سومین همایش ملی
بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

# گواهی شرکت در سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی

## گواهی می شود آقای امید صفری

**به عنوان** ارائه دهنده پوستر با عنوان: "بررسی تاثیر فرآیند تخمیر با لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر کاهش ترکیبات ضدتغذیه ای کنسانتره پروتئینی کانولا"

با همکاری: مهرداد فرهنگی، باقر یخچالی و معصومه مهربان سنگ آتش

**در سومین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران که در تاریخ ۱۳ تا ۱۵ شهریور ماه ۱۳۹۱ در دانشگاه فردوسی مشهد برگزار شده است شرکت داشته اند.**

دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۱۳۹۱

دبیر همایش
مجتبی طهمورث پور

# خلاصه مقالات

# سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
3rd Iranian Agricultural Biotechnology Conference

## ۱۳ تا ۱۵ شهریور ۱۳۹۱
## دانشگاه فردوسی مشهد

سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۱۵ تا ۱۳ شهریور ماه ۱۳۹۱، دانشگاه فردوسی مشهد
3rd Iranian Agricultural Biotechnology Congress
3-5 September, 2012, Ferdowsi University Of Mashhad

# بررسی تاثیر فرآیند تخمیر با لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر کاهش ترکیبات ضدتغذیه‌ای کنسانتره پروتئینی کانولا

**امید صفری[1*]، مهرداد فرهنگی[2]، باقر یخچالی[3]، معصومه مهربان سنگ آتش[4]**

*[1*] استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد*
*[2] استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران*
*[3] دانشیار گروه صنایع تخمیری، پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن‌آوری*
*[4] مربی گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی*

omidsafari@um.ac.ir

**چکیده:**

کنجاله کانولا یکی از منابع مهم پروتئین گیاهی بوده و استفاده از این ماده غذایی در تغذیه انسان یا حیوانات علیرغم ترکیب پروتئینی مناسب آن به دلیل وجود ترکیبات ضدتغذیه‌ای متنوع مانند فیبر خام، فیتات و گلوکوسینولات محدود می باشد. جهت بررسی تاثیر فن‌آوری تخمیر جامد بر ترکیبات مغذی و ضدتغذیه‌ای کنجاله کانولای فرآوری شده، از سه تراکم تلقیح $10^9$ ۱، $10^9$ ۲ و $10^9$ ۳ CFU در میلی لیتر در ازای هر کیلو گرم کنجاله کانولای فرآوری شده استفاده شد. تخمیر کنجاله کانولای فرآوری شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم به طور متوسط به ترتیب موجب افزایش معنی دار ($P<0/05$) ۳/۶ درصدی مقدار پروتئین حقیقی و کاهش معنی دار ($P<0/05$) ۴۴/۵، ۱۷/۳ و ۱۲/۶ درصدی تانن، فیبر نامحلول در شوینده اسیدی و خنثی نسبت به تیمار شاهد گردید. میزان قابلیت هضم *In vitro* پروتئین محصولات تخمیر شده (از ۶۶/۴۸ تا ۶۹/۰۶ درصد) به طور معنی داری ($P<0/05$) نسبت به شاهد (۵۱/۷۳ درصد) افزایش یافت. انتخاب سوبسترا و سابقه فرآوری آن، نوع میکروارگانیسم و تراکم تلقیح جهت تولید محصولی با ویژگی‌های خاص از طریق فن آوری تخمیر در شرایط جامد بسیار مهم ارزیابی می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** کنجاله کانولا، کنسانتره پروتئینی، تخمیر، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، ترکیبات ضدتغذیه‌ای

**مقدمه:**

کنجاله کانولا دومین فرآورده پروتئینی گیاهی بعد از کنجاله سویا محسوب می شود که ۱۳ درصد از تولید جهانی کنجاله پروتئینی (۲۵۳/۲۷ میلیون تن) در سال زراعی ۲۰۱۱-۲۰۱۰ را به خود اختصاص داده است (۱۱). ترکیباتی همچون فیبر، فیتات، گلوکوسینولات و تانن، حداکثر میزان

استفاده از این پروتئین گیاهی را در جیره غذایی حیوانات محدود کرده است. یکی از مشکلات عمده در فرآیند تولید کنسانتره های گیاهی، تغلیظ همزمان پروتئین و ترکیبات ضد تغذیه ای همچون فیتات می باشد (۳).

راهکار دیگر، تولید محصولات جدید پروتئینی با کیفیت غذایی مناسب و با حداقل تاثیرات سوء زیستی و قیمت تمام شده از طریق فناوری تخمیر با گونه های قارچی و باکتریایی می باشد (۱۰). حذف ترکیبات ضد تغذیه ای، بهبود ساختار، طعم و مزه غذاهای با منشاء گیاهی به کمک گونه های قارچی (همچون رایزوپوس اولیگوسپروس، آسپرژیلوس اوریزه، نوروسپورا سیتوفیلا و ...) و باکتریایی (لاکتوباسیل‌ها) عمدتا از طریق مصرف ترکیبات کربوهیدراتی سوبسترا، ترشح آنزیم های موثر و تولید زیتوده پروتئینی (۱)، در شرایط تخمیر جامد کاربرد گسترده ای در تهیه مواد غذایی مورد مصرف در تغذیه انسان پیدا کرده است. فناوری تخمیر به عنوان گزینه ای جدید در فرآوری اقلام غذایی، از روش های زیست فناوری در برابر روش های شیمیایی و استفاده از افزودنی های طبیعی نسبت به انواع مصنوعی حمایت می نماید (۴). کارآیی فرآیند تخمیر به عوامل متعددی همچون نوع گونه، تراکم تلقیح، سن کشت، مدت زمان لازم گرمخانه گذاری، شرایط مطلوب پرورش (دما، pH ، مقدار رطوبت، مقیاس کشت و ...)، نوع، اندازه ذرات، سابقه فرآوری قبلی و نسبت کربن به نیتروژن سوبسترا بستگی دارد (۵). استفاده از لاکتوباسیلوس ها با هدف کاهش میزان فیبر و افزایش مقدار پروتئین خام بقولات به عنوان نوعی فن آوری دوستدار محیط زیست مطرح شده است (۴). در مطالعه حاضر پتانسیل تخمیر باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم با هدف حذف ترکیبات ضدتغذیه‌ای و افزایش مقدار پروتئین خام بر کنجاله کانولای فرآوری شده با هدف افزایش ترکیبات مغذی (پروتئین خام، پروتئین حقیقی، اسیدهای آمینه و چربی خام) و کاهش ترکیبات ضد تغذیه ای (فیتات، گلوکوسینولات، ترکیبات فنلی و تانن)، فیبری (فیبرهای نامحلول در شوینده‌های خنثی و اسیدی، بخش کل و نامحلول پلی ساکاریدهای غیر نشاسته ای و فیبر خام) و افزایش قابلیت هضم *In vitro* پروتئین مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها:

از کنجاله کانولای دو صفر (براسیکا ناپوس، شرکت دانه های روغنی بهپاک، بهشهر، گلستان) غربال شده با الک استاندارد آزمایشگاهی شماره ۱۶ غربال، هیدرولیز شده با آنزیم های پکتیناز (۰/۱۵ درصد کنجاله) و فیتاز (در غلظت ۵۰۰۰ واحد در کیلوگرم کنجاله) و در نهایت سه بار شستشو شده با محلول متانول آمونیاکی استفاده گردید. بعد از فعال‌سازی آمپول لیوفیلیزه لاکتوباسیلوس پلانتاروم (PTCC: ۱۰۵۸) در محیط کشت MRS Broth، گرمخانه گذاری (۲۴ ساعت و در دمای $37^{\circ}$ C) گردید. سپس تراکم باکتری ها با کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر و بر اساس کدورت معادل یک مک فارلند (۱۰۹ CFU/ml ۱/۰) تعیین شد. از کنجاله کانولای فرآوری و اتوکلاو شده به نسبت ۳/۵ درصد وزن با آب مقطر استریل مرطوب و با تراکم های $10^{9}$ ۱، $10^{9}$ ۲ و $10^{9}$ ۳ باکتری به ازای هر کیلو گرم کنجاله (n=۳) تلقیح و به مدت ۳۶ ساعت در دمای $37^{\circ}$ C گرمخانه گذاری گردیدند. در ادامه، محصولات تخمیر شده در فریزر $-70^{\circ}$ C نگهداری و در نهایت در شرایط انجماد خشک ($-100^{\circ}$ C) شدند. در ادامه مواد مغذی (پروتئین خام، چربی خام)، فیبر خام، خاکستر، عصاره عاری از نیتروژن و انرژی خام طبق روش‌های معمول تعیین گردیدند (۲). مقادیر ترکیبات فیبری مانند فیبرهای نامحلول در شوینده‌های اسیدی و خنثی به صورت مرحله ای با استفاده از تجزیه کننده اتوماتیک و تانن از طریق روش وانیلین- اسید کلریدریک و قرائت جذب نوری عصاره در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه گیری شدند (۷). مقدار اسید های آمینه کنجاله کانولا و محصولات فرآوری شده ناشی از آن بعد از هیدرولیز با اسید کلریدریک ۶ مولار، مرکاپتو اتانول ۰/۵ گرم در لیتر و ۰/۲ گرم در لیتر فنول در دمای $115^{\circ}$C به مدت ۲۴ ساعت طبق روش استاندارد و با استفاده از دستگاه اتوماتیک تجزیه کننده اسیدهای آمینه

(Sykam Amino Acid Analyzer S433; Germany) اندازه گیری گردید. همچنین مقادیر متیونین و سیستین بعد از اکسیداسیون و تثبیت با اسید فرمیک و تریپتوفان بعد از هیدرولیز قلیایی و از طریق رنگ سنجی تعیین گردیدند. قابلیت هضم *In vitro* پروتئین با استفاده از پپسین- پانکراتین تعیین شد (۹). کلیه داده های درصدی به صورت آرک سینوس تبدیل شدند. بعد از تحقق دو شرط اصلی تجزیه واریانس (همگن بودن واریانس و نرمال بودن داده ها به ترتیب با استفاده از آزمون های لیونز و کولموگروف اسیمرنوف) (۱۲)، از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه برای مقایسه واریانس بین تیمارها و از آزمون دانکن برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها (در سطح اعتماد ۵ درصد) از طریق نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ استفاده به عمل آمد.

## نتایج و بحث:

تخمیر کنجاله کانولای فرآوری شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم موجب افزایش معنی دار ($P<0/05$) مقادیر پروتئین خام (از ۴۹/۷۴ تا ۴۹/۹۷ درصد) و حقیقی (از ۴۵/۴۱ به ۴۷/۰۶ درصد) نسبت به تیمار شاهد (به ترتیب ۴۸/۰۸ و ۴۲/۸۹ درصد) گردید. با افزایش تراکم تلقیح از ۱۰۹ ۱ به۱۰۹ ۳ سلول باکتری در هر کیلو گرم کنجاله، مقدار لیزین (از ۱/۲۳ به ۱/۳۴ درصد) و متیونین (از ۱/۱۲ به ۱/۱۳ درصد) کنجاله کانولای تخمیر شده با این سویه به طور معنی داری ($P<0/05$) نسبت به تیمار شاهد (هر یک ۰/۹۲ درصد) بهبود یافت. شاخص اسیدهای آمینه ضروری تمام محصولات تخمیر شده (به طور متوسط ۴/۷۱) و نمره شیمیایی بر حسب پروتئین کامل تخم مرغ (به طور متوسط ۵۵/۷۲ درصد) به طور معنی داری ($P<0/05$) نسبت به کنجاله کانولای تیمار شاهد (به ترتیب ۴/۵۳ و ۴۵/۴۳ درصد) بهبود یافت. همچنین همبستگی مثبت (۹۸ درصد) و معنی داری ($P<0/05$) بین مقدار پروتئین حقیقی و مقدار کل اسیدهای آمینه مشاهده گردید. مصرف قندهای قابل تخمیر توسط گونه های قارچی، باکتریایی و یا مخمر به عنوان منابع مطلوب غذایی جهت ساخت زیتوده پروتئینی مطرح می باشد و کاهش ماده خشک نیز تائید کننده متابولیسم مطلوب این گونه ها می باشد (۶). همچنین بخشی از سوبسترا نیز ممکن است در طی تبدیل و تجزیه زیستی به فرآورده های گازی تبدیل شوند. اندازه ذره و پیش تیمار مناسب سوبسترا به عنوان عوامل موثر بر فرآیند تخمیر در رشد مناسب میکرو ارگانیسم و به تبع آن افزایش زیتوده پروتئینی موثر می باشند (۵). در مطالعه حاضر از هیچ نوع منبع نیتروژنی به عنوان مکمل استفاده نگردید ولی پیش تیمار کنجاله کانولا با آنزیم های پکتیناز، فیتاز و سپس شستشو با محلول متانول آمونیاکی باعث گردید که مقدار نیتروژن معدنی محصول فرآوری شده افزایش یابد. نیتروژن معدنی از طریق روش کلدال قابل ردگیری نیست. از طرفی نیز ممکن است هیدرولیز تانن و فیتات از طریق تخمیر باعث آزاد سازی نیتروژن (آلی و معدنی) و مصرف آن توسط میکرو ارگانیسم شده باشد. برخی نیز تولید اندک پروتئین توسط میکرو ارگانیسم های مورد استفاده، تولید آنزیم و تبدیل های زیستی توسط آن ها را دلیل افزایش میزان پروتئین اعلام نموده اند.

با افزایش تراکم تلقیح (از ۱۰۹ ۱ به۱۰۹ ۳ سلول باکتری در هر کیلو گرم کنجاله) مقدار تانن (از ۱/۴۰ به ۰/۹۷ درصد)، فیبرهای حاصل از شستشو با محلول‌های اسیدی (از ۱۹/۰۹ به ۱۵/۸۷ درصد) و خنثی (از ۱۵/۹۲ به ۱۳/۹۱ درصد) نسبت به تیمار شاهد (به ترتیب ۱/۶۲، ۲۸/۸۵ و ۳۲/۲۶ درصد) به طور معنی داری ($P<0/05$) کاهش یافت. در همین ارتباط مقادیر قابلیت هضم *In vitro* پروتئین کنجاله های کانولای تخمیر شده با سویه مذکور به طور معنی داری ($P<0/05$) از ۶۶/۴۸ درصد (در تراکم تلقیح ۱۰۹ ۱) به ۶۹/۰۶ درصد (در تراکم تلقیح ۱۰۹ ۳) افزایش یافت. این در حالی بود که در تیمار شاهد این مقدار، ۵۱/۷۳ درصد گزارش شد. همچنین قابلیت هضم *In vitro* پروتئین همبستگی های منفی معنی داری ($P<0/05$) با فیبر خام (۸۳/۷- درصد)، فیبرهای نامحلول در شوینده‌های اسیدی (۹۸/۷- درصد) و خنثی (۹۹/۷- درصد) و عصاره عاری از نیتروژن

(۶۹/۱- درصد) داشت. فرآیند تخمیر می تواند شرایطی را جهت رشد میکرو ارگانیسم های تجزیه کننده تانن (باسیلوس، کورینه باکتریوم، آسپرژیلوس و ...) فراهم آورد. تجزیه میکروبی تانن متراکم کمتر از تانن قابل هیدرولیز در شرایط هوازی و بی هوازی می باشد. تولید تاناز توسط سویه های لاکتوباسیلوس مانند لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس پارا پلانتاروم گزارش شده و حتی تولید این آنزیم توسط جنس لاکتوباسیلوس ASR-S1 در شرایط تخمیر جامد مورد تائید قرار گرفته است (۸). یکی از چالش های پیش روی فن آوری تخمیر در شرایط جامد با دیدگاه تغذیه ای، بررسی سرنوشت نهایی مواد ضد تغذیه ای در محصول فرآوری شده است. بررسی متابولیت های حاصل از این تبدیل های زیستی بسیار ارزشمند می باشد زیرا از این اطلاعات می توان در فرموله نمودن بهینه جیره های غذایی با در نظر گرفتن سطح مجاز ترکیبات ضد تغذیه ای در جیره غذایی استفاده به عمل آورد.

## تقدیر و تشکر:

بدین وسیله نویسندگان مقاله از صندوق محترم پژوهشگران کشور جهت حمایت مالی طرح شماره ۸۷۰۴۱۳۸۷ سپاسگزاری می‌نماییم.

## مراجع:

(1) Amadou, I., Kamara, M. T., Tidjani, A., Foh, M. B. K., L, G. W. (2010). Physicochemical and nutritional analysis of fermented soybean protein meal by Lactobacillus plantarum Lp6. World Journal of Dairy and Food Sciences, 5 (2): 114-118.

(2) Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2005). Official Methods of Analysis (16th edn). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.

(3) Hardy, R. W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fish meal. Aquaculture Research, 41: 770-776.

(4) Khalil, A. (2006). Nutritional improvement of an Egyptian breed of mung bean by probiotic lactobacilli. African Journal of Biotechnology, 5 (2): 206-212.

(5) Krishna, C. (2005). Solid- state fermentation systems: a review. Critical Reviews in Biotechnology, 25: 1-30.

(6) Pal Vig, A., Walia, A. (2001). Beneficial effects of *Rhizopus oligosporus* fermentation on reduction of glucosinolates, fiber and phytic acid in rapeseed (*Brassica napus*) meal. Bioresources Technology, 78: 309-312.

(7) Price, M. L., Van Scoyoc, S., Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannins and sorghum grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26 (5): 1214-1218.

(8) Sabu, A., Augur, C., Swati, C., Pandey, A. (2006). Tannase production by *Lactobacillus* sp ASR-S1 under solid state fermentation. Process Biochemistry, 41: 575-580.

(9) Singh, U., Jambunathanm R. (1981). Studies on Desi and Kabuli chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars: levels of protease inhibitors, levels of polyphenolic compounds and in vitro protein digestibility. Journal of Food Science, 46: 1364-1367.

(10) Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., Pandey, A. (2009). Recent advances in solid- state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 44: 13-18.

(11) USDA (United States Department of Agriculture) (2010). Oilseeds: World Markets and Trade, online viewed July 2011, http://www.soystat.com.

(12) Zar, J. H. (1999). Biostatistical Analysis. New Jersy, USA. Prentice-Hall, Inc.