تأثیر افزودن آنزیم‌های تجاری، pH ، حرارت بر میزان فیتات ذرت و کنجاله‌ی سویا در شرایط آزمایشگاهی

مهرداد مدیرصانعی[۱]، زهراسادات رحیمی[۲*]، بهزاد منصوری[۱]، محمد رضاییان[۱]، محسن فرخوی[۱] و ژیلا هنرزاد[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۴

چکیده

هدف این مطالعه، بررسی تأثیر پیش‌فرآوری اجزای خوراک (ذرت و کنجاله‌ی سویا) با عوامل مختلف در شرایط آزمایشگاهی، بر میزان فیتات باقی‌مانده بود. برای این منظور از سه فرآورده‌ی آنزیمی تجاری (Bio-phytase، آنزیم Rovabio Excel AP و آنزیمAP Rovabio Max) و سه محلول با سطوح مختلف pH (آب مقطر، اسید هیدرو کلریدریک ۰/۵ درصد و ۱ درصد به ترتیب دارای pH مساوی ۵/۵، ۲/۱۲ و ۱/۸۸)، استفاده شد. ابتدا نمونه‌ها با فراورده‌های آنزیمی مخلوط شده، محلول‌های فوق به آن‌ها اضافه و برای مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ و ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد پیش‌فرآوری شدند. سپس میزان فیتات در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دادند افزودن محلول‌های دارای مقادیر مختلف pH (در دمای ۲۵ و ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت) به ذرت مخلوط شده با Bio-phytase یا Rovabio Max AP موجب کاهش معنی‌دار میزان فیتات باقی‌مانده در آن گردید که این امر به معنی افزایش آزادسازی فسفر از فسفر فیتاته و بهبود قابلیت زیست فراهمی آن می‌باشد. بهترین نتیجه با پیش فراوری نمونه‌های ذرت مخلوط با Rovabio AP Max و محلول اسید هیدروکلریدریک ۰/۵ درصد در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به دست آمد، و میزان فیتات تا حدود ۹۸/۵ درصد در مقایسه با گروه شاهد، کاهش یافت. نتایج تقریباً مشابهی برای نمونه‌های کنجاله‌ی سویا به دست آمد به طوری که بیش‌ترین میزان کاهش فیتات (تا ۵۵/۴ درصد) در نتیجه پیش‌فرآوری نمونه‌های مخلوط شده با Rovabio Max AP و محلول اسید هیدروکلریدریک ۰/۵ درصد در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد حاصل گردید. بر اساس نتایج حاصل می‌توان نتیجه‌گیری نمود که افزودن محلول اسید هیدروکلریدریک ۰/۵ درصد به نمونه‌های ذرت و کنجاله‌ی سویای مخلوط شده با فرآورده‌ی آنزیمی Rovabio Max AP (حاوی فیتاز و آنزیم‌های NSPases قابلیت زیست فراهمی فسفر را افزایش داد.

کلمات کلیدی: پیش‌فرآوری، فیتات، ذرت، کنجاله سویا، آنزیم

مقدمه

اسید فیتیک یا «میواینوزیتول هگزا کیس فسفات» از نظر ساختمانی از یک حلقه‌ی میواینوزیتول تشکیل شده که به طور کامل توسط شش گروه فسفات، فسفوریله شده است. ساختمان شیمیایی مولکول اسید فیتیک به گونه‌ای است که از پتانسیل بالایی جهت تشکیل کیلات با کاتیون های چند ظرفیتی برخوردار می‌باشد (Cosgrove and Irving 1981).

اسیدفیتیک در دانه‌ی غلات و بذرها، به صورت نمکی موسوم به فیتات و به طور عمده در ترکیب با منیزیم، کلسیم، سدیم و پتاسیم وجود دارد، لایه آلوئرون[۲] محل

[۱] دانشیار گروه بهداشت و تغذیه دام و طیور، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۲*] دانش‌آموخته‌ی دکترای بهداشت خوراک دام، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران E-mail: zsadat@ut.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۳] کارشناس گروه بهداشت و تغذیه دام و طیور، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

1- Aleurone

اصلی ذخیره‌ی فیتات در بیش‌تر دانه‌های غلات است. علاوه بر آن، فیتات به صورت غیریکنواخت در مغز دانه-های دو لپه‌ای شامل دانه‌های روغنی و دانه‌ی سایر بقولات پراکنده است. بنابراین اسید فیتیک یک عامل ضدتغذیه‌ای در ماکیان می‌باشد، زیرا با فسفر و سایر مواد مغذی ترکیب می‌شود و آن‌ها را از دسترس جذب خارج کرده و قابلیت زیست فراهمی آن‌ها را کاهش می‌دهد (Cabahug et al. 1999).

میزان فیتات موجود در اجزای گیاهی خوراک متغیر می‌باشد و به نوع گیاه و شرایط رویش آن وابسته است. مقادیر فیتات در برخی از اجزای جیره در جدول ۱ نشان داده شده است (Godoy et al. 2005, Sell and Ravindran 2007).

فسفر فیتاته بخش اعظم کل فسفر موجود در دانه‌های غلات و حبوبات روغنی (حدود ۶۰ تا ۸۰ درصد) را تشکیل می‌دهد. میزان فسفر فیتاته در گیاهان بر حسب بخشی از گیاه که از آن مشتق شده است، تغییر می‌کند به طوری که محصولات فرعی دانه‌های روغنی و غلات شامل مقادیر بیش‌تری فسفر فیتاته هستند، در حالی که غلات و دانه‌های لگومینه واجد مقادیر متوسطی می‌باشند. در بیش‌تر غلات لایه‌ی آلبومینی محل تجمع اصلی فیتات است، در حالی که در دوبرگی‌ها شامل دانه‌های روغنی و لگومینه، فیتات در دانه‌ها در گنجیدگی‌های زیر سلول تجمع می‌یابد (De Blond et al. 1975, Erdman 1979). فیتات یک اسید قوی است و ساختمان آن به گونه‌ای است که پتانسیلی قوی برای شلاته کردن دارد و در pH طبیعی، مقادیر گسترده‌ای از نمک‌های غیرمحلول کاتیون دو ظرفیتی یا سه ظرفیتی را تشکیل می‌دهد (Oberlease 1973).

فیتات علاوه بر کاهش قابلیت دسترسی مواد معدنی، از طریق تشکیل کمپلکس پروتئین - فیتات در خوراک و همچنین کمپلکس‌های دوتایی و سه تایی به همراه مواد معدنی (پروتئین- فیتات- مواد معدنی) بر زیست فراهمی پروتئین‌ها نیز اثر منفی دارد (Anderson 1985, Hesselman and Aman 1986, Ravindran et al. 2000). به علاوه، فیتات بر تعدادی از آنزیم‌های گوارشی مانند پپسین، آمیلاز و تریپسین اثر بازدارندگی دارد (Cawley and Mitchell 1968, Deshpande and Cheryan 1984, Simons et al. 1990). بنابراین، بخش اعظم فسفر موجود در غلات و سایر مواد خوراکی گیاهی برای حیوانات تک معده‌ای قابل استفاده نمی‌باشند.

جدول ۱: میزان فسفر و فسفر فیتاته در برخی از اقلام متداول خوراک

اقلام خوراک	فسفر کل (g/kg)	فسفر فیتاته (g/kg)
غلات		
جو	۲/۷۳-۳/۷	۱/۸۶-۲/۲۰
ذرت	۲/۳۰-۲/۹۰	۱/۷۰-۲/۲۰
سورگوم	۲/۶۰-۳/۰۹	۱/۷۰-۲/۴۶
گندم	۲/۹۰-۴/۰۹	۱/۸۰-۲/۸۹
کنجاله‌های روغنی		
کنجاله کانولا	۸/۷۹-۱۱/۵۰	۴/۰۰-۷/۷۸
کنجاله پنبه دانه	۶/۴۰-۱۱/۳۶	۴/۹-۹/۱۱
کنجاله سویا	۵/۷۰ -۶/۹۴	۳/۵۴-۴/۵۳
محصولات جانبی		
سبوس برنج	۱۳/۴۰-۲۷/۱۹	۷/۹۰-۲۴/۲۰
سبوس گندم	۸/۰۲-۱۳/۷۱	۷/۰۰-۹/۶۰

برگرفته از مطالعات Godoy و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Sell و Ravindran در سال ۲۰۰۷

پایین بودن قابلیت دسترسی فسفر موجود در منابع گیاهی و همچنین عدم توانایی دستگاه گوارش طیور برای تولید آنزیم فیتاز یا ترشح بسیار کم آن به منظور شکستن مولکول اسید فیتیک، باعث افزایش نیاز به استفاده از منابع فسفر غیر آلی در جیره‌ی دام‌ها جهت تأمین نیازهای تغذیه‌ای آن‌ها می‌شود. از طرف دیگر، فسفر غیرقابل استفاده توسط دام‌های تک معده‌ای، به صورت هضم نشده و به همراه مدفوع دفع می‌گردد و در خاک‌های زراعی تجمع یافته و در نهایت با شسته شدن از طریق زه

آب‌ها، وارد آب‌های سطحی شده و موجب افزایش آلودگی آب رودخانه‌ها، جویبارها و دریاچه‌ها می‌گردد.

علاوه بر فیتات، عوامل ضدتغذیه‌ای دیگری در دانه‌های گیاهی وجود دارد. پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای[1] موجود در دیواره‌ی سلولی دانه‌های گیاهی به طور غالب شامل آرابینوزایلان‌ها (پنتوزان‌ها)، بتاگلوکان‌ها و سلولز می‌باشد. همچنین مقدار کمی پکتین در ساقه وجود دارد. پرندگان قادر به تولید آنزیم‌های لازم برای هضم سلولز، بتاگلوکان-ها، آرابینوزایلان‌ها و پکتین نیستند (Bedford 1993, Choct 1997).

در جیره‌های معمول طیور که بر پایه‌ی ذرت- کنجاله‌ی سویا تهیه می‌شوند، آرابینوزایلان بیش‌ترین مقدار پلی-ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای (۵۰ درصد) موجود در دیواره‌ی سلولی دانه‌ی گیاه را تشکیل داده (McNab and Boorman 2002). حضور این ترکیبات در دیواره‌ی سلولی و فقدان آنزیم‌های لازم برای شکستن آن‌ها مانع از دسترسی به مواد مغذی موجود در سلول می‌گردد.

امروزه استفاده از آنزیم‌ها در تغذیه‌ی طیور در اروپا برای افزایش ارزش خوراکی مواد خام، کاهش تغییرات کیفیت مواد مغذی اقلام خوراکی رایج است (Bedford 1993, 2000). فیتاز، آنزیمی استرازی است که اسید فیتیک را به اینوزیتول و فسفر غیرآلی تجزیه و قابلیت دسترسی و جذب فسفر را در دستگاه گوارش افزایش می‌دهد. از آن جایی که حیوانات تک معده‌ای از جمله پرندگان فاقد آنزیم فیتاز در سیستم گوارشی خود بوده یا فعالیت فیتازی آن‌ها بسیار پایین است، قادر به استفاده از فسفر موجود در ساختار فیتات نمی‌باشند. بنابراین امروزه به منظور افزایش دسترسی و جذب فسفر برای پرندگان، آنزیم‌های فیتاز تجاری به جیره‌ی پرندگان اضافه می‌شود. فیتازها منشاء مختلفی از جمله گیاهی، قارچی و میکروبی دارند. از جمله مزایای استفاده از آنزیم فیتاز در خوراک می‌توان به بهبود عملکرد رشد، افزایش قابلیت استفاده پروتئین و اسیدهای آمینه، افزایش انرژی قابل متابولیسم ظاهری، افزایش قابلیت دسترسی کلسیم و فسفر و سایر مواد معدنی اشاره کرد. به علاوه استفاده از آنزیم فیتاز با افزایش آزادسازی فسفر از فسفر فیتاته می‌تواند باعث کاهش دفع فسفر به محیط زیست و افزایش کیفیت آب-های جاری و مخازن آب شود.

تحقیقات نشان داده‌اند که با توجه به استفاده از آنزیم فیتاز در جیره، کم‌تر از ۳۵ درصد و به طور میانگین حدود ۲۹ درصد فسفر فیتاته موجود در جیره توسط این آنزیم آزاد می‌شود و بنابراین مقدار زیادی از این فسفر هنوز به صورت پیوند با اسید فیتیک دفع می‌گردد.

تا کنون مطالعات مختلفی بر روی تأثیر استفاده توأم آنزیم فیتاز و آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای (NSPase) انجام گرفته که نتایج آن‌ها متغیر بوده و مشخص شده است که آنزیم‌های NSPase تخریب دیواره‌ی سلول‌های گیاهی را افزایش داده و قابلیت دسترسی به مواد مغذی را برای دام‌ها بهبود می‌بخشند. بدین ترتیب، دسترسی آنزیم فیتاز به فیتات و آزادسازی فسفر فیتاته را تسهیل می‌کنند (Blaabiehrg et al. 2010, Francesch and Geraert 2009).

تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که پیش‌فرآوری اجزای خوراک، می‌تواند یکی دیگر از روش‌های مفید در هیدرولیز مواد ضدتغذیه‌ای از جمله فیتات بوده و دسترسی به مواد مغذی را برای دام افزایش دهد. هدف از این مطالعه، ارزیابی تأثیر پیش‌فرآوری اجزای خوراک با استفاده از عواملی از جمله pH و آنزیم‌های تجاری بر میزان تجزیه‌ی فسفر فیتاته و افزایش قابلیت دسترسی به فسفر در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش کار

آزمایش ۱: در این مطالعه‌ی تجربی تأثیر دو عامل نوع فراورده آنزیمی و میزان pH بر آزادسازی فسفر از فسفر فیتاته در نمونه‌های ذرت مورد بررسی قرار گرفتند.

1- Non-Starch Polysaccharide (NSP)

تیمارهای آزمایشی بر اساس طرح تصادفی با آرایش فاکتوریل ۴×۳، شامل سه محلول با مقادیر مختلف pH (آب مقطر، اسید هیدروکلریک ۰/۵ درصد و اسید هیدروکلریک ۱ درصد) و سه فراورده‌ی تجاری آنزیمی (بدون آنزیم، Bio-phy =Bio-phytase، Rovabio Excel (RMAP = Rovabio Max AP ، REAP = AP به ۱۲ تیمار تقسیم شدند که هر تیمار واجد ۴ تکرار بود. آنزیم Bio-phy (تولید شرکت Canadian Bio-system کانادا و حاوی ۵۰۰۰ واحد فیتاز در هر گرم)، آنزیم REAP (حاوی ۲۲۰۰۰ واحد زایلاناز و ۲۰۰۰ واحد بتاگلوکوناز در هر گرم تولید شرکت Adisseo فرانسه) و آنزیم RMAP (تولید شرکت Adisseo و حاوی۱۰۰۰۰ واحد فیتاز، ۲۲۰۰۰ واحد زایلاناز و ۲۰۰۰ واحد بتاگلوکوناز در هر گرم) است.

ابتدا نمونه‌های ذرت به خوبی آرد شده، سپس با فراورده‌های آنزیمی تجاری به خوبی مخلوط گردیدند. ۳ محلول با سطوح مختلف pH (آب مقطر، اسید هیدروکلریک ۰/۵ درصد و ۱ درصد به ترتیب دارای pH مساوی ۵/۵، ۲/۱۲ و ۱/۸۸) در دمای اتاق به مخلوط ذرت و آنزیم اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در دماهای ۲۵ و ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد درآون نگهداری تا خشک شدند تا رطوبت نمونه‌های خوراک به حدود ۱۲ درصد رسید. سپس میزان فیتات در نمونه‌های خشک شده، بر طبق روش Haug در سال ۱۹۸۳ تعیین گردید.

آزمایش ۲: در این آزمایش، تمام مراحل آزمایش ۱ بر روی نمونه‌های کنجاله‌ی سویا انجام گرفت.

داده‌ها و نتایج به دست آمده در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار R (Version,0,0) و براساس آزمون ANOVA دو طرفه و با سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در مواردی که اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید، برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون Bonferroni استفاده گردید.

نتایج

ذرت

نتایج ارائه شده در جدول ۲ نشان می‌دهند که در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در نمونه‌های ذرتی که با هیچ یک از فرآورده‌های آنزیمی مورد آزمایش مخلوط نشده بودند، تأثیر pH بر میزان فیتات باقی‌مانده (فسفر آزاد شده) معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵)، در حالی که افزودن آنزیم‌های تجاری به نمونه‌های ذرت و قرار دادن آن‌ها تحت تأثیر محلول‌های دارای مقادیر متفاوت pH تأثیر معنی‌داری بر میزان فیتات در مقایسه با گروه کنترل داشته است (P<۰/۰۵).

افزودن آنزیم‌های تجاری به نمونه‌های ذرت در هر یک از سطوح pH تأثیر معنی‌داری را بر میزان فیتات باقی-مانده نشان داد (P<۰/۰۵) . به طوری که فرآورده‌های آنزیمی تجاری مورد استفاده در این بررسی که حاوی آنزیم فیتاز بودند، مقدار فیتات را در مقایسه با گروه شاهد (بدون آنزیم) به صورت معنی‌داری کاهش دادند، اما فرآورده‌ی آنزیمی فاقد فیتاز (REAP) هیچ گونه اثر معنی‌داری بر تغییر میزان فیتات باقی‌مانده نداشت (P>۰/۰۵، جدول ۲).

در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، صرفه نظر از عدم به کارگیری آنزیم یا افزودن آنزیم‌های تجاری مورد استفاده در این مطالعه به نمونه‌های ذرت تأثیر سطوح مختلف pH بر میزان فیتات باقی‌مانده معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵) به طوری که اضافه کردن دو محصول تجاری حاوی آنزیم فیتاز سبب کاهش معنی‌دار مقدار فیتات باقی‌مانده در مقایسه با گروه شاهد گردیدند (جدول ۳، P<۰/۰۰۱) ولی محصول تجاری فاقد آنزیم فیتاز تغییر معنی‌داری در میزان فیتات باقی‌مانده نسبت به گروه شاهد (آب مقطر) ایجاد نکرد.

در ارتباط با تأثیر انواع مختلف محصولات آنزیمی به کار گرفته شده در این بررسی تجربی، نتایج ارائه شده در جدول ۳ حاکی از آن است که در هر یک از سطوح pH، وجود آنزیم فیتاز در فرآورده‌ی تجاری آنزیمی مورد

استفاده (Bio-phy و RMAP)، موجب کاهش معنی‌داری میزان فیتات باقی‌مانده در مقایسه با گروه شاهد (بدون آنزیم) گردید (P<۰/۰۰۱). بیش‌ترین کاهش فیتات مربوط به نمونه‌های ذرت مکمل شده با RMAP و فرآوری شده با اسید هیدروکلریدریک ۰/۵ درصد بود که مقادیر فیتات در آن‌ها در دو دمای ۲۵ و ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به ترتیب تا حدود ۶۵/۶ درصد و ۹۸/۵ درصد کاهش داشته است.

جدول ۲: تأثیر سه نوع فراورده آنزیمی تجاری بر میانگین میزان فیتات (±SD) باقی‌مانده در نمونه‌های ذرت فرآوری شده در سطوح مختلف pH دردمای ۲۵°C

تیمارها	آب مقطر	اختلاف با کنترل (٪)	HCL 0.5%	اختلاف با کنترل (٪)	HCL 1%	اختلاف با کنترل (٪)
بدون آنزیم	۱/۵۳±۰/۰۴ $^{A\,a}$	۰	۱/۵۷±۰/۰۸ $^{A\,a}$	۰	۱/۵۷±۰/۰۶ $^{A\,a}$	۰
Bio-phy	۱/۰۹±۰/۱۲ $^{A\,b}$	−۲۸/۷۶ *	۰/۶۳±۰/۰۸ $^{B\,b}$	−۵۹/۸۷	۱/۰۱±۰/۰۸ $^{A\,b}$	−۳۵/۶۷
REAP	۱/۴۸±۰/۰۱ $^{B\,a}$	−۳/۲۷	۱/۴۸±۰/۱۴ $^{B\,a}$	−۵/۷۳	۱/۸۸±۰/۱۹ $^{A\,a}$	+ ۱۹/۷۵ **
RMAP	۰/۹۱±۰/۱۱ $^{A\,b}$	−۴۰/۵۲	۰/۵۴±۰/۰۵ $^{B\,b}$	−۶۵/۶۱	۰/۷۰±۰/۲۶ $^{AB\,b}$	−۵۵/۴۲

$^{A-B}$ در هر ردیف میانگین‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

$^{a-b}$ در هر ستون میانگین‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

* (−) کاهش میزان فیتات در مقایسه با شاهد، ** (+) افزایش میزان فیتات در مقایسه با شاهد

SD = Standard deviation, Bio-phy =Bio-phytase, REAP = Rovabio Excel AP, RMAP = Rovabio Max AP.

جدول ۳: تأثیر سه نوع فرآورده آنزیمی تجاری بر میانگین میزان فیتات (± SD) باقی‌مانده در نمونه‌های ذرت فرآوری شده در سطوح مختلف pH دردمای در ۴۰°C

تیمارها	آب مقطر	اختلاف با کنترل (٪)	HCL 0.5%	اختلاف با کنترل (٪)	HCL 1%	اختلاف با کنترل (٪)
بدون آنزیم	۱/۷۹±۰/۲۵ $^{A\,a}$	۰	۱/۳۵±۰/۰۳ $^{B\,a}$	۰	۱/۶۰±۰/۴۱ $^{AB\,b}$	۰
Bio-phy	۰/۷۷±۰/۰۰ $^{A\,b}$	−۵۶/۹۸	۰/۰۹±۰/۰۲ $^{B\,b}$	−۹۳/۳۳	۰/۱۸±۰/۰۸ $^{B\,c}$	−۸۸/۷۵
REAP	۱/۷۶±۰/۱۷ $^{AB\,a}$	−۱/۶۸	۱/۵۸±۰/۲۲ $^{B\,a}$	+۱۷/۰۴	۲/۳۳±۰/۱۶ $^{A\,a}$	+۴۵/۶۳
RMAP	۰/۷۰±۰/۱۶ $^{A\,b}$	−۶۰/۸۹	۰/۰۲±۰/۰۱ $^{C\,b}$	−۹۸/۵۲	۰/۱۱±۰/۰۵ $^{B\,c}$	−۹۳/۱۳

$^{A-C}$ در هر ردیف میانگین‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

$^{a-c}$ در هر ستون میانگین‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

* (−) کاهش میزان فیتات در مقایسه با شاهد، ** (+) افزایش میزان فیتات در مقایسه با شاهد

SD = Standard deviation, Bio-phy =Bio-phytase, REAP = Rovabio Excel AP, RMAP = Rovabio Max AP.

کنجاله‌ی سویا

در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، تأثیر سطوح مختلف pH بر نمونه‌های کنجاله سویا بر میزان فیتات باقی‌مانده، صرف نظر از مصرف یا عدم مصرف آنزیم، معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۱)، به طوری که استفاده از محلول اسید هیدروکلریدریک ۰/۵ درصد (pH=۲/۱۲) در مقایسه با دو سطح دیگر pH موجب کاهش معنی‌دار میزان فیتات باقی‌مانده در نمونه‌های کنجاله‌ی سویا گردید (جدول ۴).

تأثیر استفاده از آنزیم در هریک از سطوح pH بر میزان فیتات باقی‌مانده در نمونه‌های کنجاله‌ی سویا در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۰۱). نتایج نشان می‌دهد که حضور آنزیم فیتاز به تنهایی یا در ترکیب با آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای موجب کاهش معنی‌دار میزان فیتات باقی‌مانده نسبت به گروه شاهد (بدون آنزیم) گردید. به عبارت دیگر، حضور آنزیم فیتاز در فرآورده‌های آنزیمی مورد استفاده در این بررسی تجربی موجب آزادسازی مقادیر بیش‌تری از فسفر گردید (جدول ۴، P<۰/۰۰۱).

در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، تأثیر فرآورده‌های آنزیمی مورد استفاده بر باقی‌مانده‌ی میزان فیتات در نمونه‌های کنجاله‌ی سویا در هر یک از سطوح مختلف pH معنی‌دار بوده، به طوری که فرآورده‌ی آنزیمی حاوی فیتاز در مقایسه با گروه شاهد (فاقد آنزیم) سبب کاهش میزان فیتات گردیده است (P<۰/۰۱)، در حالی که افزودن فرآورده‌ی آنزیمی فاقد فیتاز اثر معنی‌داری بر کاهش میزان فیتات باقی‌مانده در نمونه‌های کنجاله‌ی سویا در مقایسه با گروه شاهد (بدون آنزیم) نداشته است (P>۰/۰۵).

نتایج ارائه شده در جدول ۵ نشان می‌دهند که تأثیر پیش‌فرآوری نمونه‌های کنجاله‌ی سویا در سطوح مختلف pH و عدم استفاده از آنزیم بر میزان فیتات باقی‌مانده معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵)، در حالی که با به کارگیری فرآورده‌های آنزیمی حاوی فیتاز، تأثیر pH معنی‌دار بوده و با کاهش میزان pH از مقدار فیتات باقی‌مانده در مقایسه با گروه شاهد (آب مقطر) به طور معنی‌داری کاسته شده است (P<۰/۰۵). استفاده از فرآورده‌ی آنزیمی فاقد فیتاز در هیچ یک از سطوح مختلف pH تأثیر معنی‌داری بر مقدار فیتات باقی‌مانده نداشته است (P>۰/۰۵). بیش‌ترین کاهش فیتات در حدود ۵۵/۴ درصد در نتیجه‌ی پیش-فرآوری نمونه‌های کنجاله‌ی سویا در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و با محلول اسید هیدروکلریدریک ۰/۵ درصد و با افزودن Rovabio Max AP می‌باشد.

جدول ۴: تأثیر سه نوع فرآورده‌ی آنزیمی تجاری بر میانگین میزان فیتات (± SD) باقی‌مانده در نمونه‌های کنجاله‌ی سویا فرآوری شده در سطوح مختلف pH در دمای ۲۵°C

تیمارها	آب مقطر	اختلاف با کنترل (٪)	HCL 0.5%	اختلاف با کنترل (٪)	HCL 1%	اختلاف با کنترل (٪)
بدون آنزیم	۱/۷۳±۰/۲۳ A a	۰	۰/۶۵±۰/۰۳ B a	۰	۱/۵۳±۰/۱۰ A a	۰
Bio-phy	۱/۱۸±۰/۱۱ A b	−۳۱/۷۹	۰/۴۲±۰/۰۷ B b	−۳۵/۳۸	۱/۲۴±۰/۰۱ A bc	−۱۸/۹۵
REAP	۱/۲۷±۰/۰۵ A b	−۲۶/۵۹	۰/۶۸±۰/۰۸ B a	+۴/۶۲	۱/۳۶±۰/۱۷ A ab	−۱۱/۱۱
RMAP	۰/۹۱±۰/۱۶ A b	−۴۷/۴۰	۰/۲۹±۰/۰۵ B c	−۵۵/۳۸	۱/۱۵±۰/۲۳ A c	−۲۴/۸۴

A-B در هر ردیف میانگین‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

a-c در هر ستون میانگین‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

* (−) کاهش میزان فیتات در مقایسه با شاهد، ** (+) افزایش میزان فیتات در مقایسه با شاهد

SD = Standard deviation, Bio-phy =Bio-phytase, REAP = Rovabio Excel AP, RMAP = Rovabio Max AP.

جدول ۵: تأثیر سه نوع فرآورده‌ی آنزیمی تجاری بر میانگین میزان فیتات (± SD) باقی‌مانده در نمونه‌های کنجاله‌ی سویا فرآوری شده در سطوح مختلف pH در دمای در ۴۰°C

تیمارها	آب مقطر	اختلاف با کنترل (٪)	HCL 0.5%	اختلاف با کنترل (٪)	HCL 1%	اختلاف با کنترل (٪)
بدون آنزیم	۷/۹۸±۰/۵۹ ^{Aa}	۰	۷/۲۹±۰/۶۸ ^{Aa}	۰	۷/۵۵±۰/۳۷ ^{Aa}	۰
Bio-phy	۵/۳۸±۰/۲۳ ^{Ab}	−۳۲/۵۸	۳/۶۵±۰/۳۷ ^{Bb}	−۴۹/۹۳	۴/۰۹±۰/۵۹ ^{Bb}	−۴۵/۸۳
REAP	۷/۹۸±۰/۲۲ ^{Aa}	۰	۷/۲۶±۰/۴۷ ^{Aa}	−۰/۴۱	۷/۵۷±۰/۴۵ ^{Aa}	+۰/۲۷
RMAP	۶/۰۶±۰/۱۱ ^{Ab}	−۲۴/۱۰	۴/۱۵±۰/۸۱ ^{Bb}	−۴۳/۰۷	۳/۶۹±۰/۹۶ ^{Bb}	−۵۱/۱۳

$^{A-B}$ در هر ردیف میانگین‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

$^{a-b}$ در هر ستون میانگین‌هایی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

*(−) کاهش میزان فیتات در مقایسه با شاهد، ** (+) افزایش میزان فیتات در مقایسه با شاهد

SD = Standard deviation, Bio-phy =Bio-phytase, REAP = Rovabio Excel AP, RMAP = Rovabio Max AP.

بحث

میزان فسفر فیتاته در گیاهان به دلایل مختلف از جمله ژنتیک، نوع گیاه، شرایط محیطی رشد گیاه، روش‌های فرآوری بسیار متغیر می‌باشد و می‌تواند بر روی میزان فسفر قابل دسترس برای طیور مؤثر باشد (Godoy et al. 2005, Ravindran et al. 2006, Tahir et al. 2012). از سوی دیگر ذرت و به ویژه کنجاله‌ی سویا حاوی مقدار نسبتاً زیاد پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای (NSP) می‌باشند که موجب کاهش دسترسی آنزیم‌های گوارشی به مواد مغذی مرتبط با دیواره‌ی سلولی یا موجود در داخل سلول می‌شوند. تأثیر افزودن آنزیم‌های خارجی به خوراک و آزاد شدن مواد مغذی سبب بهبود ارزش غذایی دانه‌ها می‌گردد (Choct 1997, Hesselman and Aman 1986, Villamide et al. 1997).

برخی تحقیقات نشان می‌دهند پیش‌فرآوری (pre-treatment) نهاده‌های خوراک ممکن اثرات مفید و مؤثری را در هیدرولیز اسیدفیتیک داشته باشد (Newkirk and Classen 1998). در شرایط آزمایشگاهی، خیساندن خوراک طیور تجزیه‌ی فیتات را تسهیل کرده است؛ به خصوص هنگامی که مدت زمان در مجاورت قرار گرفتن خوراک با محلول افزایش می‌یابد. در ضمن، خیساندن نهاده‌های خوراکی در اسید سیتریک در مقایسه با آب خالص بسیار مؤثرتر بوده است (Esmaeilipour et al. 2012, 2013). Blaabjerg و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که خیساندن خوراک، به عنوان یک روش پیش‌فرآوری، قبل از خوراندن به خوک ممکن است قابلیت هضم فسفر را افزایش دهد.

نتایج نشان می‌دهند، استفاده از آنزیم فیتاز همراه با دانه‌های ذرت و کنجاله‌ی سویا موجب کاهش معنی‌دار ولی متفاوت میزان فیتات باقی‌مانده گردیده که در واقع حاکی از آزاد شدن مقدار بیش‌تری فسفر از ترکیب با اسید فیتیک می‌باشد. این نتایج با گزارش‌های ارائه شده توسط سایر محققین هم‌خوانی دارد (Cabahug et al. 1999, Godoy et al. 2005, Lu et al. 2013, Ravindran et al. 2000, 2006, Slominski 2011). از سوی دیگر بررسی اثر دما نشان‌دهنده‌ی آن می‌باشد که با بالارفتن دما به نسبت بیش‌تری از میزان فیتات باقی‌مانده در نمونه‌های ذرت و کنجاله‌ی سویا کاسته شده، به عبارت دیگر تأثیر بالارفتن دما بر کارآیی آنزیم فیتاز مثبت بوده و سبب آزادسازی مقادیر بیش‌تری از فسفر گردیده است (Denstadli et al. 2006).

نتایج به دست آمده مربوط به فرآورده‌ی تجاری فاقد فیتاز (REAP) نشان می‌دهند در مقایسه با گروه کنترل

(فاقد آنزیم) کاهش معنی‌داری در میزان فیتات باقی‌مانده به وجود نیامده و به عبارت دیگر تأثیر چندانی بر آزادسازی فسفر از فسفر فیتاته نداشته است.

در مطالعه‌ی تجربی حاضر، افزودن فرآورده‌ی آنزیمی RMAP در مقایسه با تیمار شاهد (فاقد آنزیم) و تیمار REAP، میزان فیتات باقی‌مانده در نمونه‌ها را به صورت معنی‌داری کاهش داده است. استفاده از فرآورده‌ی آنزیمی RMAP در مقایسه با فرآورده‌ی Bio-Phy، اگر چه تأثیر معنی‌داری بر کاهش مقدار فیتات باقی‌مانده در نمونه‌های ذرت و کنجاله‌ی سویا نداشته است، اما میزان کاهش مشاهده گردیده، بیش‌تر بوده و حاکی از تأثیر سیترژیستی بین آنزیم‌های فیتاز و NSPase در آزادسازی بیش‌تر فسفر از ترکیب فسفر فیتاته می‌باشد. این نتیجه با نتایج حاصل از بررسی‌های برخی از محققین مطابقت دارد (Francesch et al. 2009, Hesselman and Aman 1986, Juanpere at al. 2005, Lu et al. 2013, Slominski 2011).

علت این امر را می‌توان به این موضوع نسبت داد که وجود آنزیم‌های NSPase در فرآورده‌ی آنزیمی RMAP موجب تجزیه‌ی پلی‌ساکاریدهای غیر نشاسته‌ای موجود در دیواره‌ی سلولی دانه‌ی ذرت و همچنین کنجاله‌ی سویا گردیده و به این ترتیب دسترسی آنزیم فیتاز موجود در این فرآورده را به فسفر فیتاته افزایش داده و به عبارت دیگر آزادسازی فسفر از فسفر فیتاته را تسهیل می‌سازد (Cowieson and Adeola 2005, Olukosi et al. 2007).

در هنگام استفاده از دو فرآورده‌ی آنزیمی حاوی فیتاز (Bio-Phy و RMAP)، با کاهش سطح pH از میزان فیتات باقی‌مانده در نمونه‌های کنجاله‌ی سویا و ذرت کاسته شده است ولی مقدار این کاهش با سطح pH ارتباط مستقیمی نداشته است، به طوری که بیش‌ترین میزان کاهش فیتات در هنگام پیش‌فرآوری نمونه‌ها در محلول اسید هیدروکلریدریک ۰/۵ درصد مشاهده گردید.

این پژوهش نشان داد پیش‌فرآوری ذرت و کنجاله‌ی سویا در محلول‌هایی با سطوح مختلف pH (شامل آب مقطر، اسید کلریدریک ۰/۵ و ۱ درصد) به همراه به کارگیری آنزیم فیتاز به تنهایی و یا در ترکیب با آنزیم‌های NSPase، در دمای ۲۵ و ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌تواند آزادسازی فسفر از اسیدفیتیک و زیست فراهمی آن را افزایش دهد. بنابراین، پیش‌فرآوری اجزای خوراک می‌تواند راه مؤثری در کاهش محتوای فیتات آن‌ها و همچنین افزایش قابلیت دسترسی فسفر باشد.

تشکر و قدردانی

نظر به این که این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران انجام پذیرفته (شماره طرح: ۷۵۰۹۰۱۳/۶/۳)، نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب سپاس و قدردانی خود را از حمایت‌های ایشان اعلام دارند.

منابع

Bedford, M.R. (2000). Exogenous enzymes in mono-gastric nutrition- their current value and future benefits. Animal Feed Science and Technology, 86 (1-2): 1-13.

Blaabjerg, K.; Carlsson, N.G.; Hansen-Moller, J. and Poulsen, H.D. (2010). Effect of heat-treatment, phytase, xylanase and soaking time on inositol phosphate degradation *in vitro* in Wheat, soybean meal and rapeseed cake. Animal Feed Science Technology, 162 (3): 123-134.

Anderson, P.K. (1985). Interaction between protein and constituents that affect protein quality. In: Finley, J.W. and Hopkins, D. T. (Eds) Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds. American Association of Cereal chemists, Inc., St Paul, MN., Pp: 31-45.

Bedford, M.R. (1993). Mode of action of feed enzymes. Journal of Applied Poultry Research, 2 (1): 85-92.

Cabahug, S.; Ravindran, V.; Bryden, W.L. and Selle, P.H. (1999). Response of broilers to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. I. Effects on broiler performance and toe ash content. British Poultry Science, 40: 660-666.

Cawley, R.W. and Mitchell, T.A. (1968). Inhibition of wheat alpha- amylase by bran phytic acid. Journal of the Science of Food and Agriculture, 19 (2): 106-110.

Choct, M., (1997). Feed non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. Feed Milling International, Pp: 13-26.

Cosgrove, D.J. and Irving, G.C.J. (1981). Inositol Phosphates: Their chemistry, Biochemistry and physiology. Elsevier publication Scientific Publishing Co., New York, P: 26.

Cowieson, A.J. and Adeola, O. (2005). Carbohydrase, Protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. Journal of Poultry Science, 84 (12): 1860-1867.

De Blond, A.R.; Gamer, G.B. and Kratzer, F.H. (1975). Identification and properties of phytate in cereal grains and oil seed products. Journal of Agricultural and food Chemistry, 23 (6): 1186-1189.

Denstadli, V.; Vestre, R.; Svihus, B.; Skrede, A. and Storebakken, T. (2006). Phytate degradation in a mixture of ground wheat and ground defatted soybeans during feed processing: effects of temperature, moisture level, and retention time in small- and medium-scale incubation systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (16): 5887-5893.

Deshpande, S.S. and Cheryan, M. (1984). Effects of phytic acid divalent cations, and interactions on alpha-amylase activity. Journal of Food Science, 49 (2): 516-519.

Erdman, J.W.J.R. (1979). Oilseed phytase: nutritional implication. Journal of American Oil Chemists Society, 56 (8): 736-741.

Esmaeilipour, O.; Van Krimpen, M.M.; Jongbloed, A.W.; De Jonge, L.H. and Bikker, P. (2012). Effects of temperature, pH, incubation time and pepsin concentration on the *in vitro* stability of intrinsic phytase of wheat, barley and rye. Animal Feed Science and Technology, 175 (3-4): 168-174.

Esmaeilipour, O.; Van Krimpen, M.M.; Jongbloed, A.W.; De Jonge, L.H. and Bikker, P. (2013). The effects of temperature, moisture, duration of incubation time, calcium level and soaking with water or citric acid on in vitro phytate degradation in a wheat–barley–rye–soybean meal-based diet. Animal Feed Science and Technology, 183(3): 168-174.

Francesch, M.; Geraert, P.A. (2009). Enzyme complex containing carbohydrases and phytase improves growth performance and bone mineralization of broilers fed reduced nutrient corn-soybean- based diets. Poultry Science, 88(9): 1915- 24.

Godoy, S.; Chicco, C.; Meschy, F. and Requena, F. (2005). Phytic phosphorus and phytase activity of animal feed ingredients. Interciencia, 30: 24-28.

Haug, W. and Lantzsch, H.J. (1983). Sensitive Method for the Rapid Determination of Phytate in Cereals and Cereal Products. Journal Science Food Agriculture, 34: 1423-1426.

Hesselman, K. and Aman, P. (1986). The effect of ß-glucanase on the utilization of starch and nitrogen by broiler chicks fed on barley of low or high viscosity. Animal Feed Science and Technology, 15 (2): 83-93.

Juanpere, J.; Perez-Vendrell, A.M.; Angulo, E. and Brufau, J. (2005). Assessment of potential interactions between phytase and glycosidase enzyme supplementation on nutrient digestibility in broilers. Journal of Poultry Science, 84 (4): 571-580.

Lu, H.; Adedokun, S.A.; Preynat, A.; Legrand-Defretin, V.; Geraert, P.A.; Adeola, O. and Ajuwon, K.M. (2013). Impact of exogenous carbohydrases and phytase on growth performance and nutrient digestibility in broilers. Canadian Journal of Animal Science, 93(2): 243-249.

McNab, J.M. and Boorman, K.N. (2002). Poultry Feedstuffs: Supply, Composition, and Nutritive Value.

Newkirk, R.W. and Classen, H.L. (1998). In vitro hydrolysis of phytate in canola meal with purified and crude sources of phytase. Animal feed science and technology, 72(3): 315-327.

Oberlease, D. (1973). Phytate: Toxicants occurring naturally in foods. National academy of science. Washington DC. Pp: 353-371.

Olukosi, O.A.; Cowieson, A.J. and Adeola, O. (2007). Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broiler. Journal of Poultry Science, 86 (1): 77-86.

Ravindran, V.; Carbahug, S.; Ravindran, G.; Selle, P.H. and Bryden, W.L. (2000). Respond of broiler chickens to microbial phytase supplementation as influenced by dietary phytic acid and non-phytate phosphorus levels. II. Effects on apparent metabolisable energy, nutrient digestibility and nutrient retention. British Poultry Science, 41 (2): 193-200.

Ravindran, V.; Morel, P.C.; Partridge, G.G.; Hruby, M. and Sands, J.S. (2006). Influence of an Escherichia coli-derived phytase on nutrient utilization in broiler starters fed diets containing varying concentrations of phytic acid. Journal of Poultry Science, 85 (1): 82-89.

Sell, P.H. and Ravindran, V. (2007). Microbial phytase in poultry nutrition. Animal Feed Science Technology, 135 (1-2): 1-41.

Simons, P.C.M.; Versteegh, H.A.J.; Jongbloed, A.W.; Kemme, P.A.; Slump, P.; Bos, K.D. et al. (1990). Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. British Journal of Nutrition, 64 (2): 525-540.

Slominski, B.A. (2011). Recent Advances in Enzymes for Poultry Diets. Poultry Science, 90 (9): 2013-2023.

Tahir, M.; Shim, M.Y.; Ward, N.E.; Smith, C.; Foster, E.; Guney, A.C. et al. (2012). Phytate and other nutrient components of feed ingredients for poultry. Journal of Poultry Science, 91 (4): 928-935.

Villamide, M.J.; Fuente, J.M.; Perez De Ayala, P. and Flores, A. (1997). Energy evaluation of eight barley cultivars for poultry: Effect of dietary enzyme addition. Poultry Science, 76: 834-840.

Effect of commercial enzymes, pH and temperature on phytate content of corn and soybean meal under *in vitro* condition

Modirsanei, M.[1]; Rahimi, Z.S.[2]; Mansoori, B.[1]; Rezaian, M.[1]; Farkhoy, M.[1] and Honarzad, J.[3]

Received: 14.02.2017 Accepted: 26.07.2017

Abstract

The objective of this study was to evaluate of pre-treating of feed ingredients (corn and soybean meal) with different factors on phytate content under *in vitro* condition. For this purpose three commercial enzymatic products (Bio-phytase, Rovabio Excel AP, and Rovabio Max AP) and three different solutions including distilled water, HCl 0.5% and HCl 1% (with levels of pH = 5.5, 2.12 and 1.88, respectively) were used. Each sample was first supplemented with the enzymatic products, and then pre-treated with the above mentioned solutions for 2 hours at at 25 and 40ºC, and phytate content was determined. Results indicated that addition of different solutions (at 25 and 40 for 2 hours) to corn samples mixed with Bio-phytase or Rovabio Max AP caused a significant reduction in the content of phytate. The best results were obtained when corn samples were treated with Rovabio Max AP and mixed with HCl 0.5% at 40 ºC, where phytate content decreased up to 98.5% in comparison with control. The same results were observed in soybean samples, where the highest reduction in phytate content (up to 55.4%) was found when they were mixed with Rovabio Max AP and then treated with HCl 0.5% solution at 25º C. According to results it could be concluded that adding HCl 0.5% to corn and soybean meal which were mixed with Rovabio Max AP (including phytase and NSPases enzymes) increased phosphorus bioavailability.

Key woard: Pre-treatment, Phytate, Bio-phytase, Rovabio Excel AP, Rovabio Max AP

1- Associate Professor, Department of Animal and Poultry Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- PhD Graduated of Animal Feed Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3- Expert, Department of Animal and Poultry Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
Corresponding Author: Rahimi, Z.S., E-mail: zsadat@ut.ac.ir