

Tối ưu hóa điều kiện lên men bán rắn khô dầu đậu nành nhằm nâng cao khả năng sinh protease của chủng *Bacillus subtilis* N6 bằng phương pháp đáp ứng bề mặt quy mô pilot

Phạm Huỳnh Ninh¹, Vũ Minh¹, Nguyễn Thị Hà¹,
Bùi Thị Hồng Chiên¹, Trần Quốc Tuấn^{2*}

¹Phân viện Chăn nuôi Nam Bộ

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 19/4/2019, ngày chuyển phân biện 26/4/2019; ngày nhận phân biện 29/5/2019; ngày chấp nhận đăng 4/6/2019

Tóm tắt:

Khô dầu đậu nành là nguồn cung cấp protein rất tốt cho vật nuôi do có hàm lượng các axit amin không thay thế cao. Tuy nhiên, khô dầu đậu nành lại chứa một số protein gây dị ứng như glycinin và β -conglycinin. Các loại protein này bền nhiệt, kháng các enzyme trong hệ tiêu hóa của vật nuôi, gây kích ứng miễn dịch ở động vật non, tăng nhu động ruột non, dẫn đến tăng tỷ lệ tiêu chảy ở heo con, giảm hấp thụ dinh dưỡng. Nghiên cứu này tập trung vào tối ưu hóa điều kiện lên men bán rắn khô dầu đậu nành sử dụng vi khuẩn *Bacillus subtilis* N6 nhằm nâng cao khả năng sản sinh protease, góp phần phân giải các loại protein gây dị ứng trong khô dầu đậu nành. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sản sinh protease của chủng vi khuẩn *B. subtilis* N6 được sàng lọc bằng thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman. Trong các điều kiện lên men khảo sát thì nhiệt độ, độ dày cơ chất và thời gian lên men là ba yếu tố tác động đáng kể nhất ($p < 0,05$). Thí nghiệm được thiết kế theo phương pháp đáp ứng bề mặt (response surface methodology - RSM). Kết quả cho thấy, điều kiện lên men thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp protease là: nhiệt độ 35°C, độ dày cơ chất lên men là 1 cm và thời gian lên men là 35 giờ. Sau lên men 35 giờ, hoạt tính protease lên đến 632 U/g, cao hơn trước khi tối ưu 1,65 lần (382 U/g).

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, đáp ứng bề mặt, khô dầu đậu nành, lên men bán rắn, tối ưu hóa.

Chỉ số phân loại: 4.2

Giới thiệu

Khô dầu đậu nành, sản phẩm của quá trình tách chiết dầu từ hạt đậu nành, là nguồn cung cấp protein rất tốt cho vật nuôi do có hàm lượng các axit amin không thay thế cao. Tuy nhiên, việc sử dụng khô dầu đậu nành trong khẩu phần thức ăn cho gia súc, gia cầm non có hệ tiêu hóa chưa hoàn thiện bị hạn chế, hiệu quả không cao do khô dầu đậu nành chứa một số protein gây dị ứng, làm tăng nhu động và sự bài tiết nước của ruột non, dẫn đến tăng tỷ lệ tiêu chảy ở heo con, giảm hấp thụ dinh dưỡng, giảm năng suất [1-4]. Hai protein gây dị ứng chủ yếu trong đậu nành là glycinin (globulin 11S) và β -conglycinin (globulin 7S), chiếm hơn 50% lượng protein trong hạt đậu nành [5]. Chúng có khả năng bền nhiệt và kháng hầu hết các enzyme trong hệ tiêu hóa do có liên kết disulfua khá bền [6].

Lên men bán rắn là phương pháp lên men trên cơ chất rắn và hầu như chứa rất ít hay không có nước tự do. Tuy nhiên, hàm lượng ẩm phải đủ để cung cấp môi trường thuận lợi cho sự trao đổi chất và phát triển của vi sinh vật. Gần đây, lên men bán rắn đã thu hút nhiều sự chú ý do chi phí

vận hành thấp và đơn giản hơn so với các phương pháp lên men khác [7]. Phương pháp lên men bán rắn nhằm loại bỏ các protein gây dị ứng trong khô dầu đậu nành đã được nghiên cứu và ứng dụng trong thực tiễn sản xuất trên thế giới nhằm sản xuất khô dầu đậu nành sử dụng trong chế biến thức ăn chăn nuôi [8-10]. Trong đó, phương pháp lên men sử dụng vi khuẩn *Bacillus* tỏ ra có nhiều lợi thế hơn so với các vi khuẩn khác, nấm men hay nấm mốc do sản phẩm khô dầu đậu nành sau lên men có lượng protein hòa tan cao hơn, khả năng phân giải các protein gây dị ứng tốt hơn và sinh trưởng nhanh hơn [11]. Tuy nhiên, hầu như không có bất kỳ nghiên cứu dạng này được công bố tại Việt Nam.

Phương pháp đáp ứng bề mặt giờ đây đã được sử dụng phổ biến để nghiên cứu tối ưu hóa các quy trình công nghệ sinh học hay quy trình sản xuất công nghiệp [12]. Tối ưu hóa quy trình lên men bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (response surface methodology - RSM) là cách tiếp cận hiệu quả hơn so với phương pháp nghiên cứu truyền thống khảo sát từng yếu tố (one-factor-at-a-time) [13]. Phương pháp RSM gồm các kỹ thuật toán học, thống kê để mô hình hóa

*Tác giả liên hệ: Email: trqtuan@hcmus.edu.vn

Optimisation of semi-solid-state fermentation conditions for soybean meal to improve protease production of *Bacillus subtilis* N6 by response surface methodology

Huynh Ninh Pham¹, Minh Vu¹, Thi Ha Nguyen¹,
Thi Hong Chien Bui¹, Quoc Tuan Tran^{2*}

¹Institute of Animal Husbandry in South Vietnam

²University of Sciences, National University of Ho Chi Minh City

Received 19 April 2019; accepted 4 June 2019

Abstract:

Soybean meal is a major protein source in the animal diet owing to its excellent amino acid components. However, soybean meal still contains some proteins (glycinin and β -conglycinin) that cause allergies for young animals. These proteins have the high heat-stable ability, digestive enzyme resistance, which leads to the increase in immunological responses, intestinal peristalsis, and diarrhea and the decrease in nutrition absorption. This research focuses on the optimisation of the semi-solid-state fermentation conditions to improve the protease production of *B. subtilis* N6 in the soybean meal medium. The factors that affected the protease production of *B. subtilis* N6 would be screened by the Plackett-Burman design. Out of five screened factors, three factors that have the great effects were temperature, substrate thickness, and fermentation time ($p < 0.05$). Optimisation experiment was designed by the response surface methodology. The results showed that, the optimised temperature, soybean thickness, and fermentation time were 35°C, 1 cm, and 35h, respectively. These optimum conditions resulted in the enhancement in protease yield to 632 U/g with 1.65 fold increase.

Keywords: *Bacillus subtilis*, optimisation, response surface methodology, semi-solid-state fermentation, soybean meal.

Classification number: 4.2

và phân tích các vấn đề (thiết kế, phát triển, tối ưu quy trình hay sản phẩm) [14]. Do được tích hợp các kỹ thuật hồi quy, ANOVA nên RSM làm giảm đáng kể số thí nghiệm phải tiến hành, từ đó làm giảm chi phí và thời gian nghiên cứu. Sử dụng RSM để thiết kế tối ưu bao gồm ba bước: sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng chính, xác định khoảng tối ưu của từng yếu tố, và ước lượng mô hình đáp ứng bằng thiết kế phức tạp như Box-Behnken (box-behnken design - BBD) nhằm xác định tổ hợp tối ưu giá trị của các yếu tố đầu vào.

Mục tiêu của nghiên cứu này là sử dụng mô hình Plackett-Burman (PB) để sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng tới hoạt tính protease của chủng *B. subtilis* N6, sau đó các điểm tối ưu của từng yếu tố mà tại đó hoạt tính protease đạt giá trị cao nhất được xác định bằng mô hình Box-Behnken nhằm phân giải tối đa các protein gây dị ứng, cải thiện chất lượng khô dầu đậu nành.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng *B. subtilis* N6 lấy từ bộ sưu tập của Bộ môn Sinh hóa - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh. Khô dầu đậu nành nhập khẩu từ Argentina do Công ty TNHH Việt Hưng cung cấp.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm của Phân viện Chăn nuôi Nam Bộ từ tháng 01 đến 12/2018.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định hoạt tính protease: dịch tăng sinh chủng *B. subtilis* trên môi trường cao thịt sau 24 giờ được cấy vào cơ chất khô dầu đậu nành ẩm độ 40% với tỷ lệ 3% và ủ ở 37°C. Khô dầu đậu nành sau khi lên men được lactic với dung dịch đệm Sorensen pH 7,6 (theo tỷ lệ 5 g khô dầu đậu nành lên men + 25 ml đệm Sorensen), ly tâm thu dịch nổi để xác định hoạt tính protease theo phương pháp Anson cải tiến [14]. Cụ thể, hút 5 ml dung dịch 0,65% casein vào ống nghiệm, thêm 1 ml dịch enzyme thu nhận, ủ ở 35,5°C. Sau 30 phút bổ sung 5 ml dung dịch trichloro acetic 10%. Lọc lấy 1 ml dịch, thêm vào 2 ml NaOH 0,5N và 0,6 ml thuốc thử Folin. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 660 nm. Dựa vào đường chuẩn hàm lượng tyrosin và độ hấp thụ quang để xác định lượng tyrosin sinh ra trong phản ứng. Một đơn vị hoạt độ protease được định nghĩa 1 μ g tyrosin được tạo ra trong 1 phút dưới tác dụng của 1 ml enzyme.

Điện di polyacrylamide: để đánh giá mức độ phân hủy các protein kháng dinh dưỡng, mẫu khô dầu đậu nành lên men được tách chiết protein và thực hiện điện di SDS-PAGE trên separating gel 12,5% polyacrylamide, gel stacking 4% polyacrylamide [15].

Định lượng glycinin và β -conglycinin: hàm lượng glycinin và β -conglycinin trong khô dầu đậu nành được

phân tích bằng phương pháp ELISA sử dụng bộ glycinin ELISA Kit và β-conglycinin ELISA Kit của Hãng Wuhan Unibiotest Co., Ltd, Trung Quốc.

Tối ưu hóa và thiết kế thí nghiệm: sàng lọc yếu tố thí nghiệm bằng thiết kế Plackett-Burman [13]: sau khi có được kết quả của các thí nghiệm đơn yếu tố để làm cơ sở chọn lựa khoảng biến thiên giá trị phù hợp cho từng yếu tố, bố trí thí nghiệm sàng lọc các yếu tố bằng thiết kế Plackett-Burman nhằm xác định được 3 trong 5 yếu tố có tác động lớn tới quá trình sản sinh protease khi lên men khô dầu đậu nành với *B. subtilis* N6.

Thiết kế Plackett-Burman cho phép đánh giá mức ảnh hưởng của các yếu tố đến sinh tổng hợp protease, mỗi yếu tố được kiểm tra ở hai cấp độ: mức thấp (-1) và mức cao (+1). Các yếu tố được chọn cho nghiên cứu này là nhiệt độ lên men, độ dày lên men, thời gian lên men, tỷ lệ giống, pH (bảng 1). Thiết kế ma trận Plackett-Burman được trình bày trong bảng 2. Kết quả nghiên cứu được phân tích bằng chương trình “Design Expert® 11.0” Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ.

Bảng 1. Các biến trong ma trận Plackett-Burman.

Yếu tố	Đơn vị	Ký hiệu	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
			Thấp (-1)	Cao (+1)	Ảnh hưởng	P value
Nhiệt độ lên men	°C	X1	30	50	-57,83 ^a	0,0048
Độ dày lên men	cm	X2	1	5	-136,83 ^a	<0,0001
Thời gian lên men	giờ	X3	24	72	-77,00 ^a	0,0012
Tỷ lệ giống	%	X4	1	5	-30,67 ^b	0,0606
pH	-	X5	6	9	-3,17 ^b	0,8197

^aCó ý nghĩa ở độ tin cậy p≤0,05; ^bKhông có ý nghĩa ở độ tin cậy p>0,05.

Bảng 2. Ma trận thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman.

Thí nghiệm	Các biến					Hoạt tính protease (U/g)	
	X1	X2	X3	X4	X5	Thực nghiệm	Mô hình
1	-1	1	1	-1	1	84	110,00
2	-1	-1	1	-1	1	398	383,67
3	-1	-1	-1	-1	-1	506	544,00
4	1	-1	1	1	-1	198	213,00
5	1	-1	-1	-1	1	437	422,00
6	1	1	1	-1	-1	70	0,67
7	-1	1	-1	1	1	234	202,67
8	1	-1	1	1	1	188	206,67
9	-1	1	1	1	-1	31	55,00
10	1	1	-1	-1	-1	120	154,67
11	1	1	-1	1	1	71	87,00
12	-1	-1	-1	1	-1	525	482,67

Tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt: 3 yếu tố chính từ kết quả sàng lọc sẽ được xác định giá trị tối ưu và được nghiên cứu ở 3 mức (-1, 0 và +1) (bảng 3) với 15 thí nghiệm, trong đó có 3 thí nghiệm trung tâm (bảng 4).

Bảng 3. Các yếu tố sử dụng trong Box-Behnken.

Yếu tố	Đơn vị	Ký hiệu	Mức		
			-1	0	1
Nhiệt độ lên men	°C	X1	30	40	50
Độ dày lên men	cm	X2	1	3	5
Thời gian lên men	giờ	X3	24	48	72

Hàm đáp ứng được chọn là hoạt tính protease (Y, U/g canh trường nuôi cấy). Mô hình hóa được biểu diễn bằng phương trình bậc 2: $Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2$.

Trong đó B₁, B₂, B₃ là các hệ số bậc 1; B₁₁, B₂₂ và B₃₃ là hệ số bậc 2; B₁₂, B₂₃ và B₁₃ là các hệ số tương tác của từng cặp yếu tố; X₁, X₂, X₃, X₁₁, X₂₂, X₃₃, X₁₂, X₂₃ và X₁₃ là các biến độc lập. Số liệu được phân tích bằng chương trình “Design Expert® 11.0” Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Hoa Kỳ. Từ kết quả phân tích xác định mức tối ưu của các yếu tố khảo sát cho hoạt tính protease cao nhất.

Bảng 4. Thiết kế Box-Behnken.

Thí nghiệm	Các biến			Hoạt tính protease (U/g)	
	X1	X2	X3	Thực hiện	Mô hình
1	-1	-1	0	508	517,38
2	0	1	-1	139	143,38
3	1	0	1	36	15,75
4	-1	0	1	108	103,00
5	1	0	-1	33	38,00
6	0	0	0	412	403,33
7	1	1	0	57	47,63
8	1	-1	0	132	156,62
9	0	-1	1	362	357,63
10	0	0	0	401	403,33
11	-1	1	0	32	7,38
12	0	-1	-1	620	590,38
13	0	1	1	156	185,63
14	-1	0	-1	251	271,25
15	0	0	0	397	403,33

Kết quả và thảo luận

Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt lực protease của *B. subtilis* N6

Tiến hành thí nghiệm theo ma trận Plackett-Burman với các yếu tố: nhiệt độ lên men, độ dày lên men, thời gian lên

men, tỷ lệ giống, pH cơ chất với hai mức thấp và cao. Phân tích kết quả bằng phần mềm Design expert 11 cho thấy có 3 yếu tố ảnh hưởng tới hoạt lực protease là nhiệt độ lên men, thời gian lên men và độ dày khối cơ chất lên men (p-value <0,05). Tuy nhiên, cả ba yếu tố đều ảnh hưởng âm. Thời gian và nhiệt độ lên men là các yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến việc sản sinh protease ở *Bacillus* [16, 17]. S. Mhamdi và cộng sự (2012) [18] cũng xác định thời gian là một trong những yếu tố ảnh hưởng tới hoạt tính protease do chủng *Bacillus* sp. sinh ra. Từ kết quả sàng lọc này, chúng tôi chọn các yếu tố nhiệt độ lên men, thời gian lên men và độ dày khối cơ chất lên men cho thiết kế thí nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken.

Tối ưu hóa giá trị các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính protease của *B. subtilis* N6

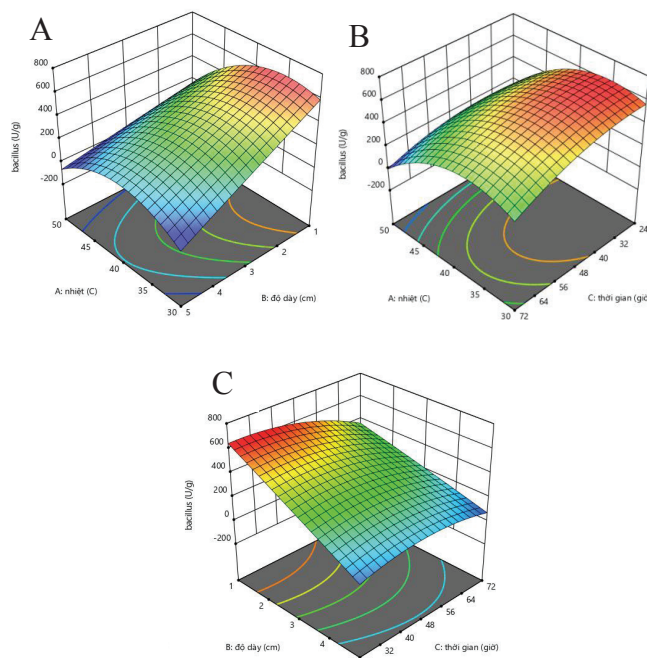
Sau khi xác định được 3 yếu tố ảnh hưởng tới khả năng sinh protease trong quá trình lên men khô dầu đậu nành bằng *B. subtilis* N6, bố trí thí nghiệm theo thiết kế BBD nhằm xác định giá trị tối ưu nhất của 3 yếu tố chính cho quá trình lên men. Trong ma trận thiết kế BBD mỗi yếu tố sẽ được đánh giá ở 3 mức (-1, 0 và +1). Các yếu tố đầu vào bao gồm X1: nhiệt độ lên men, X2: độ dày khối cơ chất lên men và X3: thời gian lên men. Ma trận thiết kế thí nghiệm gồm 12 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Quá trình lên men được thực hiện trong khay inox 1x0,5x0,15 m (dài x rộng x cao). Hàm mục tiêu là hoạt tính protease của *B. subtilis* N6 trong khối môi trường khô dầu đậu nành lên men.

Kết quả ANOVA (bảng 5) cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê (p=0,0004), hệ số hồi quy R²=0,9862>0,75 chứng tỏ mô hình tương thích với thực nghiệm. Giá trị R² dự đoán là 0,7802 phù hợp với R² điều chỉnh là 0,9615 (độ lệch 0,1813<0,2), tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu là 18,614>4 thể hiện tín hiệu đã đầy đủ.

Bảng 5. Kết quả ANOVA.

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương (sum of squares)	Bậc tự do (degree of freedom)	Trung bình phương sai (average of squares)	Chuẩn fisher (F - value)	Giá trị P (Probability value > F)
Mô hình	514600	9	57182,67	68,52	0,0001
X ₁	51360,13	1	51360,13	61,54	0,0005
X ₂	191600	1	191600	299,55	<0,0001
X ₃	18145,13	1	18145,13	21,74	0,0055
X ₁ X ₂	40200,25	1	40200,25	48,17	0,0010
X ₁ X ₃	5329,00	1	5329,00	6,39	0,0527
X ₂ X ₃	18906,25	1	18906,25	22,65	0,0051
X ₁ ²	173300	1	173300	207,69	<0,0001
X ₂ ²	72,03	1	72,03	0,0863	0,7807
X ₃ ²	23434,26	1	23434,26	28,08	0,0032
Sai số	4172,92	5			
Tổng	518800	14			

R²=0,9920; CV=11,89%; R² điều chỉnh=0,9775; R² dự đoán=0,8745.



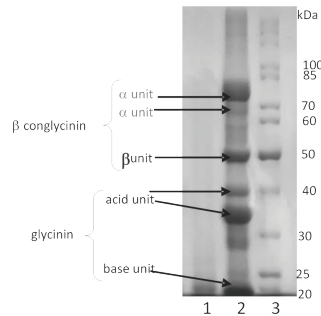
Hình 1. Mặt đáp ứng hoạt tính protease theo hai yếu tố: A. Nhiệt độ lên men (X1) - Độ dày cơ chất lên men (X2) với thời gian lên men là 30 giờ; B. Nhiệt độ lên men (X1) - Thời gian lên men (X3) với độ dày cơ chất lên men 1 cm; C. Độ dày cơ chất lên men (X2) - Thời gian lên men (X3) với nhiệt độ lên men 35°C.

Từ những kết quả trên ta nhận được phương trình hồi quy hoạt tính protease (U/g) = 403,33 – 80,13X₁ – 154,75X₂ – 47,63X₃ + 100,25X₁X₂ + 36,50X₁X₃ – 216,67X₁² – 79,67X₃²

Với ba đồ thị không gian ba chiều có trục Z là hoạt tính protease và lần lượt 2 biến độc lập trong 3 yếu tố khảo sát (hình 1) có thể thấy hoạt tính protease đạt cực đại khi độ dày khối cơ chất lên men ở mức thấp nhất. Hoạt tính protease cũng đạt mức cao khi nhiệt độ nằm trong vùng từ 30-40°C, thời gian lên men từ 24-48 giờ. Với các dữ liệu thu được và phương trình hồi quy, mức tối ưu của các yếu tố khảo sát được xác định lần lượt là: nhiệt độ 35°C, độ dày cơ chất lên men 1 cm, thời gian lên men là 30 giờ. Mô hình thí nghiệm dự đoán lượng protease tối ưu đạt được là 644,71 U/g. Thí nghiệm kiểm chứng các giá trị tối ưu của 3 yếu tố khảo sát cho kết quả hoạt tính protease thu được là 632 U/g.

Mức độ phân giải các protein gây dị ứng trong khô dầu đậu nành sau lên men cũng đã được kiểm chứng thông qua kết quả chạy SDS-PAGE và phân tích bằng bộ ELISA kit của mẫu khô đậu nành lên men với mức tối ưu của 3 yếu tố khảo sát (hình 2). Sau khi lên men không còn thấy vạch của các tiểu phân hai protein gây dị ứng là glycinin và β-conglycinin trong kết quả chạy SDS-PAGE, các protein có trọng lượng phân tử lớn đã bị phân giải gần hết, chỉ còn lại các protein ở mức 20 kDa. Trong khi đó, kết quả định lượng glycinin và β-conglycinin trong khô dầu đậu nành sau khi

lên men cho thấy 94,94% glycinin và 97,33% β -conglycinin đã được phân giải trong quá trình lên men (bảng 6). Điều này cho thấy quá trình lên men đã phân giải các protein gây dị ứng, nâng cao giá trị dinh dưỡng của khô đậu nành sử dụng trong thức ăn chăn nuôi.



Hình 2. Kết quả chạy SDS-PAGE với 3 mức tối ưu của 3 yếu tố khảo sát (giếng 1: thang protein chuẩn, giếng 2: mẫu khô đậu nành chưa lên men, giếng 3: mẫu khô đậu nành lên men bán rắn với *B. Subtilis* N6).

Bảng 6. Kết quả định lượng glycinin và β -conglycinin sau khi lên men.

Protein gây dị ứng	Khô đậu nành chưa lên men	Khô đậu nành lên men với <i>B. subtilis</i> N6
Glycinin (mg/g)	87,33	4,42
β -conglycinin (mg/g)	121,56	3,25

Kết luận

Nghiên cứu đã tìm ra được các thông số tối ưu hóa khả năng sản sinh protease của *Bacillus subtilis* N6 trong quá trình lên men bán rắn khô đậu nành áp dụng phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken. Hoạt tính protease tối đa đạt được là 632 U/g khi lên men ở 35°C, độ dày cơ chất lên men 1 cm và thời gian lên men là 30 giờ. Điều kiện lên men này đã phân giải 94,94% glycinin và 97,33% β -conglycinin gây dị ứng trong khô đậu nành.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất khô đậu nành lên men bán rắn sử dụng trong chăn nuôi” do Sở KH&CN TP Hồ Chí Minh quản lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Y. Zhao, G.X. Qin, Z.W. Sun, B. Zhang, T. Wang (2010), “Effects of glycinin and β -conglycinin on enterocyte apoptosis, proliferation and migration of piglets”, *Food and Agricultural Immunology*, **21**(3), pp.209-218.
 [2] Y. Zhao, G. Qin, Z. Sun, X. Zhang, N. Bao, T. Wang, L. Sun (2008), “Disappearance of immunoreactive glycinin and β -conglycinin

in the digestive tract of piglets”, *Archives of Animal Nutrition*, **62**(4), pp.322-330.

[3] P. Sun, D. Li, B. Dong, S. Qiao, X. Ma (2008), “Effects of soybean glycinin on performance and immune function in early weaned pigs”, *Archives of Animal Nutrition*, **62**(4), pp.313-321.

[4] Y. Hao, Z. Zhan, P. Guo, X. Piao, D. Li (2009), “Soybean β -conglycinin-induced gut hypersensitivity reaction in a piglet model”, *Archives of Animal Nutrition*, **63**(3), pp.188-202.

[5] M. Samoto, M. Maebuchi, C. Miyazaki, H. Kugitani, M. Kohno, M. Hirotsuka, M. Kito (2007), “Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate”, *Food Chemistry*, **102**, pp.317-322.

[6] B.J. Kuipers, A.C. Alting, H. Gruppen (2007), “Comparison of the aggregation behavior of soy and bovine whey protein hydrolysates”, *Biotechnology Advances*, **25**(6), pp.606-610.

[7] S. Bhargav, B.P. Panda, M. Ali, S. Javed (2008), “Solid-state fermentation: an overview”, *Chem. Biochem. Eng.*, **22**(1), pp.49-70.

[8] J. Feng, J. Liu, Z.R. Xu, Y.P. Lu, Y.Y. Liu (2007), “The effect of *Aspergillus oryzae* fermented soybean meal on growth performance, digestibility of dietary components and activities of intestinal enzymes in weaned piglets”, *Anim. Feed. Sci. Tech.*, **134**(3), pp.295-303.

[9] J. Hu, W. Lu, C. Wang, R. Zhu, J. Qiao (2008), “Characteristics of solid-state fermented feed and its effects on performance and nutrient digestibility in growing-finishing pigs”, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, **21**(11), pp.1635-1641.

[10] C. Shi, Y. Zhang, Z. Lu, Y. Wang (2017), “Solid-state fermentation of corn-soybean meal mixed feed with *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* for degrading antinutritional factors and enhancing nutritional value”, *J. Anim. Sci. Biotech.*, **8**, p.50.

[11] R. Mukherjee, R. Chakraborty, A. Dutta (2016), “Role offermentation in improving nutritional quality of soybean meal”, *Asian - Australas. J. Anim. Sci.*, **29**(11), pp.1523-1529.

[12] Q.K. Beg, V. Sahai, R. Gupta (2003), “Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor”, *Process Biochem.*, **39**, pp.203-209.

[13] R.L. Plackett, J.P. Burman (1946), “The design of optimum multifactorial experiments”, *Biometrika.*, **33**, pp.305-325.

[14] M.L. Anson (1938), “The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin”, *J. Gen. Physiol.*, **22**, pp.79-89.

[15] A.I. Khuri, S. Mukhopadhyay (2010), “Response surface methodology”, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, **2**(2), pp.128-149.

[16] U.K. Laemmli (1970), “Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, **227**, pp.680-685.

[17] D.J.M. Kumar, R. Rakshitha, M.A. Vidhya, P.S. Jenifer, S. Prasad, M.R. Kumar, P.T. Kalaichelvan (2014), “Production, optimization and characterization of fibrinolytic enzyme by *Bacillus subtilis* RJAS19”, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **17**(4), pp.529-534.

[18] S. Mhamdi, H. Anissa, H.M. Ibtissem, F. Fakher, N. Moncef, S.K. Alya (2014), “Optimization of protease production by *Bacillus mojavensis* A21 on Chickpea and Faba Bean”, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **5**, pp.1049-1060.