

## Study of whey powder and determine the ruminal degradability of protein by the nylon bags method

## مطالعه پروتئین‌های پودر آب پنیر و تعیین تجزیه پذیری شکمبه‌ای آن به روش کیسه‌های نایلونی

Teymour Tanha\*

Assistant Professor, Department of Animal Science,  
Payame-Noor University, Tehran, Iran  
(Received: Feb. 11, 2017 - Accepted: Jul. 02, 2019)

تیمور تنها\*

استادیار گروه کشاورزی (علوم دامی)، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران  
(تاریخ ارسال: ۱۳۹۵/۱۱/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۱)

### Abstract

This experiment was conducted to study three types of Ruminal degradability of protein whey powder brands with product Shyzzr GlosHAD Mashhad Food Industries (WP1), whey powder brand Nasr Dalia (WP2) and whey powder product Khorasan Pegah (WP3) with 2 Holstein male calves with Ruminal fistula. First, The chemical properties include: moisture, ash, fat, lactose and protein were measured. Later, using Tris buffer samples were extracted proteins and the extracted proteins were determined electrophoresis. For nylon bag technique, the amounts of 5 gram of whey powder samples were placed inside the bag. Incubation times were: 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 and 72 hours. Gel electrophoresis showed that the major protein in whey powder consisted of  $\beta$ -lactoglobulin, lactalbumin, bovine serum albumin and immunoglobulin. These proteins are respectively 50, 20, 10 and 10 percent of total whey proteins in powder form nylon bag. Results showed that at 0, 2, 4 and 48 hours incubation, WP1 and WP2 and 72 hours incubation, WP2 highest amount of protein degradability ( $p < 0.05$ ). At the same time, results also showed that WP1 the highest of soluble protein amount and WP2 highest of protein effective degradability in rumen ( $p < 0.05$ ). It is also, WP1 and WP2 samples had the highest rate of degradability in 0.20 per hour ( $p < 0.05$ ). This study showed the highest effective Ruminal degradability of protein whey powder samples related to WP2, WP1, respectively.

**Keywords:** Degradability rate E, electrophoresis, in situ, protein, whey dried.

### چکیده

آزمایشی به منظور بررسی تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین سه نوع پودر آب پنیر با نام‌های تجاری شیدزر محصول شرکت صنایع غذایی گلشاد مشهد (WP1)، پودر آب پنیر با نام تجاری نصر دالیا (WP2) و پودر آب پنیر محصول شرکت پگاه خراسان (WP3) با دو راس گوساله نر هلشتاین دارای فیستولای شکمبه‌ای انجام شد. ابتدا ویژگی‌های شیمیایی نمونه‌ها شامل: رطوبت، خاکسترخام، چربی، لاکتوز و پروتئین خام اندازه‌گیری شدند. بعداً با استفاده از بافر تریس اقدام به استخراج پروتئین‌های نمونه‌ها شد. سپس با روش الکتروفورز پروتئین‌های استخراجی تعیین شدند. برای تکنیک کیسه‌های نایلونی، مقدار پنج گرم از نمونه‌های پودر آب پنیر در داخل کیسه‌ها قرار داده شد. زمان‌های انکوباسیون صفر، دو، چهار، هشت، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بود. ژل الکتروفور نشان داد که پروتئین‌های عمده پودر آب پنیر عبارت بودند از:  $\beta$ -لاکتوگلوبولین،  $\alpha$ -لاکتالبومین، سرم آلبومین گاوی و ایمونوگلوبولین. این پروتئین‌ها به ترتیب ۵۰، ۲۰، ۱۰ و ۱۰ درصد از کل پروتئین‌های موجود در پودر آب پنیر را تشکیل می‌دهند. نتایج کیسه‌های نایلونی نشان داد که در زمان‌های صفر، دو، چهار، هشت و ۴۸ ساعت انکوباسیون، نمونه WP1 و WP2 و در زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون، نمونه WP2 دارای بیشترین مقدار تجزیه‌پذیری پروتئین بودند ( $p < 0.05$ ). هم‌چنین WP1 دارای بیشترین مقدار پروتئین محلول و نمونه WP2 دارای بیشترین پروتئین قابل تجزیه در شکمبه بود ( $p < 0.05$ ). علاوه بر این نمونه‌های WP1 و WP2 دارای بیشترین نرخ تجزیه در ۰/۲۰ در ساعت بودند ( $p < 0.05$ ). این آزمایش نشان داد که بالاترین میزان تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای مؤثر پروتئین پودر آب پنیر به ترتیب مربوط به نمونه‌های WP1، WP2 بودند.

**واژه‌های کلیدی:** آب پنیر خشک‌شده، الکتروفورز، تکنیک حیوان آزمایشگاه، پروتئین، نرخ تجزیه.

## مقدمه

داد. این محققان اظهار داشتند که در طیور به واسطه نبود آنزیم لاکتاز در روده، لاکتوز جذب نشده، بلکه تخمیر گردیده و به اسید لاکتیک و اسیدهای چرب فرار تبدیل می‌شود که ممکن است کلونی‌سازی لاکتوباسیل‌ها را در روده تحریک کند. علاوه بر این، بالا رفتن غلظت اسیدهای چرب باعث کاهش pH روده کور شده که این امر سبب کاهش رشد باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود و این خود در افزایش وزن جوجه‌ها مؤثر خواهد بود. پیشنهاد شده است که استفاده از پودر آب پنیر سبب افزایش رشد میکروویلی‌های روده در جوجه‌های گوشتی شد که این موضوع سبب افزایش سطح جذب مواد مغذی شده و استفاده مؤثر از مواد مغذی را افزایش می‌دهد (Mehri *et al.*, 2004) گزارشی هم وجود دارد که اضافه کردن پودر آب پنیر به جیره غذایی، میزان ماده خشک مصرفی در گاوهای شیری را افزایش داد (Schingoethe *et al.*, 1976). هم‌چنین نشان داده‌اند که پودر آب پنیر، ترشح کیموزین و لخته شدن شیر در قسمت شیردان را کاهش داده و به این ترتیب سرعت جریان مواد مغذی از شیردان افزایش می‌یابد. حضور کازئین در شیر خشک فاقد چربی موجب پیشرفت فرآیند لخته شدن در شیردان و کاهش انتقال مواد مغذی از شیردان می‌شود و به این ترتیب قابلیت هضم جایگزین‌های شیر در جیره غذایی تغییر می‌یابد (Susmel *et al.*, 1995). بنابراین، هرچند تاکنون تحقیق مستقلی در رابطه با بررسی فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پودر آب پنیر انجام نگرفته است، ولی از پودر آب پنیر به‌عنوان ماده افزودنی به رژیم غذایی دام استفاده شده است. بنابراین با توجه به اهمیت آب پنیر در تغذیه دام، هدف کلی از انجام پژوهش حاضر، مطالعه و شناخت کلی از ارزش تغذیه‌ای آب پنیر خشک شده در ایران با روش الکتروفورز است.

## مواد و روش‌ها

در این آزمایش از دو راس گوساله نر هلستاین با

آب پنیر به‌عنوان یکی از فرآورده‌های جانبی فرآوری شیر، مایع بی‌رنگی است که پس از تهیه پنیر به‌دست می‌آید. سالیانه حدود ۲ میلیون تن آب پنیر در کشور تولید می‌شود که مقدار ماده خشک آن حدود ۱۵۰ هزار تن است. با توجه به این نکته که در کشور کارخانجات معدودی اقدام به فرآوری آب پنیر می‌کنند لذا سالیانه مقادیر زیادی آب پنیر به هدر می‌رود که علاوه بر ایجاد مشکلات زیست‌محیطی، سبب هدر رفتن ماده‌ای با ارزش غذایی بالا می‌شود که به راحتی می‌توان از آن در جیره دام و طیور استفاده نمود. آب پنیر تازه، pH ای معادل ۵/۸-۶/۹ دارد و ماده خشک آن حدود ۷/۵ درصد است که ۰/۶ آن را پروتئین تشکیل می‌دهد. ۴۰ تا ۹۰٪ ویتامین‌های محلول در آب شیر وارد آب پنیر می‌شود، مقدار ریوفلاوین و اسید پانتوتینیک آن نیز قابل توجه است، ضمن این‌که نسبتاً از نظر لیزین و ترئونین غنی ولی از نظر اسیدهای آمینه گوگردی و گلیسین فقیر می‌باشد. آب پنیر حاوی ۱۱٪ پروتئین خام، ۱۹۰۰ کیلو کالری در کیلوگرم انرژی متابولیسمی و ۶۵٪ لاکتوز است. رایج‌ترین روش استفاده از آب پنیر، خشک کردن آن به‌صورت پودر آب پنیر، پودر آب پنیر و آب پنیر به‌صورت مایع غلیظ شده می‌باشد که نه تنها در تغذیه دام و انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد، بلکه در تهیه بسیاری از مواد مانند لاکتوز، اسیدلاکتیک و محیط کشت نیز کاربرد دارد. در صنایع نانوائی، شیرینی و بیسکویت‌سازی، نوشابه‌سازی، مرباسازی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از روش‌های تغلیظ آب پنیر استفاده از اولترافیلتراسیون می‌باشد، که از یکسو پروتئین‌های بسیار با ارزش را برای تغذیه جدا نموده و از سوی دیگر پروتئین‌ها با ارزش کمتر را برای تغذیه نشخوارکنندگان فراهم می‌سازد (Anderson *et al.*, 1985) گزارش کرده‌اند مصرف چهار درصد پودر آب پنیر در جوجه‌های گوشتی، به‌طور معنی‌داری اضافه وزن و ضریب تبدیل را نسبت به گروه شاهد بهبود

این آزمون از اندازه‌گیری ازت به روش تیتراسیون بعد از تقطیر استفاده شد.

### الکتروفورز

#### استخراج پروتئین از پودر آب پنیر

بافر استخراج از تریس ۰/۰۳+ مولار+ مرکاپتواتانول ۰/۰۱ مولار با pH ۸، تهیه شد. سپس مقدار یک گرم از هر پودر هر یک از نمونه‌ها را در فالكون ریخته و مقدار ۲۵ میلی‌لیتر محلول استخراج به آن اضافه گردید. جهت ادغام بهتر بافر استخراج، هر نمونه به مدت یک دقیقه ورتکس شد. سپس نمونه‌ها با دور ۱۱۰۰۰، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل Z23HK، آلمان) گردیده و عصاره از قسمت بالای فالكون‌ها جداسازی شد. پس از آن مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره با مقدار ۵۰ میکرولیتر بافر استخراج نمونه SDS-PAGE<sup>۱</sup> حاوی ۰/۵ مولار تریس-اسیدکلریدریک<sup>۲</sup> (pH ۶/۸)، ۱۰ درصد سدیم دودسیل سولفات<sup>۳</sup>، ۲/۵ درصد بتامرکاپتواتانول<sup>۴</sup>، ۷ درصد گلیسرول<sup>۵</sup> و ۴ میلی‌گرم بروموفنل بلو<sup>۶</sup> درون لوله اپندرف<sup>۷</sup> مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه هم زدن بر روی همزن مخصوص لوله اپندرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، پروتئین نمونه‌ها استخراج و پس از قرار دادن در آب ۹۵ درجه به مدت ۳ دقیقه و سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه، مایع صاف شده بالایی جدا گردید. مایع بالایی که حاوی پروتئین دناتوره بود به لوله‌های اپندرف منتقل و تا زمان انجام الکتروفورز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

متوسط وزن زنده  $40 \pm 25$  کیلوگرم که دارای فیستولای شکمبه‌ای بودند، استفاده شد. هر یک از گوساله‌ها به صورت انفرادی در داخل باکس‌های ویژه نگهداری و در طول مدت آزمایش با جیره‌های حاوی ۸۵ درصد علوفه، ۱۵ درصد کنسانتره، مکمل مواد معدنی، کربنات کلسیم و مکمل ویتامین به مقدار هفت کیلوگرم ماده خشک در روز به صورت جیره کاملاً مخلوط در دو نوبت صبح در ساعات هشت و ۱۶ دو هفته قبل و طی دوره آزمایش تغذیه می‌شدند. حیوانات آزادانه به آب و بلوک‌های لیسیدنی نمک و مواد معدنی دسترسی داشتند. سه نوع شامل، پودر آب پنیر با نام تجاری شیر محصول شرکت صنایع غذایی گلشاد مشهد (WP1)، پودر آب پنیر با نام تجاری نصر دالیا (WP2) و پودر آب پنیر محصول شرکت پگاه خراسان (WP3) در پژوهش حاضر مورد استفاده قرار گرفت.

در مرحله نخست ویژگی‌های شیمیایی نمونه‌های پودر آب پنیر مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری رطوبت نمونه‌های پودر آب پنیر، مقدار دو گرم از نمونه‌های مورد مطالعه را در داخل کروزه‌ای که قبلاً وزن خشک آن با ترازوی دقیق (AND مدل GR200 کشور ژاپن) معین شده بود ریخته و سپس کروزه‌های حاوی نمونه را برای از دست دادن رطوبت آن در داخل آون (Memmert مدل UNB40 کشور آلمان)، در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای اندازه‌گیری خاکستر خام، با سوزاندن نمونه‌ها در کوره الکتریکی (Carbolit مدل ELF 11/6B کشور انگلیس) به مدت شش ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد و درصد ماده آلی نمونه‌ها از اختلاف ماده خشک با خاکستر خام محاسبه گردید (AOAC, 1990). برای اندازه‌گیری چربی از روش استخراج با حلال و دستگاه سوکسله مدل Gerhardt ساخت آلمان استفاده گردید. پروتئین خام با استفاده از روش کلدال و دستگاه نیمه اتوماتیک کجلدال Buchi مدل B-322 B-342 کشور سوئیس تعیین شد. در

1. SDS-PAGE sample buffer

2. Tris-HCl

3. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

4. B-mercaptoethanol

5. Glycerol

6. Bromophenol blue

7. Ependorf tube

ساعت رنگبری<sup>۶</sup> تا روشن شدن زمینه ژل ادامه یافت. پس از چند بار شست‌وشو با آب دو بار تقطیر با اسکنر معمولی و دوربین تصویربرداری شد.

**مارکر پروتئینی و تعیین وزن مولکولی زیر واحدها**  
از مارکر پروتئینی Fermentas برای تعیین وزن مولکولی زیر واحدهای پودر آب پنیر مورد مطالعه استفاده شد. برای تعیین وزن مولکولی آنزیم، از مارکر پروتئینی و براساس حرکت پروتئین‌ها در طول ژل از شاخص Rf استفاده شد. برای این کار ابتدا ژل را روی سطح شیشه‌ای تمیز قرار داده، سپس طول آن از چاهک تا خط آبی پایین ژل با خطکش اندازه گرفته، سپس فاصله هر یک از باندهای مربوط به مارکر پروتئینی نیز از ابتدای ژل اندازه‌گیری شد. سپس، مقدار Rf (نسبت فاصله باند پروتئین تا چاهک به فاصله جبهه حلال از چاهک، منظور از جبهه حلال جایی که در انتها ژل تا آن نقطه جریان یافته است) محاسبه شد (Rickwood *et al.*, 1990).

**برآورد تجزیه پذیری به روش کیسه های نایلونی**  
برای این روش از کیسه‌های نایلونی از جنس داکرون (الیاف پلی‌استر مصنوعی)<sup>۷</sup> که در شکمبه قرار می‌گرفتند، استفاده شد. کیسه‌ها دارای سوراخ‌هایی به قطر ۴۵ میکرومتر بوده به گونه‌ای که میکروارگانسیم‌ها می‌توانستند وارد آن شده و گاز حاصله از آن خارج می‌شد. ابعاد کیسه‌ها ۱۰×۵ سانتی‌متر بود، البته در نمونه‌های کمتر (از نظر مقدار) کیسه‌های کوچک‌تری می‌تواند مورد استفاده قرارگیرد. مقدار ۵ گرم از نمونه‌های پودر آب پنیر در داخل کیسه‌ها قرار داده شد و درب کیسه‌ها به وسیله چسب مسدود گردید. زمان‌های انکوباسیون صفر، دو، چهار، هشت، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بود. برای هر تیمار در هر ساعت ۴

### تهیه SDS-PAGE

برای تهیه SDS-PAGE از ژل ۱۲/۵ درصد اکریل‌امید استفاده شد. این ژل شامل دو قسمت تفکیک‌کننده و ردیف‌کننده است. قسمت تفکیک‌کننده شامل ۳/۱۲۵ میلی‌لیتر محلول A (۲۹:۱) آکریل‌امید به بیس آکریل‌امید، ۰/۹۴ میلی‌لیتر محلول B (بافر ۳ مولار تریس اسید کلریدیک با pH ۸/۷)، ۲/۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر، ۷۵ میکرولیتر SDS، ۳/۵ میکرولیتر TEMED<sup>۱</sup> و ۰/۳۸ میکرولیتر APS<sup>۲</sup> و ژل ردیف‌کننده شامل ۲/۵ میلی‌لیتر محلول A، ۵ میلی‌لیتر محلول D (بافر ۰/۵ مولار تریس اسید کلریدیک با pH ۶/۵)، ۱۱/۳ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر APS، ۲۰۰ میکرولیتر SDS و ۱۲ میکرولیتر TEMED بود. ابتدا ژل تفکیک‌کننده ریخته و پس از ۴۰ دقیقه که ژل بست، ژل ردیف‌کننده تزریق شد و شانه ژل درون آن قرار گرفت. پس از حدود ۴۰ دقیقه که ژل به‌طور کامل بست شانه ژل خارج و شیشه حاوی ژل به تانک الکتروفورز منتقل شد. بافر تانک (شامل تریس، گلیسین با pH ۸/۳) تهیه و درون تانک ریخته شد.

در نهایت نمونه‌ها به داخل چاهک‌های تزریق شد. ابعاد ژل ۱۴۰ × ۱۱۰ × ۱ میلی‌متر و زمان الکتروفورز ۳ ساعت (تا رسیدن رنگ بروموفنل بلو به لبه پائینی ژل) و شدت جریان ۳۰ میلی‌آمپر و دستگاه PROTEIN II xi SLABGEL (شرکت BIO-RAD) بود. پس از بیرون آوردن ژل از شیشه‌های الکتروفورز با محلول حاوی ۰/۰۶۲۵ گرم رنگ کماسی بریلینت بلو<sup>۳</sup>، ۷ درصد اسید استیک گلیسیال<sup>۴</sup> و ۲۰ درصد متانول به مدت ۱۲ ساعت رنگ‌آمیزی<sup>۵</sup> و سپس با محلول حاوی ۷ درصد اسید استیک گلیسیال و ۵ درصد متانول به مدت ۱۲

1. Tetramethylethylenediamine
2. Ammonium Per Sulfate
3. Commasie Brilliant Blue
4. Glycyl Acetic Acid
5. Staining

6. Destaining

7. Synthetic Polyester Fiber

با این توضیح که در ابتدا ضرایب تجزیه‌پذیری (از قبیل a, b, c و غیره) با نرم‌افزار Neway به‌دست‌آمده، سپس داده‌های نهایی حاصل‌شده با نرم‌افزار SAS تجزیه گردیدند. ضمناً برای رسم نمودارهای استاندارد ترکیبات شیمیایی نمونه‌ها و سایر نمودارهای لازم از برنامه Excel استفاده گردید.

### نتایج و بحث

#### ترکیبات شیمیایی نمونه‌های آب پنیر

میانگین مواد مغذی اندازه‌گیری‌شده در نمونه‌های آب پنیر مورد آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است. مقادیر pH نمونه‌ها در محدوده ۶/۲-۵/۸، مقدار رطوبت در محدوده ۷-۵/۵ درصد، مقدار پروتئین در محدوده ۱۱/۸-۱۱/۳ درصد، مقدار چربی ۰/۸-۰/۵ درصد، مقدار خاکستر ۱۰/۲-۹/۸ درصد، مقدار لاکتوز ۷۰/۲-۶۷/۴ درصد قرار دارند.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی نمونه‌های پودر آب پنیر

نمونه	pH	رطوبت (%)	پروتئین کل (%)	لاکتوز (%)	چربی (%)	خاکستر (%)
WP1	۶/۱	۷/۰	۱۱/۵	۶۷/۴	۰/۶	۱۰/۱
WP2	۵/۸	۶/۴	۱۱/۸	۶۹/۳	۰/۸	۹/۸
WP3	۶/۲	۵/۵	۱۱/۳	۷۰/۲	۰/۵	۱۰/۲

WP1: شیدر، WP2: نصر دالیا، WP3: پگاه خراسان

#### تعیین پروتئین‌های پودر آب پنیر به کمک ژل الکتروفورز

پودر آب پنیر حاوی ۲۰-۱۸ درصد از کل پروتئین‌های موجود در شیر می‌باشد. این پروتئین‌ها شامل چهار گروه اصلی هستند:  $\beta$ -لاکتوگلوبولین ( $\beta$ -Lg)،  $\alpha$ -لاکتالبومین ( $\alpha$ -La)، سرم آلبومین گاوی (BSA) و ایمونوگلوبولین (Ig). این پروتئین‌ها به ترتیب ۵۰، ۲۰، ۱۰ و ۱۰ درصد از کل پروتئین‌های موجود در پودر آب پنیر را تشکیل می‌دهند. علاوه بر پروتئین‌های اصلی، آب پنیر حاوی تعدادی از پروتئین‌های کم مقدار مانند پروتئوزپتون‌ها (PP)، ویتامین‌های باندشده با

تکرار تهیه شد، به طوری که درون شکمبه هر گوساله دو کیسه قرار داده شد، به این صورت که قبل از قرار دادن کیسه‌ها درون شکمبه حیوانات، کیسه‌ها در داخل کیسه‌ای از جنس پلی‌استر با قطر منافذ سه میلی‌متر قرار داده شدند به طوری که مایع شکمبه به راحتی می‌توانست وارد کیسه شود. و برای راحتی کار، کیسه بزرگ از چندین قسمت گره زده شد سپس کیسه بزرگ که حاوی کیسه‌های نایلونی بود به وسیله نخ پلاستیکی گره زده شده و با استفاده از لوله لاستیکی به طول ۳۰ سانتی‌متر در داخل شکمبه شناور شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، کیسه‌ها از طریق درب کانولا خارج شده سپس جهت شست‌وشو در معرض جریان آب سرد قرار گرفتند تا زمانی که اعمال تخمیر متوقف شده آب خارج‌شده کاملاً شفاف شود (در رابطه با زمان صفر، انکوباسیون صورت نگرفت)، زمان صفر تجزیه‌پذیری فقط با شستن نمونه‌ها در مجاورت آب اندازه‌گیری گردید (Petit et al., 1992). در مرحله شست‌وشو نبایستی ذرات چسبیده به قسمت خارجی وارد کیسه شده و همچنین محتویات داخل کیسه‌ها تحت فشار قرار نگیرد زیرا محتویات هضم نشده داخل کیسه‌ها از داخل روزنه‌های دیواره کیسه خارج می‌شوند. جهت تبخیر آب کیسه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در درجه ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس به منظور تعیین درصد ماده خشک آن، مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در داخل آن قرار داده شدند. میزان ناپدید شدن مواد مغذی و فراسنجه‌های هضمی با استفاده از معادله ارسکوف و مکدونالد محاسبه شد (Orskov et al., 1979).

#### محاسبات و تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست‌آمده از ترکیبات شیمیایی با طرح کاملاً تصادفی با استفاده از برنامه آماری SAS 9.4 تجزیه و تحلیل شدند و آزمون دانکن برای مقایسه میانگین در سطح ۵ درصد استفاده شد. مدل طرح تجزیه‌پذیری از رابطه ۱ استفاده گردید:

$$Y = a + b (1 - e^{-ct}) \quad (1)$$

چندین باند با حرکت آهسته مربوط به سرم آلبومین گاوی با وزن مولکولی ۶۶ کیلو دالتون و ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشد. سرعت حرکت مولکول‌ها در ژل الکتروفورز نه تنها تحت تأثیر بار الکتریکی و شدت میدان الکتریکی است، بلکه عواملی نظیر اندازه، وزن مولکولی و شکل فضایی مولکول نیز در این امر دخیل هستند (Goetz & Koehler, 2005).

### تجزیه‌پذیری پروتئین نمونه‌های مورد مطالعه

نتایج حاصل از تجزیه داده‌های تجزیه‌پذیری پروتئین نمونه‌های مورد مطالعه در زمان‌های انکوباسیون در جدول ۲ آمده است. ناپدید شدن پروتئین از کیسه‌های انکویت شده در شکمبه، با افزایش زمان انکوباسیون افزایش یافت. میزان تجزیه‌پذیری پروتئین خام نمونه‌های مختلف در زمان‌های انکوباسیون تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشته‌اند. نشان داده‌اند که ناپدید شدن ماده خشک طی زمان‌های انکوباسیون همبستگی مثبتی با پروتئین خام دارد.

### اندازه‌گیری درصد فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین پودر آب پنیر

بهترین ملاک ارزشیابی پروتئین مواد خوراکی در تغذیه نشخوارکنندگان، اندازه‌گیری مقدار تجزیه‌پذیری پروتئین حقیقی در شکمبه است. عوامل متعددی تجزیه‌پذیری پروتئین مواد خوراکی را تحت تأثیر قرار می‌دهند.

پروتئین‌ها، لاکتوفورین و حدود ۶۰٪ *indigenous* می‌باشد (Jovanovic et al., 2007). ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات- پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE) به‌عنوان روشی کارآمد برای بررسی پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس جداسازی در این روش، تفاوت در وزن مولکولی و بارالکتریکی و ساختمان پروتئین‌های مختلف می‌باشد.

ژل الکتروفورز پودر آب پنیر تعداد ۴ باند اصلی را نشان می‌دهد که مشخص‌کننده  $\beta$ -لاکتوگلوبولین A و B،  $\alpha$ -لاکتالبومین و سرم آلبومین گاوی می‌باشد. همچنین مقادیر اندکی از ایمونوگلوبولین‌ها و پروتئوز پپتون‌ها در پودر آب پنیر وجود دارد. ساختار و شدت باند به شدت تحت تأثیر دمای خشک‌کردن می‌باشد. در نتیجه افزایش دمای خشک‌کردن باند الکتروفورز نازک‌تر می‌شود که دلیل آن واسرشت پروتئین‌ها و تجمع سایر ترکیبات جانبی می‌باشد. ترکیبات با وزن مولکولی بالا که در نتیجه حرارت‌دهی تشکیل می‌شوند، قادر به عبور از ژل الکتروفورز و به این ترتیب شدت باند کاهش یافته و باند ناپدید می‌گردد. واسرشت شدن آلفا لاکتالبومین در مقایسه با سایر پروتئین‌ها، به‌شدت قابل برگشت می‌باشد و بنابراین نسبت به بتالاکتوگلوبولین مقاوم‌تر به حرارت است (Bramaud et al., 1997). نمونه‌های پودر آب پنیر دارای دو باند با حرکت سریع شامل بتا لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و آلفا لاکتالبومین (۱۴ کیلودالتون) و

جدول ۲. میانگین تجزیه‌پذیری پروتئین نمونه‌ها در ساعات مختلف انکوباسیون شکمبه‌ای (درصد)

نمونه	مدت انکوباسیون (ساعت)						
	۰	۲	۴	۸	۱۶	۲۴	۴۸
WP1	۲۳/۳۱ <sup>a</sup>	۳۱/۸۱ <sup>a</sup>	۴۱/۱۳ <sup>a</sup>	۵۲/۲۷	۷۲/۶۳ <sup>b</sup>	۸۲/۱۷ <sup>b</sup>	۹۳/۲۳ <sup>a</sup>
WP2	۲۱/۶۳ <sup>b</sup>	۲۶/۷۰ <sup>b</sup>	۳۵/۸۷ <sup>b</sup>	۵۰/۴۲	۷۴/۹۱ <sup>a</sup>	۸۴/۱۱ <sup>a</sup>	۹۳/۶۱ <sup>a</sup>
WP3	۲۰/۳۳ <sup>b</sup>	۲۸/۱۳ <sup>b</sup>	۳۶/۱۹ <sup>b</sup>	۴۹/۶۸	۷۱/۰۸ <sup>b</sup>	۸۱/۵۴ <sup>b</sup>	۹۰/۴۶ <sup>b</sup>
SEM	۰/۴۹	۰/۸۱	۱/۰۴	۰/۵۸	۰/۶۴	۰/۴۵	۱/۱۴
P Value	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۲۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱

SEM: خطای استاندارد میانگین

a و b: حروف غیر هم‌نام در هر ستون دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ( $p < 0.05$ ) می‌باشد.

ناپدید شدن بالقوه قسمت قابل تجزیه در ساعت و t مدت زمان توقف غذا در شکم می‌باشد. محلولیت پروتئین میزان تجزیه‌پذیری آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. پروتئین‌های محلول ممکن است با سرعت یا به کندی تجزیه شوند. پروتئین‌های غیرمحلول نیز با سرعت‌های متغیر و خاصی تجزیه می‌شوند. هم‌چنین تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام پودر آب پنیر برای نرخ‌های عبور مختلف خروج از شکم نشان داده شده است، که با افزایش نرخ خروج مواد از شکم، درصد تجزیه‌پذیری پروتئین خام کاهش می‌یابد. از بین خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین، حلالیت پروتئین در شکم از مهمترین عوامل مؤثر بر تجزیه آن در شکم می‌باشد. از آنجاکه میکروارگانیسم‌های شکم و آنزیم‌های آنها بایستی در تماس مستقیم با پروتئین‌ها قرار بگیرند تا بتوانند آنها را تجزیه نمایند، معمولاً پروتئین‌های محلول که بیشتر در دسترس میکروب‌ها و آنزیم‌های آنها قرار می‌گیرند، بیشتر و سریع‌تر از پروتئین‌های نامحلول در شکم تجزیه می‌شوند.

میزان حلالیت پروتئین‌ها در شکم تا اندازه زیادی به نسبت آلبومین و گلوبولین (هر دو محلول) و پرولامین و گولتین (هر دو نامحلول در مایع شکم) در آنها بستگی دارد. برای مثال در پروتئین‌های کروی، عدم وجود گروه کربوکسیل یا آمینی انتهایی، مانع از تجزیه شدن آنها به وسیله اگزوپپتیدازهای میکروبی می‌گردد. مصرف جیره با پروتئین بیشتر به افزایش جذب آمونیاک از شکم منجر می‌شود. این آمونیاک باید به وسیله کبد مسمومیت‌زدایی و به اوره تبدیل شود که خود قسمت قابل توجهی از کل مقدار اوره تولید شده در بدن را تشکیل می‌دهد. بنابراین مقداری پروتئین غیرقابل تجزیه در شکم باید به جیره افزوده شود تا تفاوت بین اسیدهای آمینه مورد نیاز دام‌های پر تولید و مقدار تأمین شده به وسیله پروتئین میکروبی را جبران نماید. منابع مختلف اظهار داشته‌اند که حدود ۸۰-۷۵ درصد از پروتئین‌های موجود در رژیم غذایی نشخوارکنندگان پرمحصول، قابل تجزیه در شکم را دارند (Nowa et al., 2005).

مقدار و نوع زیرواحدهای پروتئین‌های مواد خوراکی، ترکیب اسیدهای آمینه زیرواحدها و نوع ساختمان پروتئین از جمله این عوامل هستند. در سیستم‌های جدید تنظیم جیره نشخوارکنندگان، جهت تخمین سنتر پروتئین و تجزیه آن در شکم، فراسنجه‌های پیچیده‌ای وارد محاسبات و مدل‌ها شده است. به کارگیری موفقیت‌آمیز این سیستم‌ها به منظور تعادل بین سنتر پروتئین میکروبی و پروتئین عبوری از شکم و در نتیجه کاهش دفع نیتروژن از بدن، مستلزم کسب اطلاعات دقیق از روند تجزیه‌پذیری پروتئین مواد خوراکی در شکم است (Nowa et al., 2005).

روش کیسه‌های نایلونی پیش‌بینی نسبتاً خوبی از مصرف و هضم خوراک را فراهم می‌سازد و اطلاعات خوبی در زمینه مورد استفاده قرار گرفتن نیتروژن برای نشخوارکنندگان و میکروارگانیسم‌های آن ارائه می‌دهد. در روش کیسه‌های نایلونی مراحل هضمی در داخل شکم دام زنده صورت می‌گیرد. آن قسمت از پروتئین جیره که تحت تأثیر میکروارگانیسم‌های شکم قرار می‌گیرد و تجزیه می‌شود، پروتئین قابل تجزیه در شکم گفته می‌شود. میزان تجزیه‌پذیری مواد خوراکی در شکم اثرات شدیدی روی فرآورده‌های نهایی تخمیر و توان تولیدی حیوان می‌گذارد. اگر چه پروتئین عبوری ممکن است از نقطه نظر میزان تجمع آمونیاک در شکم مفید باشد، ولی کاهش پروتئین تجزیه شده در شکم ممکن است سبب کاهش بازده سنتر پروتئین میکروبی گردد. باکتری‌های شکم قادر به استفاده از آمونیاک به عنوان منبع ازت برای سنتر پروتئین میکروبی هستند، ولی تخمیر پروتئین در شکم، اغلب آمونیاک بیشتری را نسبت به آنچه که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند مورد استفاده قرار دهند، تولید می‌نمایند. در بسیاری از موارد، بیش از ۲۵ درصد پروتئین جیره غذایی به صورت آمونیاک از دست می‌رود (Tolera et al., 1997).

در جدول ۳، a، بخش پروتئین محلول است همین خاطر سریعاً تجزیه می‌گردد. b، قسمتی از پروتئین است که به کندی تجزیه می‌شود. c، سرعت

جدول ۳. درصد فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین پودر آب پنیر

نمونه	درصد فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری			تجزیه‌پذیری مؤثر		
	بخش تجزیه‌پذیر سریع (درصد)	بخش تجزیه‌پذیر آهسته (درصد)	پتانسیل تجزیه‌پذیری (درصد)	نرخ تجزیه‌پذیری (درصد در ساعت)	نرخ عبور (نرخ عبور در ساعت)	نرخ عبور (نرخ عبور در ساعت)
WP1	۲۳/۳۴ <sup>a</sup>	۷۳/۸۳ <sup>c</sup>	۹۷/۱۶ <sup>ab</sup>	۰/۰۶۷	۸۰/۱۹ <sup>a</sup>	۶۵/۶۱
WP2	۱۸/۴۸ <sup>b</sup>	۷۹/۹۱ <sup>a</sup>	۹۸/۳۹ <sup>a</sup>	۰/۰۶۸	۸۰/۲۳ <sup>a</sup>	۶۴/۵۳
WP3	۱۸/۹۰ <sup>b</sup>	۷۷/۰۳ <sup>b</sup>	۹۶/۹۵ <sup>b</sup>	۰/۰۶۹	۷۸/۶۱ <sup>b</sup>	۶۳/۵۶
SEM	۱/۱۴۰	۱/۲۴	۳/۱۴	۰/۰۱۹	۰/۰۱	۰/۰۱۴
P Value	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۱۵	۰/۰۱	۰/۳۳

SEM: خطای استاندارد میانگین

a و b: حروف غیر هم‌نام در هر ستون دارای اختلاف معنی‌داری در سطح (p &lt; ۰/۰۵) می‌باشد.

شکمبه مصون مانده و به قسمت‌های پایین‌تر از شکمبه یعنی جایی که باید در آنجا مورد هضم و جذب قرار گیرد وارد می‌شود. حیوانات نشخوارکننده با تولید بالا جهت تأمین اسیدهای آمینه ضروری مورد نیاز خود علاوه بر پروتئین خام میکروبی به پروتئین عبوری جیره غذایی وابسته هستند. اسیدهای آمینه با منشأ میکروبی در صورتی نیاز حیوان را بر طرف می‌سازند که حیوان در حالت نگهداری و یا دارای حداقل میزان رشد باشد. در صورتی که جهت حداکثر میزان رشد و یا تولید بالا، این نیاز بایستی از طریق پروتئین موجود در جیره غذایی که از تجزیه شدن در شکمبه مصون مانده (پروتئین عبوری) و وارد روده کوچک می‌شود، تأمین گردد (Sampelayo et al., 1999). استفاده از منابع خوراکی دامی با تجزیه‌پذیری پروتئین کم در شکمبه، موجب افزایش عملکرد دام‌های در حال رشد می‌شود. پروتئین عبوری بر روی میزان عبور سایر مواد مغذی در شکمبه، حرکات دستگاه گوارش، قابلیت هضم و غلظت انسولین در خون مؤثر است. پروتئین حیوانی با سرعت کمتری در شکمبه تجزیه شده و مقادیر قابل توجهی از آن بدون آن که در شکمبه تجزیه شود به روده باریک وارد می‌شود. دام‌های با تولید بالا اگر به میزان کافی پروتئین غیر قابل تجزیه در شکمبه دریافت کنند بازده بهتری خواهند داشت در صورتی که حیوانات با تولید

ولی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیش از ۹۶ درصد از پروتئین پودر آب پنیر به‌طور بالقوه تجزیه‌پذیر می‌باشد. نشان داده‌اند که رژیم‌های غذایی که حاوی مقادیر بالایی از کربوهیدرات قابل تخمیر در دسترس می‌باشند، موجب تخمیر شدید شده و تولید میزان زیادی اسیدهای چرب فرار می‌کنند که سبب افزایش تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین خواهد شد (Aldrich et al., 1993).

نتایج تحقیقی نشان داد که توان تجزیه‌پذیری بالقوه پروتئین پودر آب پنیر در حدود ۹۷ درصد می‌باشد در حالی که این مقدار برای پودر شیر خشک و کازئین ۹۵ درصد است. همچنین میزان انرژی خالص پودر آب پنیر نیز بیشتر می‌باشد (Alaviuhkola et al., 1985). افزودن پودر آب پنیر به رژیم یونجه و ذرت موجب افزایش تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین گردید. پیشنهاد کرده‌اند که با افزودن پودر آب پنیر، تجزیه‌پذیری پروتئین افزایش می‌یابد. میزان تجزیه ماده خشک و مواد آلی در رژیم حاوی پودر آب پنیر سه برابر بیش از نمونه فاقد پودر آب پنیر بوده است. با وجود تجزیه مقدار زیادی از لاکتوز موجود در پودر آب پنیر، لاکتوز باقیمانده موجب ایجاد اسهال در دام گردید (Susmel et al., 1995).

پروتئین عبوری، قسمتی از پروتئین موجود در غذاست که از هضم توسط میکروارگانیسم‌های



هم‌چنین مقادیر اندکی از ایمونوگلوبولین‌ها و پروتئوز پپتون‌ها در پودر آب پنیر وجود دارد. نمونه WP3 که دارای ۷۰/۲ درصد لاکتوز می‌باشد، در همه ساعت‌های انکوباسیون، درصد تجزیه‌پذیری ماده خشک بیشتر از دو نمونه دیگر می‌باشد.

متوسط با زیاد خوردن این پروتئین بازده بهتری نخواهند داشت. نتیجه‌گیری کلی این‌که، ژل الکتروفورز پودر آب پنیر تعداد چهار باند اصلی را نشان می‌دهد که مشخص‌کننده  $\beta$ -لاکتوگلوبولین A و B،  $\alpha$ -لاکتالبومین و سرم آلبومین گاوی می‌باشد.

## REFERENCES

- Alaviuhkola, T.; Harju, M.; (1985). Utilization of Whey Protein Concentrate and Hydrolysed Whey by Growing Pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica*. 35(2): 213-216.
- Aldrich, J. M.; Muller, L. D.; Varga, G. A.; Griel, L. C.; (1993). Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen fermentation, nutrient flow, and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 76(4): 1091-1105.
- Anderson, M. J.; (1975). Metabolism of liquid whey fed to sheep. *Journal of Dairy Science*. 58(12): 1856-1859.
- AOAC.; (1990). Official Methods of Analysis. 15th edn. Association of Official Analytical Chemists Arlington, U.S.A.
- Bramaud, C.; Aimar, P.; Daufin, G.; (1997). Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of  $\alpha$ -lactalbumin under gentle heat treatment. *Biotechnology and Bioengineering*. 56(4): 391-397.
- Goetz, J.; Koehler, P.; (2005). Study of the thermal denaturation of selected proteins of whey and egg by low resolution NMR. *LWT-Food Science and Technology*. 38(5): 501-512.
- Jovanovic, S.; Barac, M.; Macej, O.; Vucic, T.; Lacnjevac, C.; (2007) SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. *Sensors*. 7(3): 371-383.
- Mehri, M.; Zare Shahne, A.; Samie, A.; (2004). The Effects of Supplementation of Whey Powder on Broiler Performance. *Iranian Journal of Agricultural Science*. 35(4).
- Nowa, W.; Michalak, S.; Wylegala, S.; (2005). In situ evaluation of ruminal degradability and intestinal digestibility of extruded soybeans. *Czech Journal of Animal Science*. 50: 281-287.
- Orskov, E. R.; McDonald, I.; (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*. 92(02): 499-503.
- Petit, H. V.; Tremblay, G. F.; (1992). In situ degradability of fresh grass and grass conserved under different harvesting methods. *Journal of Dairy Science*. 75:774-781.
- Rickwood, D.H.; (1990). Gel electrophoresis of nucleic acids a practical approach. (No. 574.8732 G4).
- Sampelayo, M.S.; Pérez, M.L.; Extremera, F. G.; Boza, J.J.; Boza, J.; (1999). Use of different dietary protein sources for lactating goats: milk production and composition as functions of protein degradability and amino acid composition. *Journal of Dairy Science*. 82(3): 555-565.
- Schingoethe, D.J.; (1976). Whey Utilization in Animal Feeding: A Summary and Evaluation 1, 2. *Journal of Dairy Science*. 59(3): 556-570.
- Susmel, P.; Spanghero, M.; Mills, C.R.; Stefanon, B.; (1995). Rumen fermentation characteristics and digestibility of cattle diets containing different whey: maize ratios. *Animal Feed Science and Technology*. 53(1): 81-89.
- Tolera, A.; Khazaal, K.; Orskov, E.R.; (1997). Nutritive evaluation of some browse species. *Animal Feed Science and Technology*. 67: 181-195.