌پنیر فراوری‌شده توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف
Table 2. Chemical composition of processed whey powder with different hydrolysis methods

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

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

ارزیابی میزان تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین بر اساس روش SDS-PAGE

تأثیر انواع فرآیندهای هیدرولیز بر میزان تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین (کوچک‌تر از ۱۰ کیلو دالتون) از پروتئین ایزوله ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) 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 پپتیدهای با وزن مولکولی پایین را افزایش داده‌اند. این امر نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز 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 به‌طوری‌که در بین محصولات ضایعات گوشت مرغ و پودر آب‌پنیر، بیشترین میزان پپتیدهای با وزن مولکولی پایین، توسط باکتری باسیلوس سابتلیس (به ترتیب ۱/۲۲۷ و ۰/۷۸۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تولید شد. تفاوت در میزان تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین در بین منابع خوراکی 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 *Bacillus licheniformis* 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 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 غالبی که این باکتری تولید می‌کند عمدتاً پروتئاز و کربوکسی پپتیداز هستند. ژانگ و همکاران (۳۳) گزارش دادند که در طی هیدرولیز زنجیره‌های پلی پپتیدی با وزن مولکولی زیاد (بزرگ‌تر از ۱۰۰۰۰ دالتون) به پپتیدهای با وزن مولکولی کم(کوچک‌تر از ۱۰۰۰۰ دالتون) شکسته می‌شوند. این امر توسط آنزیم‌های پروتئازی صورت می‌گیرد. سانگرونیس و همکاران (۲۸) 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. یافت شده است که محتوای اسیدآمینه آزاد سویای تخمیر شده توسط سویه‌های پروتئولیتیک باسیلوس سابتلیس، ۱۰ الی ۲۰ برابر افزایش می‌یابد (۲۹). 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 (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 آزاد و پپتیدهای با وزن مولکولی کم می‌شود.

جدول ۳- تأثیر انواع فرآیندهای هیدرولیز بر میزان تولید پپتیدهای با وزن مولکولی پایین (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)
Table 3. Effect of various hydrolysis processes on the production of low molecular weight peptides (µg/ml)

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

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

نتایج حاصل از ارزیابی منابع پروتئینی ایزوله و هیدرولیز شده بر اساس روش تولید گاز آزمایشگاهی (In vitro)

کینتیک و فراسنجه‌های تولید گاز محصولات ضایعات گوشت مرغ (بر اساس ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) در جدول ۴ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تولید گاز تجمعی در تمامی تیمارها با افزایش ساعات 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 گاز تولیدی را داشته است. بعد از تیمار اورایزا بیشترین میزان تولید گاز در تیمارهای باسیلوس لیکنیفورمیس و ایزوله ضایعات 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 درنتیجه، مصرف بخشی از کربوهیدرات‌های سهل‌الهضم توسط باکتری باسیلوس سابتلیس، صورت گرفته باشد. تفاوت در بین گونه‌های باکتریایی و قارچی از نظر تولید گاز، می‌تواند به علت تفاوت در نوع آنزیم‌های تولیدی باشد. 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، به‌طوری‌که بیشترین میزان به تیمار ایزوله ضایعات گوشت مرغ تعلق گرفت. هم‌چنین بین تیمارهای مختلف ازنظر نرخ تولید گاز (c) تفاوت معنی‌دار یافت شد، به‌طوری‌که 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) تعلق 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). به‌طورکلی، می‌توان نتیجه 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.

جدول ۴- کینتیک و فراسنجه‌های تولید گاز ضایعات گوشت مرغ فرآوری‌شده توسط روش‌های هیدرولیزی مختلف (بر اساس ۵۰۰ میلی‌گرم 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)

ساعت	ضایعات گوشت مرغ	ایزوله گوشت مرغ*	سابتلیس	لیکنیفورمیس	اورایزا	اتوکلاو	SEM	*p*-value
	تیمارها							
۲	۸/۵۵	۷/۶۳	۹/۱۷	۸/۹۰	۱۱/۵۳	۷/۹۳	۲/۵۷۱	۰/۵۴۱۱
۴	۱۷/۹۴^{aD}	۱۴/۳۷^{D}	۱۷/۵۹^{aD}	۱۷/۲۱^{aD}	۲۲/۵۷^{a}	۱۶/۱۶^{aD}	۲/۵۷۱	۰/۰۳۱۷
۶	۲۶/۷۱^{aD}	۲۰/۱۴^{D}	۲۴/۶۸^{D}	۲۵/۳۶^{D}	۳۳/۵۴^{a}	۲۳/۳۶^{D}	۲/۵۷۱	۰/۰۰۱۵
۸	۳۵/۵۷^{D}	۲۴/۹۵^{c}	۳۰/۸۳^{DC}	۳۳/۱۰^{DC}	۴۴/۴۵^{a}	۲۹/۹۱^{DC}	۲/۵۷۱	۰/۰۱۷۴
۱۲	۴۳/۱۵^{D}	۳۰/۶۱^{c}	۳۷/۹۰^{DC}	۴۳/۱۵^{D}	۵۶/۶۸^{a}	۳۵/۷۸^{c}	۲/۵۷۱	۰/۰۰۹۷
۲۴	۵۵/۸۴^{D}	۴۰/۰۱^{c}	۵۷/۱۴^{D}	۵۹/۳۶^{D}	۷۱/۸۲^{a}	۴۴/۱۰^{c}	۲/۵۷۱	۰/۰۲۱۴
۴۸	۶۶/۴۳^{D}	۵۶/۶۰^{c}	۷۲/۳۱^{D}	۷۰/۶۳^{D}	۸۶/۸۴^{a}	۵۳/۱۴^{c}	۲/۵۷۱	۰/۰۲۸۷
۷۲	۷۶/۷۷^{D}	۷۶/۳۷^{D}	۸۱/۴۶^{D}	۸۰/۷۰^{D}	۱۰۱/۰۶^{a}	۶۶/۴۸^{c}	۲/۵۷۱	۰/۰۴۵۸
۹۶	۸۷/۱۱^{cd}	۹۶/۹۱^{D}	۸۸/۶۰^{cd}	۹۱/۲۳^{DC}	۱۱۳/۳۸^{a}	۸۱/۸۴^{d}	۲/۵۷۱	۰/۰۰۷۷
۱۲۰	۱۰۵/۲۰^{DC}	۱۱۸/۰۶^{a}	۱۰۰/۸۴^{c}	۱۰۹/۶۴^{D}	۱۲۵/۱۵^{a}	۱۰۲/۴۱^{DC}	۲/۵۷۱	۰/۰۱۰۵
۱۴۴	۱۱۹/۳۳^{D}	۱۳۶/۶۰^{a}	۱۱۰/۰۲^{c}	۱۲۶/۶۷^{D}	۱۳۹/۷۷^{a}	۱۲۱/۰۲^{D}	۲/۵۷۱	۰/۰۴۰۰
	فراسنجه‌های تولید گاز							
b(ml)	۱۰۱/۶۸۳^{C}	۱۸۳/۴۶۱^{a}	۹۸/۳۰۰^{c}	۱۰۹/۲۹۱^{c}	۱۲۰/۸۷۱^{b}	۱۲۴/۲۰۰^{b}	۱۲/۸۰۲	۰/۰۰۰۱
c(%/h)	۰/۰۳۷^{D}	۰/۰۰۸^{c}	۰/۰۳۵^{a}	۰/۰۲۹^{D}	۰/۰۴۰^{a}	۰/۰۱۴^{c}	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۱
DMD(%)	۲۶/۰۰۰^{c}	۱۸/۰۰۰^{d}	۶۸/۰۰۰^{a}	۵۲/۰۰۰^{D}	۳۰/۰۰۰^{c}	۱۴/۰۰۰^{d}	۸/۹۴۹	۰/۰۰۰۱

حروف بالانویس متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح آماری ۰/۰۵ می‌باشد (p-value<۰/۰۵).

*: تیمار شاهد p-value : احتمال معنی‌داری

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

جدول ۵- کینتیک 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)

ساعت	تیمارها						SEM	*p*-value
	آب‌پنیر	ایزوله آب‌پنیر*	سابتلیس	لیکنیفورمیس	اورایزا	اتوکلاو		
۲	۶/۱۴	۶/۳۶	۸/۷۴	۷/۰۳	۱۰/۸۵	۹/۹۶	۳/۰۶۶	۰/۱۷۴۹
۴	۱۵/۳۴	۱۴/۷۵	۱۹/۲۴	۱۵/۱۸	۲۲/۶۳	۱۹/۴۳	۳/۰۶۶	۰/۴۲۰۱
۶	۳۱/۷۵^{ab}	۲۶/۵۸^{ab}	۲۸/۸۰^{ab}	۲۳/۸۲^{b}	۳۳/۱۶^{a}	۲۹/۴۸^{ab}	۳/۰۶۶	۰/۰۱۴۴
۸	۶۴/۲۶^{a}	۴۱/۲۵^{bc}	۳۷/۶۸^{bc}	۳۱/۵۱^{c}	۴۵/۵۰^{b}	۳۸/۷۹^{bc}	۳/۰۶۶	۰/۰۰۲۰
۱۲	۹۹/۹۱^{a}	۵۴/۹۸^{bc}	۴۹/۴۸^{bc}	۴۰/۸۷^{d}	۵۷/۲۳^{b}	۴۶/۴۹^{cd}	۳/۰۶۶	۰/۰۳۹۹
۲۴	۱۲۸/۹۸^{a}	۸۱/۵۶^{b}	۶۹/۳۸^{c}	۵۸/۰۴^{d}	۷۲/۷۹^{bc}	۵۷/۰۵^{d}	۳/۰۶۶	۰/۰۴۵۱
۴۸	۱۴۶/۷۲^{a}	۱۰۴/۱۴^{b}	۸۴/۰۰^{c}	۷۸/۱۵^{c}	۹۹/۴۶^{b}	۶۲/۹۶^{d}	۳/۰۶۶	۰/۰۰۴۹
۷۲	۱۵۹/۵۲^{a}	۱۱۷/۴۹^{c}	۹۵/۴۳^{d}	۹۴/۰۷^{d}	۱۲۶/۱۸^{b}	۶۹/۱۲^{e}	۳/۰۶۶	۰/۰۰۵۷
۹۶	۱۶۹/۰۲^{a}	۱۲۹/۱۶^{c}	۱۰۵/۸۸^{d}	۱۰۶/۹۳^{d}	۱۵۰/۳۶^{b}	۷۷/۲۵^{e}	۳/۰۶۶	۰/۰۰۰۱
۱۲۰	۱۸۲/۹۷^{a}	۱۴۲/۴۰^{c}	۱۱۷/۹۰^{d}	۱۲۲/۸۸^{d}	۱۷۲/۹۱^{b}	۹۱/۳۵^{e}	۳/۰۶۶	۰/۰۴۲۱
۱۴۴	۱۹۱/۲۸^{a}	۱۵۰/۰۶^{c}	۱۲۷/۳۲^{d}	۱۳۴/۵۲^{d}	۱۸۹/۲۱^{a}	۱۰۱/۶۱^{e}	۳/۰۶۶	۰/۰۱۲۱
فراسنجه‌های تولید گاز								
b (ml)	۱۹۴/۴۹۱^{a}	۱۳۹/۶۱۸^{b}	۱۱۱/۶۴۱^{b}	۱۳۸/۲۹۰^{b}	۲۱۷/۹۹۰^{a}	۷۸/۷۲۳^{c}	۶/۷۹۱	۰/۰۰۰۱
c (%/h)	۰/۰۶۵^{a}	۰/۰۳۱^{d}	۰/۰۲۶^{dc}	۰/۰۱۵^{dc}	۰/۰۱۰^{c}	۰/۰۲۰^{dc}	۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۱
DMD(%)	۷۴/۰۰۰^{a}	۲۶/۰۰۰^{a}	۵۶/۰۰۰^{b}	۳۰/۰۰۰^{a}	۶۲/۰۰۰^{b}	۴۲/۰۰۰^{c}	۱/۰۹۸	۰/۰۰۰۱

حروف بالانویس متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح آماری ۰/۰۵ می‌باشد (p-value<۰/۰۵).

*: تیمار شاهد p-value : احتمال معنی‌داری

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

کینتیک و فراسنجه‌های تولید گاز محصولات پودر آب‌پنیر (بر اساس ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) در جدول ۵ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، 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 کازئین بیشتر در پودر آب‌پنیر، مربوط دانست. مقدار گاز تولیدی به میزان کربوهیدرات‌ها بستگی دارد (۲۳). 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 قبلاً 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، به‌طوری‌که بیشترین میزان به تیمار اورایزا (۲۱۷/۹۹) تعلق گرفت. همان‌طور که قبلاً 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 میکروبی باشد (۳۴). هم‌چنین بین تیمارهای مختلف ازنظر نرخ تولید گاز (c) تفاوت معنی‌دار مشاهده شد، به‌طوری‌که بیشترین مقدار به تیمار پودر آب‌پنیر تعلق گرفت. از نظر درصد گوارش‌پذیری ماده خشک نیز بیشترین مقدار به تیمار پودر آب‌پنیر (۷۴ درصد) و اورایزا (۶۲ درصد) تعلق گرفت و در تیمارهای باسیلوس سابتلیس، باسیلوس لیکنیفورمیس و دستگاه اتوکلاو بهبود معنی‌دار نسبت به پروتئین ایزوله (شاهد) مشاهده شد. می‌توان نتیجه گرفت که به‌طورکلی تیمار اورایزا نسبت به تیمار شاهد منجر به افزایش میزان گاز تولیدی و بخش قابل تخمیر گردید و تمام تیمارهای هیدرولیزی 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 استفاده‌ی کم از فرآورده‌های جانبی حیوانی نه‌تنها 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 ضایعات، عمدتاً به‌صورت محصولات با ارزش افزوده، شروع به توسعه فناوری‌های مختلفی کند و در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

منابع

1. AOAC. 2000. Official methods of analysis.17th ed.Gaithersburg, M.D., USA, Association of Official Analytical Chemists International.
2. 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.
3. Ballatore, M.B., M. del Rosario Bettiol, 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.
4. 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 tryptic hydrolysis at atmospheric pressure. Food Research International, 79: 40-53.
5. Boukil, A., S. Suwal, J. Chamberland, Y. Pouliot and A. Doyen. 2018. Ultrafiltration performance and recovery of bioactive peptides after fractionation of tryptic hydrolysate generated from pressure-treated β-lactoglobulin. Journal of Membrane Science, 556: 42-53.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Hajieghrari, B. and N. Farrokhi. 2020. Investigation on the conserved microRNA genes in higher pPlants. Plant Molecular Biology Reporter, 1-14.
12. 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.
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.
14. 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.
15. 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.
16. Lee, S.Y. and S.J. Hur. 2017. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. Food Chemistry, 228: 506-517.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Nasehi, M., N.M. Torbatinejad, S. Zerehdaran and A.R. Safaie. 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. Pirota, R., M. Tonelotto, P. Delabona, R. Fonseca, D. Paixão, F. Baleeiro, 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 andantioxidant 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 Yakani[1], Hamed Khalilvandi Behroziar[2], Rasoul Pirmohammadi[3], Maryam Donyadoust Chelan[4] and Bahram Mohtashami[5]

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 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 chicken meat waste and whey protein.

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