

دستور العمل فنی

# تهیه افزودنی پروتئینی جیره غذایی طیور با استفاده از بیوکاتالیست-های نو ترکیب



نویسندگان

دکتر شهره آریائی نژاد، دکتر مهرشاد زین العابدینی

سید الشہید محمد باقر



نوع نشریه: دستورالعمل فنی

نام نشریه: دستورالعمل فنی تهیه افزودنی پروتئینی جیره غذای طیور با استفاده از بیوکاتالیست-های نو ترکیب

نویسندگان: دکتر شهره آریائی نژاد، دکتر مهرشاد زین العابدینی

ویراستار علمی: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

ویراستاران ادبی:

تهیه شده در: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

شمارگان:

نوبت انتشار: اول

سال انتشار: ۱۴۰۳

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است



شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی      به تاریخ      است



# تھیہ افزودنی پروتئینی جیرہ غذایی طیور با استفاده از بیوکاتالیست- نو ترکیب

نویسندگان

دکتر شہرہ آریائی نژاد، دکتر مہر شاد زین العابدینی

## فهرست مطالب

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ۱. هدف.....                                                                                                     | ۴  |
| ۲. مقدمه.....                                                                                                   | ۵  |
| ۲-۱ آنزیم پروتئاز.....                                                                                          | ۵  |
| ۲-۲ پپتید زیست فعال.....                                                                                        | ۸  |
| ۳-۲ سویا.....                                                                                                   | ۹  |
| ۴-۲ کنجاله سویا در جیره غذایی طیور.....                                                                         | ۱۰ |
| ۳. بررسی منابع.....                                                                                             | ۱۱ |
| ۴. دستورالعمل تهیه افزودنی پروتئینی جیره غذایی طیور با استفاده از آنزیم پروتئاز<br>نو ترکیب PersiProtease1..... | ۱۳ |
| ۴-۱ چربی زدایی دانه های سویا.....                                                                               | ۱۵ |
| ۴-۲ استخراج پروتئین سویا.....                                                                                   | ۱۶ |
| ۴-۳ استخراج پپتیدهای زیست فعال به روش آنزیمی.....                                                               | ۱۷ |
| ۴-۴ سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی از پپتیدهای تولید شده.....                                                        | ۱۸ |
| ۵. نتیجه گیری.....                                                                                              | ۲۰ |
| ۶. فهرست منابع.....                                                                                             | ۲۰ |

## ۱. هدف

بیوکاتالیست‌های نو ترکیب شامل آنزیم‌های نو ترکیبی هستند که با قرار دادن یک ژن خاص بیان کننده یک آنزیم مشخص در یک ارگانیسم میزبان، مانند باکتری یا مخمر، تولید می‌شود. این ژن حاوی اطلاعات لازم برای تولید آنزیم مورد نظر است و توسط ارگانیسم میزبان بیان می‌شود. امروزه صنعت پرورش طیور، یکی از صنایع پویا، پر هزینه و اشتغال زا در دنیا به شمار رفته و در این بین، هزینه تغذیه طیور حدود ۷۰ درصد از کل هزینه‌ها را شامل می‌شود. از مهم‌ترین اجزای تشکیل دهنده جیره، انرژی و پروتئین هستند. معمولاً مسئولیت تأمین انرژی با غلات و مکمل‌های چربی بوده و وظیفه تأمین پروتئین با کنجاله‌های دانه‌های روغنی و منابع حیوانی می‌باشد. یکی از راه‌های افزایش کارایی اقتصادی در پرورش طیور استفاده از فناوری‌های جدید و ارزان قیمت و همچنین ارزیابی منابع غذایی مختلف است. در بین منابع پروتئینی مورد استفاده در جیره طیور، کنجاله‌های روغنی به ویژه سویا دارای اهمیت به سزایی می‌باشند. کنجاله سویا به عنوان منبع عمده تأمین پروتئین و دانه ذرت و گندم به عنوان منبع عمده تأمین انرژی در فرموله کردن خوراک طیور برای دستیابی به کمترین هزینه مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین استفاده از پپتیدهای زیست فعال در تغذیه طیور طی یک دهه گذشته افزایش یافته است و مطالعات نشان داده است، افزودن پپتیدهای زیست فعال به جیره طیور دارای اثرات مثبت بر عملکرد، رشد و بهبود سلامت روده می‌گردد. در این دستورالعمل مراحل تهیه افزودنی پروتئینی جیره غذایی طیور با استفاده از آنزیم پروتئاز نو ترکیب **PersiProtease 1** و پروتئین‌های سویا به طور کامل ارائه شده است.

## کلمات کلیدی

بیوکاتالیست نو ترکیب پروتئاز- جیره طیور- کنجاله سویا- پپتیدهای زیست فعال

## ۲. مقدمه

### ۲-۱ آنزیم پروتئاز

بیوکاتالیست‌های نو ترکیب یا آنزیم‌های نو ترکیب، آنزیم‌هایی هستند که با قرار دادن ژن خاص بیان کننده یک آنزیم مشخص، در یک ارگانیسم میزبان مانند باکتری یا مخمر، تولید می شود. این ژن حاوی اطلاعات لازم برای تولید آنزیم مورد نظر است و توسط ارگانیسم میزبان بیان می شود. آنزیم های نو ترکیب مزایای متعددی نسبت به آنزیم های طبیعی دارند، از جمله:

- **عملکرد تخصصی:** آنزیم های نو ترکیب می توانند برای انجام یک واکنش خاص مهندسی شوند،

که برای کاربردهایی که فقط یک نوع واکنش مورد نظر است، مفید است.

- **ثبات:** آنزیم های نو ترکیب می توانند پایدارتر از آنزیم های طبیعی باشند، و این عامل در شرایطی که

آنزیم در شرایط سخت مورد استفاده قرار می گیرد اهمیت زیادی دارد.

آنزیم های نو ترکیب کاربردهای گسترده ای در زمینه های مختلف دارند، از جمله:

داروسازی: آنزیم های نو ترکیب برای تولید طیف گسترده ای از داروها، واکسن ها و پروتئین های درمانی استفاده می شوند.

صنعت مواد غذایی و نوشیدنی: آنزیم های نو ترکیب برای بهبود طعم، بافت و ماندگاری مواد غذایی و نوشیدنی استفاده می شوند. همچنین برای تولید سوخت های زیستی و سایر محصولات صنعتی کاربرد دارند.

صنعت نساجی: آنزیم های نو ترکیب برای تجزیه الیاف و بهبود رنگرزی و تکمیل فرایند تولید پارچه ها استفاده می شوند.

پاکسازی محیط زیست: آنزیم های نو ترکیب برای پاکسازی آلاینده های محیطی مانند نشت نفت و مواد شیمیایی خطرناک استفاده می شوند.

استفاده از آنزیم نوترکیب پروتئاز در صنایع متعدد، از جمله صنعت شوینده‌ها که در آن پروتئازهای نوترکیب برای از بین بردن لکه‌های سخت کاربرد دارند، رایج است. در صنایع آرایشی و بهداشتی نیز پروتئازهای نوترکیب به دلیل افزایش نفوذ مواد فعال به پوست سبب جوان سازی پوست شده و استفاده می‌شوند. علاوه بر این، در تولید خوراک دام و طیور، پروتئازها برای افزایش میزان پروتئین جیره غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

خانواده آنزیم‌های هیدرولاز<sup>۱</sup> شامل کربوهیدرات‌ها، پروتئازها و لیپازها هستند که معمولاً به عنوان افزودنی‌های غذایی استفاده می‌شوند. آنزیم‌های پروتئاز بخش عمده ای از آنزیم‌های صنعتی در صنایع غذایی است و همچنین به عنوان یکی از بیوکاتالیست‌های مهم محسوب می‌شوند. پروتئازها (EC ۳.۴) که پروتئینازها یا آنزیم‌های پروتئولیتیک نیز نامیده می‌شوند، آنزیم‌هایی هستند که قادر به هیدرولیز پیوندهای پپتیدی در پروتئین‌ها هستند. پروتئین‌ها در حضور این آنزیم به پلی پپتیدهای کوچک‌تر یا اسیدهای آمینه منفرد تبدیل می‌گردد و هیدرولیز پیوندهای پپتیدی در حضور آب انجام می‌شود. پروتئازها برای متابولیسم سلولی از جمله فرایندهای میتوکندری ضروری هستند. حدود ۶۰٪ از تمام آنزیم‌های تجاری در جهان را پروتئازها تشکیل می‌دهند. پروتئازها در صنایع مختلفی از جمله چرم و مواد شوینده، صنایع غذایی و تولید دارویی و غیره کاربرد دارند. پروتئازها به شش خانواده اصلی طبقه بندی می‌شوند که شامل: سرین پروتئازها (EC ۳.۴.۲۱)، سرین کربوکسی پروتئازها (EC ۴.۳.۱۶)، سیستئین پروتئازها (EC ۳.۴.۲۲)، آسپارتیک پروتئازها (EC ۳.۴.۲۳)، متالوپروتئازهای (EC ۳.۴.۲۴) و متالوکربوکسی پروتئازها (EC ۳.۴.۱۷) هستند.

پروتئازها برای موجودات زنده ضروری هستند و در تنوع وسیعی از گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها وجود دارند. پاپائین، بروملین، کراتینازها و فیکسین برخی از معروف ترین پروتئازهای گیاهی هستند. از سوی دیگر تریپسین پانکراس، کیموتریپسین، پپسین و رنین مهمترین پروتئازها با منشاء حیوانی هستند. پروتئازهای میکروبی هم از نظر کیفیت و هم از نظر کمیت ارجح‌تر هستند [۱].

<sup>1</sup> hydrolase

پروتئازها را به عنوان افزودنی غذایی برای خوراک طیور و خوراک حیوانات به دلیل بهبود قابلیت هضم اسید آمینه‌ها استفاده می‌کنند. مواد غذایی پروتئینی در مقایسه با سایر منابع گران‌تر هستند و معمولاً از کیفیت پایین‌تری برخوردارند. بنابراین، استفاده از پروتئازهای برون زاد<sup>۲</sup> می‌تواند با بهبود قابلیت هضم و در دسترس بودن پروتئین، در یک خوراک معین کمک کند و در نتیجه هزینه تولید خوراک تامین شده را کاهش می‌دهد. افزودن بیوکاتالیست‌هایی مانند پروتئاز به خوراک طیور علاوه بر بهبود قابلیت هضم پروتئین‌ها، می‌تواند عوامل ضد تغذیه‌ای و پروتئین‌های آلرژی زا را در مواد غذایی تخریب کند. پروتئازها تخمیر پروتئین‌ها را در روده بزرگ کاهش می‌دهند و در نتیجه سلامت روده را بهبود می‌بخشند. متخصصان تغذیه با افزودن پروتئاز به جیره‌های کم پروتئین، رشد را حفظ کرده و پایداری تولید طیور را افزایش می‌دهند. همچنین اضافه شدن آنزیم‌های پروتئاز در فرایند تولید خوراک، سبب افزایش انرژی آزاد شده از مواد غذایی می‌گردد و بر روی کیفیت خوراک نیز تأثیر مطلوبی دارد.

بازار جهانی پروتئاز در سال ۲۰۳۳ به ارزش ۴/۶ میلیارد دلار خواهد رسید و از سال ۲۰۲۳ تا ۲۰۳۳ با نرخ رشد مرکب سالانه<sup>۳</sup> (CAGR) ۷/۸ درصد رشد خواهد کرد. این رشد به دلیل عوامل مختلفی مانند موارد زیر است:

- آگاهی روزافزون در مورد مصرف غذاهای سالم: پروتئازها در طیف گسترده‌ای از محصولات غذایی برای بهبود طعم، بافت و ماندگاری استفاده می‌شوند. با افزایش آگاهی سلامتی مصرف‌کنندگان، آنها به دنبال محصولاتی هستند که پردازش شده‌اند و حاوی مواد طبیعی هستند. پروتئازها می‌توانند با ارائه جایگزین‌های طبیعی برای مواد افزودنی مصنوعی، به تولیدکنندگان در پاسخگویی به این تقاضا کمک کنند.

<sup>۲</sup> Exogenous enzyme

<sup>۳</sup> Compound Annual Growth Rate

- تقاضای فزاینده برای استفاده از مواد زیست تخریب پذیر: پروتئازها به عنوان مواد اولیه زیست تخریب پذیر هستند و این امر تقاضا برای پروتئازها را در صنایع مختلف، از جمله مواد غذایی، شوینده ها و داروسازی، افزایش می دهد.

تقسیم بندی پروتئازهای تجاری در جهان بر حسب مطالعات آماری به صورت زیر است:

۱. منبع آنزیم پروتئاز (حیوانی، گیاهی، میکروبی)
۲. کاربرد آنزیم پروتئاز (غذا و نوشیدنی، خوراک دام و طیور، صابون و مواد شوینده، داروسازی، سایر موارد)
۳. تولید آنزیم پروتئاز (با دو روش تخمیر، استخراج)
۴. فرمولاسیون آنزیم پروتئاز (فرمولاسیون مایع، پودر لیوفیلیزه، سایر)
۵. نوع پروتئاز (تریپسین، رنین، پپسین، پاپین، پروتئاز قلیایی)
۶. حالت فیزیکی آنزیم پروتئاز (مایع، پودر)

## ۲-۲ پپتید زیست فعال

هضم جزئی پروتئین ها توسط پروتئازها ممکن است توالی های پپتیدی با خواص زیستی خاصی را تولید کند که به آن ها پپتیدهای زیست فعال<sup>۴</sup> می گویند. پپتیدهای زیست فعال در صنایع غذایی کاربردهای فراوانی دارند. پپتیدهای زیست فعال گروهی از مولکول های زیستی هستند که حاوی توالی اسید آمینه ای با طول حدود ۲ تا ۲۰ واحد هستند که به طور معمول در ساختار پروتئین قرار گرفته اند و پس از جدا شدن از پروتئین ها فعال می شوند. پپتیدهای زیست فعال دارای فعالیت های مختلفی از جمله فعالیت های ضد میکروبی، ضد فشار خون، آنتی اکسیدانی و کاهش دهنده چربی خون هستند. همچنین به عنوان مواد اُپیوئید<sup>۵</sup> یا مسکن، ضد چاقی، ضد دیابت و ضد پیری نیز به کار می روند. پپتیدهای زیست فعال علاوه بر موارد گفته شده دارای خواص دارویی،

<sup>۴</sup> Bioactive peptides

<sup>۵</sup> Opioid

آرایشی و حتی تغذیه ای نیز هستند. ملاندر<sup>۶</sup> اولین کسی بود که اثر پپتیدهای زیست فعال مشتق شده از انواع مواد غذایی را مطالعه کرد. او گزارش کرد که مصرف پپتیدهای فسفریله حاصل شده از پروتئین کازئین منجر به افزایش کلسیفیکاسیون<sup>۷</sup> مستقل از ویتامین D در نوزادان مبتلا به راشیتسم<sup>۸</sup> می‌شود. پپتیدهای زیست فعال، سبب هضم بالای محتویات پروتئین و فراهمی زیستی ماده غذایی می‌شوند. بسیاری از پپتیدهای زیست فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی مواد غذایی مانند شیر، گوشت حیوانات و ماهی، ذرت، گندم، سویا<sup>۹</sup> و تخم مرغ تولید می‌شوند. در میان انواع مختلف پپتیدهای زیست فعال، سویا از نظر اقتصادی مهمترین منبع است که فراوان و نسبتاً ارزان است.

## ۳-۲ سویا

سویا از خانواده بقولات و زیر خانواده Papilionaceae است. سویا یکی از ضروری‌ترین محصولات کشاورزی جهان است. سویا حاوی لیپید (۲۰٪)، پروتئین (۴۰٪)، کربوهیدرات (۳۵٪) و سایر مواد (۵٪) است. این محصول منبع خوبی از پروتئین‌ها برای رژیم غذایی انسان است و به عنوان یک ماده اولیه برای تغذیه دام و طیور نیز محسوب می‌شود. سویا حاوی مواد معدنی ضروری برای سلامت دام و طیور است و علاوه بر اینکه غنی از پروتئین و چربی است، خطر ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها را در صنایع غذایی و خوراک دام و طیور کاهش می‌دهد. جیره‌های غذایی گونه‌های اصلی حیوانات پرورشی (طیور، گاو و آبزیان) حاوی سویا است.

<sup>۶</sup> Mellander

<sup>۷</sup> Calcification

<sup>۸</sup> Rachitic

<sup>۹</sup> Glycine max

## جدول ۱. ترکیبات تشکیل دهنده ۱۰۰ گرم سویا

| ترکیبات دانه سویا      | مقدار          |
|------------------------|----------------|
| چربی اشباع شده         | ۰/۲۶۸ گرم      |
| سلنیوم                 | ۳/۳ ماکروگرم   |
| کلسیم                  | ۲۴۴ میلی گرم   |
| مس                     | ۲ میلی گرم     |
| ویتامین B <sub>3</sub> | ۲/۵۸۷ میلی گرم |
| روی                    | ۵/۰۶ میلی گرم  |
| منیزیم                 | ۳۰۶ میلی گرم   |
| آهن                    | ۱۳/۷ میلی گرم  |

سویا و واردات کنجاله سویا دو منبع مهم در خوراک دام و طیور هستند. دانه های مغذی سویا برای غنی سازی خوراک دام و طیور در کشور تقاضای زیادی دارد. کشور ایران از لحاظ اقلیمی، آب و هوایی و خاک کاملاً مناسب کشت دانه های روغنی است. سالانه به میزان ۲۰۰ هزار تن دانه های روغنی سویا در کشور تولید می شود. دانه سویا حاوی اسید آمینه هایی است که در سایر دانه های دیگر وجود ندارد. این اسید آمینه ها شامل آرژنین، لیزین، هیستیدین و اسید آمینه های شاخه دار است که تنها در کنجاله سویا وجود دارد و می تواند پروتئین های مورد نیاز برای خوراک دام و طیور را فراهم کند. به طور میانگین از هر تن دانه سویا حدود ۱۸۰ کیلو گرم روغن و ۷۶۰ کیلوگرم کنجاله سویا در کارخانجات روغن کشی تولید می شود.

## ۲-۴ کنجاله سویا در جیره غذایی طیور

کنجاله سویا مرغوب ترین مکمل و افزودنی پروتئین گیاهی جیره غذایی طیور است. مجموع مواد مغذی قابل هضم کنجاله سویا ۷۰-۸۰ درصد است. کنجاله سویا منبع خوبی از اسید آمینه لیزین است و به عنوان منبع

پروتئینی استاندارد مور توجه قرار گرفته است. علل برتری کنجاله سویا نسبت به سایر منابع پروتئینی گیاهی شامل بازده مطلوب زراعی، کیفیت مرغوب پروتئین، میزان بالای انرژی قابل متابولیسم، درصد بالای پروتئین و تعادل نسبی محتوای اسید آمینه‌ها است. کنجاله سویا منبع مناسبی از اسیدهای آمینه ضروری به ویژه لیزین، گلیسین و تریپتوفان می‌باشد. همچنین حاوی اسید آمینه آرژنین است که طیور توان تولید آن را ندارند. کنجاله سویا به خاطر توازن اسیدهای آمینه و خوش خوراکی، یک مکمل و افزودنی پروتئینی عالی در جیره های دام و طیور محسوب می‌شوند و به طور وسیعی در تغذیه آن‌ها استفاده می‌شود.

پروتئین‌ها و پپتیدهای زیست فعال حاصل از کنجاله سویا دارای خاصیت آنتی اکسیدانی نیز هستند که توانایی بالایی در مهار اکسیداسیون لیپیدی دارند و می‌توانند جایگزین آنتی اکسیدان‌های مصنوعی شوند.

### ۳. بررسی منابع

به طور کلی هیدرولیز پروتئینی، گیاهانی مانند سویا [۲]، برنج [۳]، کلزا [۴]، نخود فرنگی [۳] و گندم [۵] ظرفیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی دارد [۶]. از سوی دیگر، تحقیقات نشان می‌دهد، مصرف پروتئین سویا به دلیل افزایش هزینه پروتئین حیوانی افزایش یافته است.

فنگ و همکاران (۲۰۰۳) در آزمایشی نشان دادند، پپتیدهای زیست فعال در سویا باعث افزایش حلالیت مواد مغذی و افزایش قابلیت هضم در دستگاه گوارش می‌شود [۷].

به گفته یانگ و همکاران. (۲۰۰۴)، استفاده طولانی مدت از پروتئین سویا هیدرولیز شده ممکن است افزایش فشار خون را در موش‌هایی که به طور طبیعی فشار خون بالایی دارند از طریق اثر مهاری آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین به تاخیر بیاورد [۸].

وانگ و همکاران (۲۰۰۵) با افزودن کنجاله سویای هیدرولیز شده توسط آنزیم پروتئاز در جیره طیور شاهد افزایش وزن پایانی، وزن روزانه و نسبت وزن به خوراک و بهبود عملکرد در روزهای ۲۱ دوره پرورش شدند [۹].

به گفته اودنیگ و همکاران، گنجاندن کنجاله سویا تخمیر شده در خوراک نیز سیستم ایمنی بدن را ت به طور کلی، ایمنی محصولات غذایی حاوی پپتیدهای فعال زیستی و همچنین خواص چند منظوره آنها در خوراک دام و طیور پر کاربرد است [۱۰].

یانگ و همکاران (۲۰۰۸) همچنین گزارش کرد که پروتئین سویا از نارسایی کلیوی جلوگیری می کند، افزایش سطح انسولین را مهار می کند و اثرات ضد دیابت و ضد چاقی دارد [۱۱].

با توجه به توسعه محصولات گوشتی کاربردی، ژانگ و همکاران. (۲۰۱۰) گزارش داد که افزودن سه بخش از هیدرولیزهای پروتئین سویا تهیه شده توسط پروتئازهای میکروبی به عنوان پپتیدهای زیست فعال به گوشت چرخ کرده، کاهش قابل توجهی در پراکسیداسیون لیپیدی نشان داد [۱۲].

مونتنگ و همکاران در مطالعه ای گزارش کردند که مکمل جیره غذایی پپتید های زیست فعال منجر به افزایش مصرف خوراک در جوجه های گوشتی شده است.

در این راستا سینگ و همکاران در سال ۲۰۱۷، نشان دادند مصرف خوراکی و جذب پپتیدهای زیست فعال و مشتقات پروتئین سویا اثرات آنتی اکسیدانی (از طریق از بین بردن رادیکال های آزاد)، ضد میکروبی دارد [۱۳].

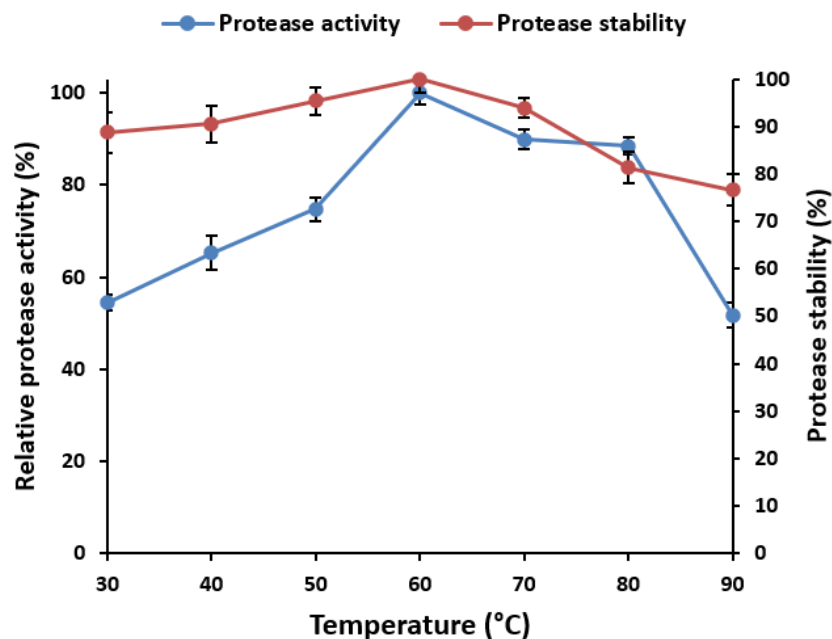
افزودن پپتیدهای زیست فعال کنجاله سویا به جیره طیور اثرات مثبتی بر بهبود سلامت روده و ضریب تبدیل خوراک و تامین پروتئین ها لازم دارد. آزمایشات انجام شده نشان می دهد، افزودن پپتید های زیست فعال کنجاله سویا منجر به کاهش ضریب تبدیل خوراک گردیده و همچنین می تواند سبب بهبود افزایش وزن روزانه شود [۱۴].

در پژوهشی دیگر زائو و همکاران (۲۰۱۹) جوجه های گوشتی را با پپتیدهای زیست فعال تهیه شده از کنجاله سویا تغذیه کرده و گزارش دادند که افزودن پپتیدهای سویا به جیره غذایی جوجه های گوشتی سبب بهبود ضریب تبدیل غذایی نسبت به سایر تیمارها شد [۴].

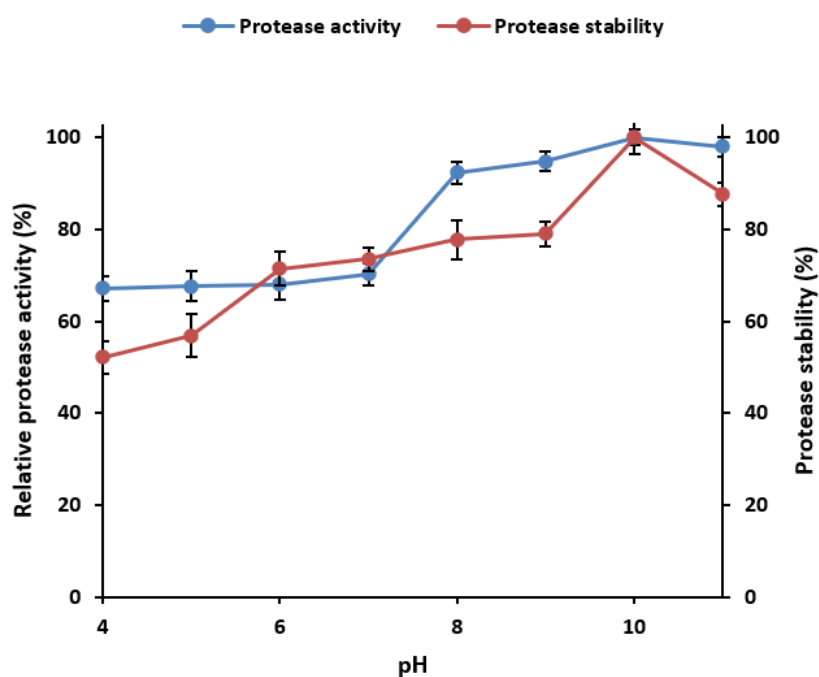
#### ۴. دستورالعمل تهیه افزودنی پروتئینی جیره غذایی طیور با استفاده از آنزیم پروتئاز نو ترکیب PersiProtease1

با توجه به اینکه آنزیم پروتئاز نو ترکیب PersiProtease1 در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی بخش زیست شناسی سامانه ها تولید گردیده است، این دستورالعمل منحصر به استفاده از این آنزیم می باشد. آنزیم PersiProtease1 پایداری بسیاری بالایی دارد که کارایی آن را در صنایع گوناگون تایید شده است [15].

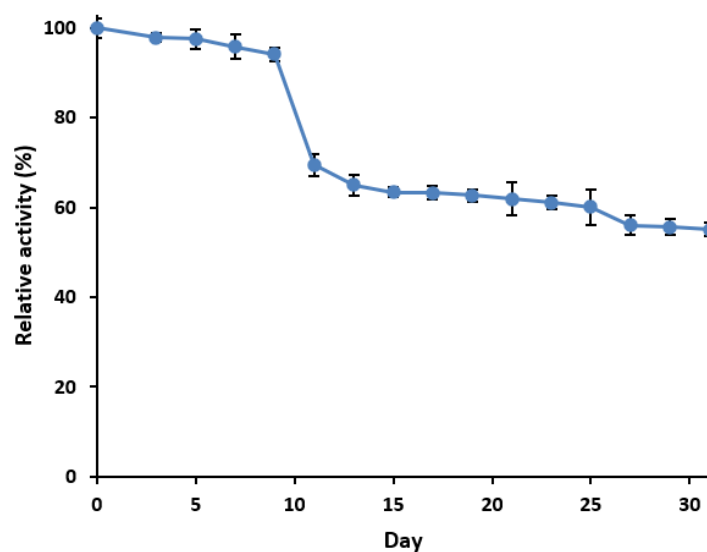
الف



ب



ج

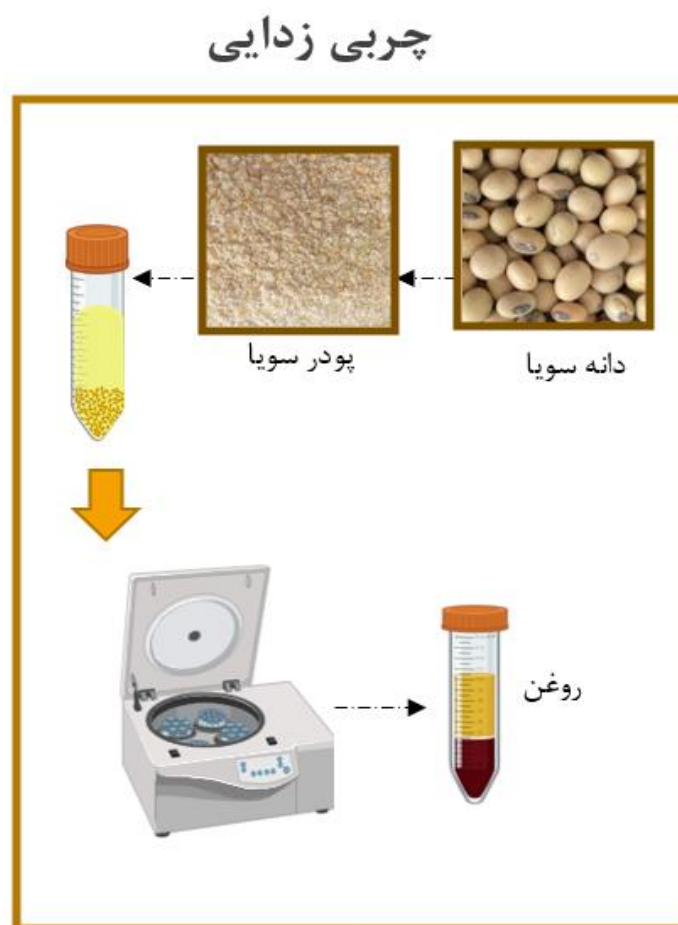


شکل ۱. اثر دما (الف) و pH (ب) و زمان (ج) بر فعالیت و پایداری آنزیم پروتئاز

جهت تولید این افزودنی به تفکیک مراحل مربوطه با استفاده از بیوکاتالیست تولیدی PersiProtease1 بیان می گردد.

#### ۴-۱ چربی زدایی دانه های سویا

۱۰ گرم پودر سویا با ۵۰ میلی لیتر از هگزان مخلوط می شود و به مدت ۳ دقیقه با سرعت متوسط هم زده می شود. سپس محلول ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد سانتیریفیوژ می شود. رسوب به دست آمده را به مدت یک شبانه روز زیر هود شیمیایی قرار می گیرد تا هگزان تبخیر گردد (شکل ۱).

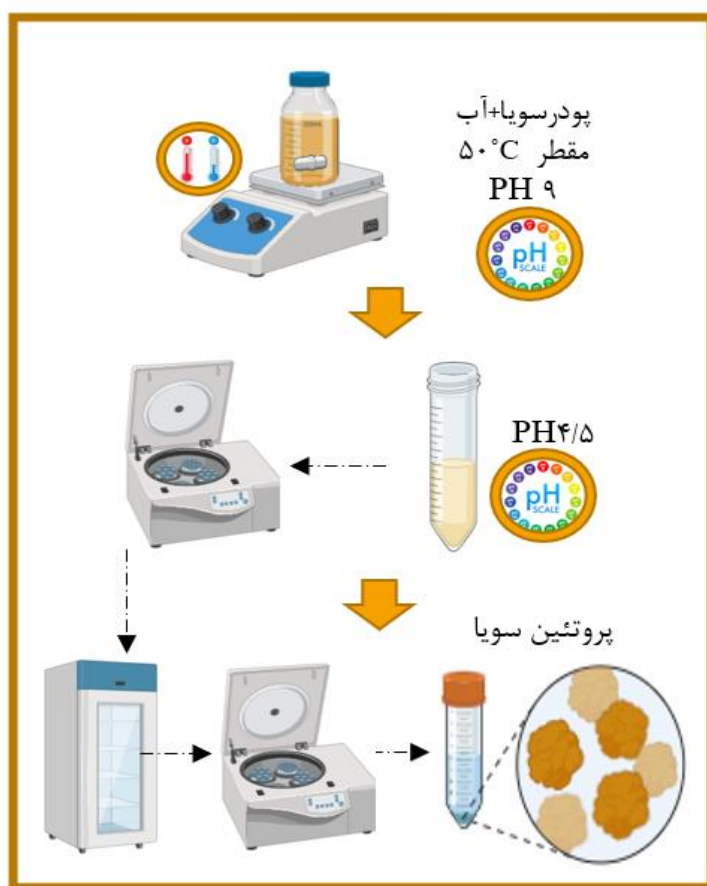


شکل ۱. مراحل چربی زدایی از پودر سویا

## ۲-۴ استخراج پروتئین سویا

۱۰ گرم از آرد بدون چربی سویا با آب مقطر در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد مخلوط می شود و pH محلول با استفاده از محلول سود روی عدد ۹ تنظیم می شود. مخلوط حاصله به مدت ۲ ساعت بر روی استیرر قرار می گیرد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتیریفیوژ می شود. مجدداً pH محلول با استفاده از اسید کلریدریک روی عدد ۴/۵ تنظیم شد و به مدت ۱ ساعت در یخچال گذاشته می شود. سپس نمونه به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتیریفیوژ می گردد. رسوب حاصل حاوی پروتئین های سویا می باشد. (شکل ۲)

## استخراج پروتئین



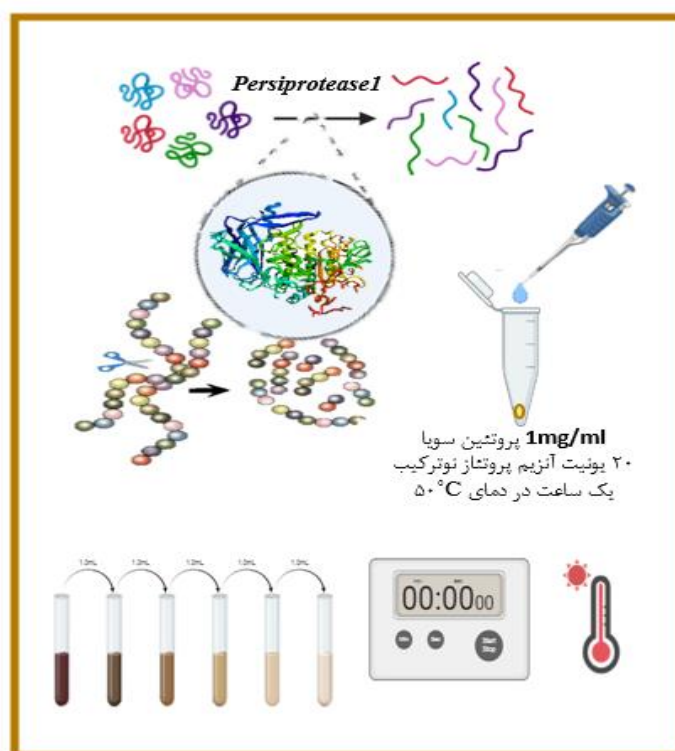
شکل ۲. مراحل استخراج پروتئین از پودر سویای چربی زدایی شده

### ۳-۴ استخراج پپتیدهای زیست فعال به روش آنزیمی

هیدرولیز آنزیمی روشی رایج برای تبدیل پروتئین‌ها به قطعات کوچکتر واحد های سازنده آنها، پپتیدها می باشد. در این دستور العمل پروتئین استخراج شده تحت اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم *PersiProtease1*

قرار می گیرد. جهت هیدرولیز پپتیدهای سویا با آنزیم نو ترکیب پروتئاز مورد نظر، به مقدار بهینه برای هضم غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر پپتید ۱۴ یونیت آنزیم اضافه می گردد و یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار می گیرد. پس از فرایند هضم و به منظور غیرفعال کردن آنزیم، نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در آبجوش قرار می گیرد. (شکل ۳)

### تولید پپتید از پروتئین سویا

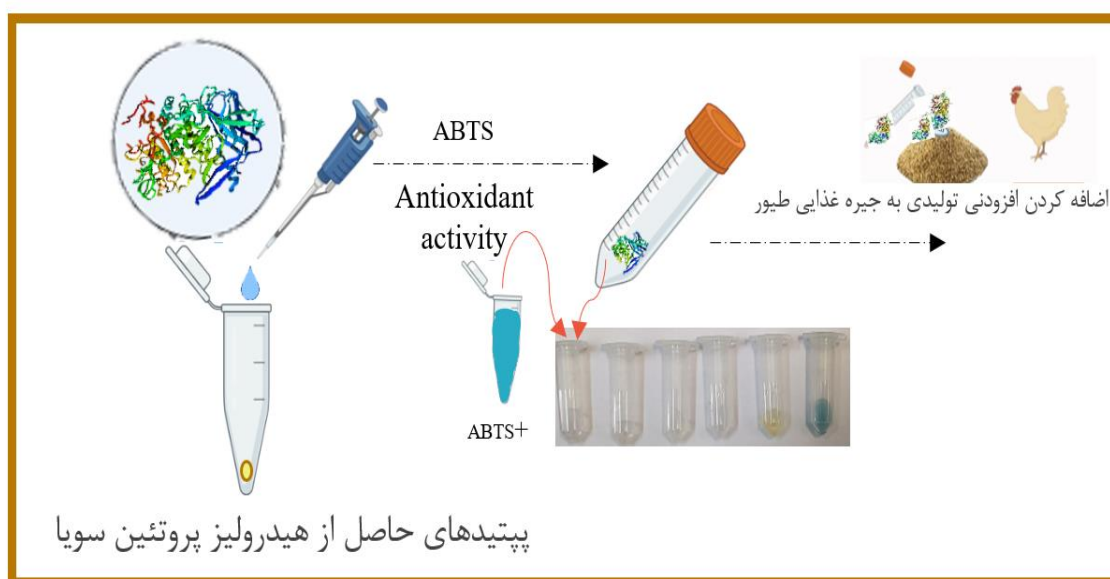


شکل ۳. تولید پپتیدهای زیست فعال از پروتئین سویا به وسیله آنزیم نو ترکیب *PersiProtease1*

#### ۴-۴ سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی از پپتیدهای تولید شده

رادیکال های آزاد می تواند بیش از حد سبب تولید اکسیدان ها گردد که ممکن است کیفیت غذاهای روغنی را کاهش دهد، باعث اکسیداسیون لیپیدها و کوتاه شدن عمر مفید غذا شود. اکسیداسیون لیپید همیشه مشکل بزرگی برای صنایع غذایی و مصرف کنندگان ایجاد می کند زیرا منجر به طعم نامطلوب، بو و محصولات واکنش سمی بالقوه می شود. به تاخیر انداختن پراکسیداسیون لیپیدی در مواد غذایی برای حفظ کیفیت و افزایش عمر مفید غذاها بسیار اهمیت دارد. پروتئین های گیاهی منبع جدیدی از پپتیدهای آنتی اکسیدانی یا هیدرولیزات در نظر گرفته شده اند که پراکسیداسیون لیپیدی مواد غذایی را به تاخیر می اندازد، در مصرف انرژی صرفه جویی می کند و درمان بیماری های مرتبط با اکسیداسیون را تقویت می کند و در نتیجه به ترتیب باعث کاهش ضایعات مواد غذایی و بهبود کیفیت زندگی می شود. (شکل ۴)

#### بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها



شکل ۴. بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای حاصل از پروتئین های سویا

در این دستور العمل برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی، ابتدا محلول اولیه‌ی  $ABTS^{10}$  با غلظت ۷/۴ میلی مولار و پتاسیم پرسولفات با غلظت ۲/۶ میلی مولار به نسبت ۱:۱ تهیه می شود و به منظور تولید رادیکال به مدت ۱۲-۱۶ ساعت در محیط تاریک قرار می گیرد.

سپس محلول تازه‌ی  $ABTS$  با رقیق سازی  $ABTS^+$  با استفاده از آب مقطر به منظور رسیدن به جذب  $0.7 \pm 0.3$  در طول موج ۷۳۴ نانومتر تهیه می گردد. مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر از نمونه‌ی رقیق شده با ۱ میلی لیتر از محلول  $ABTS$  آماده شده، مخلوط می شود و پس از ۱۰ دقیقه جذب آن در ۷۳۴ نانومتر اندازه گیری می گردد.

درصد مهار رادیکال با رابطه زیر محاسبه خواهد شد:

$$\text{مهار رادیکال } ABTS (\%) = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

**جدول ۲. فعالیت آنتی اکسیدانی به روش تعیین مهار رادیکال  $ABTS$  بر حسب درصد (غلظت نمونه پروتئین و پپتیدهای سویا تولید شده یک میلی گرم در میلی لیتر می باشد).**

| نمونه ها      | جذب ۷۳۴ نانومتر | مهار رادیکال $ABTS$ % |
|---------------|-----------------|-----------------------|
| پروتئین سویا  | ۰/۳۵۴           | ۴۷/۲۴%                |
| پپتیدهای سویا | ۰/۰۴            | ۹۴/۰۳%                |

<sup>10</sup> 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

## ۵. نتیجه گیری

پروتئین‌ها جزء حیاتی رژیم غذایی طیور هستند و دارای طیف وسیعی از عملکردهای تغذیه ای و بیولوژیکی هستند. از نظر تغذیه ای، آنها منابع ضروری از اسیدهای آمینه هستند و همچنین می توانند انرژی را تامین کنند. کنجاله سویا منبع اصلی پروتئین در خوراک طیور و یکی از بهترین مواد با کیفیت است. به دلیل مشخصات نسبتاً خوب اسید آمینه، معمولاً برای متعادل کردن سطح اسید آمینه جیره با غلات و محصولات جانبی آنها در خوراک طیور استفاده می شود. پروتئین سویا و هیدرولیزهای مشتق شده از آن توسط بیوکاتالیست نو ترکیب *PersiProtease1* به دلیل افزایش خواص آنتی اکسیدانی به عنوان افزودنی و مکمل های مواد غذایی محسوب می شوند. امید است که مکمل پروتئینی حاصل از کنجاله سویا که به نسبت یک به ده از جیره اصلی غذای طیور اضافه می گردد، با بهبود کارایی روده و افزایش فعالیت و ترشح آنزیم های گواشی توسط باکتری های مفید سبب افزایش هضم و جذب مواد مغذی در طیور گردد.

## سپاس گذاری

بدین وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به دلیل حمایت مالی در قالب پروژه تحقیقاتی با شماره مصوب ۹۷۰۳۳۴-۹۵۰۰۴-۰۰۴-۰۵-۰۵-۱۲۴ تقدیر و تشکر می شود.

## ۶. فهرست منابع

- [1] O. S. Ramos and F. X. Malcata, *Food-Grade Enzymes*, Second Edi., vol. 3, no. March. Elsevier B.V., 2011.
- [2] A. Moure, H. Domínguez, and J. C. Parajó, "Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates," *Process Biochem.*, vol. 41, no. 2, pp. 447–456, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.procbio.2005.07.014.
- [3] T. Zhang, Y. Li, M. Miao, and B. Jiang, "Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates," *Food Chem.*, vol. 128, no. 1, pp. 28–33, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.02.072.
- [4] X. Pan, Y.-Q. Zhao, F.-Y. Hu, C.-F. Chi, and B. Wang, "Anticancer Activity of a Hexapeptide from Skate (*Raja porosa*) Cartilage Protein Hydrolysate in HeLa Cells," *Mar. Drugs*, vol. 14, no. 8, p. 153, Aug. 2016, doi: 10.3390/md14080153.

- [5] K. Zhu, H. Zhou, and H. Qian, "Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase," *Process Biochem.*, vol. 41, no. 6, pp. 1296–1302, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.procbio.2005.12.029.
- [6] Y. Quah *et al.*, "Purification and identification of novel cytotoxic oligopeptides from soft coral *Sarcophyton glaucum*," *J. Zhejiang Univ. B*, vol. 20, no. 1, pp. 59–70, Jan. 2019, doi: 10.1631/jzus.B1700586.
- [7] J. Feng, X. Liu, Z. R. Xu, Y. Z. Wang, and J. X. Liu, "Effects of Fermented Soybean Meal on Digestive Enzyme Activities and Intestinal Morphology in Broilers," *Poult. Sci.*, vol. 86, no. 6, pp. 1149–1154, 2007, doi: <https://doi.org/10.1093/ps/86.6.1149>.
- [8] H.-Y. Yang, S.-C. Yang, J.-R. Chen, Y.-H. Tzeng, and B.-C. Han, "Soyabean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats," *Br. J. Nutr.*, vol. 92, no. 3, pp. 507–512, Sep. 2004, doi: 10.1079/BJN20041218.
- [9] W. Wang and E. G. De Mejia, "A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases," *Compr. Rev. food Sci. food Saf.*, vol. 4, no. 4, pp. 63–78, 2005.
- [10] C. C. Udenigwe and R. E. Aluko, "Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits," *J. Food Sci.*, vol. 77, no. 1, Jan. 2012, doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x.
- [11] H.-Y. YANG, J.-R. CHEN, and L.-S. CHANG, "Effects of Soy Protein Hydrolysate on Blood Pressure and Angiotensin-Converting Enzyme Activity in Rats with Chronic Renal Failure," *Hypertens. Res.*, vol. 31, no. 5, pp. 957–963, 2008, doi: 10.1291/hypres.31.957.
- [12] L. Zhang, J. Li, and K. Zhou, "Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 7, pp. 2084–2089, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.078.
- [13] B. P. Singh, D. Yadav, and S. Vij, "Soybean Bioactive Molecules: Current Trend and Future Prospective," 2017, pp. 1–29.
- [14] M. R. Abdollahi, F. Zaefarian, Y. Gu, W. Xiao, J. Jia, and V. Ravindran, "Influence of soybean bioactive peptides on performance, foot pad lesions and carcass characteristics in broilers," *Journal of Applied Animal Nutrition*, vol. 6. 2018, doi: 10.1017/jan.2018.1.
- [15] S. Ariaeenejad, K. Kavousi, A. S. A. Mamaghani, R. Ghasemitabesh, and G. Hosseini Salekdeh, "Simultaneous hydrolysis of various protein-rich industrial wastes by a naturally evolved protease from tannery wastewater microbiota," *Sci. Total Environ.*, vol. 815, p. 152796, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2021.152796.