شماره ۷۰، بهار ۱۳۸۵

در امور دام و آبزیان

مطالعه روند تجزیه‌پذیری پروتئین کنجاله منداب فرآیند نشده و تف داده شده در شکمبه گاو با روش کیسه‌های نایلونی و الکتروفورز ژل پلی آکریلامید

• **علی‌اصغر صادقی**، استادیار واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی
• **علی نیکخواه**، استاد، دانشگاه تهران
• **پروین شورنگ**، دانشجوی دوره دکتری دانشگاه تهران
• **محمد مرادی شهر بابک**، دانشیار دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۸۳

Email: drsadeghi@sr.iau.ac.ir

چکیده

به منظور مطالعه روند تجزیه پذیری ماده خشک، پروتئین خام و تعیین نوع پروتئین قابل تجزیه کنجاله منداب فرآیند نشده و تف داده شده، آزمایشی با تلفیق روش کیسه‌های نایلونی و تکنیک الکتروفورز ژل پلی آکریلامید(SDS-PAGE) انجام شد. با استفاده از روش کیسه‌های نایلونی، مقدار ۵ گرم نمونه کنجاله منداب (فرآیند نشده و تف داده شده) به مدت صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در شکمبهٔ سه رأس گاو نر اخته بالغ سیستانی فیستوله دار انکوباسیون شد. پس از انکوباسیون و شستشوی کیسه‌ها، مواد باقی مانده منجمد و با فریز درایر(خشک برودتی) خشک شد. ماده خشک، پروتئین خام، الگوی زیرواحدهای پروتئین‌های کنجاله منداب و دنسیتومتری پروتئین‌ها تعیین شد. تفاوت معنی دار بین فراسنجه‌های مختلف تجزیه پذیری و تجزیه پذیری موثر ماده خشک و پروتئین خام کنجاله منداب فرآیند نشده و تف داده مشاهده شد($p<0/05$). تجزیه پذیری موثر پروتئین خام کنجاله منداب فرآیند نشده و تف داده شده در سرعت عبور ۵ درصد در ساعت به ترتیب ۶۵/۱۸ و ۵۱/۳۶ درصد بود. دو نوع پروتئین عمده در کنجاله منداب شامل آلبومین $2S$ (ناپین) با دو زیرواحد به وزن مولکولی ۸/۵ و ۱۰/۸ کیلودالتون و گلوبولین $11S$ (کروسیفرین) با چهار زیرواحد به وزن مولکولی ۳۲/۰، ۲۶/۸، ۲۱/۱ و ۲۰/۵ کیلودالتون مشاهده شد که به ترتیب ۱۸/۸ و ۵۲/۹ درصد از کل پروتئین کنجاله منداب را شامل شدند. زیر واحدهای ناپین کنجاله منداب فرآیند نشده در زمان صفر دیده نشد. این پروتئین در زمان صفر انکوباسیون کنجاله فرآیند شده دیده شد و پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون تجزیه شد. تجزیه پذیری کروسیفرین کمتر از ناپین بود، به طوری که چهار زیرواحد این پروتئین در کنجاله فرآیند نشده و فرآیند شده پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در شکمبه به طورکامل تجزیه نشد. قابلیت هضم پروتئین خام کنجاله منداب فرآیند نشده در زمان صفر، ۸، ۱۲ و ۴۸ انکوباسیون به ترتیب ۶۵/۳۲، ۷۳/۲۸، ۷۳/۵۰ و ۷۵/۳۰ درصد و برای کنجاله تف داده شده به ترتیب ۶۶/۲۸، ۷۱/۳۸، ۷۳/۱۲ و ۷۵/۵۰ درصد بود.

کلمات کلیدی: کنجاله منداب، فرآیند تف دادن، تجزیه پذیری پروتئین، روش کیسه‌های نایلونی، الکتروفورز

Archive of SID
Pajouhesh & Sazandegi
www.SID.ir

Pajouhesh & Sazandegi No 70 pp: 65-72

Protein degradation kinetics of untreated and roasted rapeseed meal by using nylon bags and SDS-PAGE techniques

By:A. A. Sadeghi; Department of Animal Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
A. Nikkhah, P. Shawrang, M. Moradi Shahrebabak: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj., Iran.

This study was carried out to determine rapeseed meal dry matter (DM) and crude protein (CP) degradation characteristics by using nylon bags and SDS-PAGE techniques. There were significant differences ($p<0.05$) between the effective rumen degradability values of untreated and roasted rapeseed meal CP at different rumen outflow rates. The rumen degradability of untreoted and treated rapeseed meal DM and CP at ruminal outflow rate of 0.05/h were 83.3 and 71.4 % for DM, 82.7 and 68.3% for CP, respectively. From the slab gel analysis, rapeseed meal proteins were composed of two major components napin and cruciferin, accounting for approximately 18.8 and 52.9 percent of the total meal protein, respectively. Both proteins were multisubunits. The molecular weights of 32.0, 26.8, 21.1, 20.5 KDa for cruciferin subunits and 8.5, 10.8 KDa for napin subunits were observed in this trial. Electrophoretic and densitometric analysis of untreated rapeseed meal protein residues revealed that napin subunits were degraded completely within 2 h, whereas the four subunits of cruciferin were not degraded after 48 h incubation. In roasted rapeseed meal, napin subunits were resistant untill 12 h incubation. The four subunits of cruciferin were more resistant to degradation. There were significant differences ($p<0.05$) between crude protein digestibility of untreated and roasted rapeseed meal. Crude protein digestibility of untreated rapeseed meal at 0, 8, 12 and 24 h incubation were 65.32, 73.28, 73.50, 75.30 percent and for roasted rapeseed meal were 66.28, 71.38, 73.12, 75.50 percent. In conclusion, SDS-PAGE indicated that four subunits of cruciferin when untreated rapeseed protein, wheareas two subunits of napin and four subunits of cruciferin when roasted rapeseed protein are fed to ruminants, make the bulk of escaped protein. v

Keywords: Rapeseed Meal, Roasting process, Protein degradation, in situ and Electrophoresis.

مقدمه

در چند سال اخیر، تولید دانه و کنجاله منداب اصلاح شده[1] در ایران افزایش یافته است. با توجه به این که کنجاله منداب به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه نشخوارکنندگان استفاده می‌شود، کسب اطلاعات در مورد روند تجزیه پذیری پروتئین آن در شکمبه از اهمیت زیادی برخوردار است. بنابر گزارش محققان مختلف(۲، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۶، ۱۹، ۲۸)، پروتئین کنجاله منداب کانادائی[2] به مقدار زیادی در شکمبه تجزیه می‌شود. عوامل متعددی تجزیه پذیری پروتئین مواد خوراکی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. مقدار و نوع زیرواحدهای پروتئین‌های مواد خوراکی، ترکیب اسیدهای آمینه زیرواحدها و نوع ساختمان پروتئین از جمله این عوامل می‌باشند. بنابراین ارزشیابی پروتئین مواد خوراکی معمول در تغذیه نشخوارکنندگان ازجمله کنجاله منداب به منظور تخمین و تأمین مقدار و نسبت اسیدهای آمینه جذب شده در روده کوچک از منشاء میکربی و پروتئین عبوری ضروری است(۲۳).

روش‌های مختلفی برای کاهش تجزیه پذیری پروتئین خام کنجاله منداب ارائه شده است که می‌توان به فرآیندهای حرارتی(۱۶، ۱۹، ۲۱، ۲۲) و فرآیندهای شیمیائی(۷، ۱۳، ۱۴، ۲۸) اشاره کرد. بنابر گزارش انجمن تحقیقات ملی(۲۳) رایج ترین فرآیند کنجاله دانه‌های روغنی، فرآیند تف دادن[3] است. تاکنون در مورد فراسنجه‌های مختلف تجزیه پذیری و تجزیه پذیری موثر کنجاله منداب اصلاح شده تولید داخل به صورت فرآیند نشده و تف داده شده گزارشی منتشر نشده است. همچنین اطلاعات محدودی درباره الگوی زیرواحدهای پروتئین‌های کنجاله منداب، نوع پروتئین قابل تجزیه و قابلیت هضم پروتئین عبوری(پروتئین باقی مانده در کیسه‌ها) کنجاله منداب فرآیند نشده و تف داده شده در ساعات مختلف انکوباسیون وجود دارد. تکنیک SDS-PAGE[4] و دنسیتومتری[5]، امکان مطالعه نوع پروتئین موجود در مواد خوراکی، تعداد زیرواحدهای هر پروتئین و وزن مولکولی هر زیرواحد را فراهم می‌کند. روش کیسه‌های نایلونی نیز با رعایت استانداردهای توصیه شده(۱۰، ۲۷)، به عنوان روش معمول در تعیین تجزیه پذیری پروتئین خام استفاده می‌شود. با تلفیق این دو تکنیک می‌توان تجزیه پذیری پروتئین حقیقی و یا زیرواحدهای هر پروتئین را به منظور تعیین نوع پروتئین عبوری مواد خوراکی با دقت مورد ارزیابی قرار داد.

اهداف مطالعه حاضر، تعیین روند تجزیه پذیری ماده خشک، پروتئین خام و تعیین نوع پروتئین قابل تجزیه(در شکمبه) کنجاله منداب اصلاح شده تولید داخل به صورت فرآیند نشده و تف داده شده و اندازه‌گیری قابلیت هضم پروتئین عبوری در ساعات صفر، ۸، ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون به روش آزمایشگاهی(*in vitro*) بود.

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش‌ها

مشخصات و روش تعیین ترکیبات کنجاله منداب

در این مطالعه از کنجاله منداب اصلاح شده تولید داخل استفاده شد. کنجاله حاوی ۲۵ درصد رطوبت در آون با دمای ۱۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه فرآیند شد. تعیین ترکیبات شیمیائی نمونه خشک شده کنجاله منداب پس از آسیاب کردن با آسیاب دارای الک با قطر منافذ ۱ میلی متر صورت گرفت. چربی خام، پروتئین خام و خاکستر به روشAOAC (۱) وNDF به روش Van soest (۲۹) بدون استفاده از سولفیت سدیم، استون و آنزیم آلفا آمیلاز اندازه گیری شد.

حیوانات مورد استفاده و جیره غذائی

آزمایش‌های مربوط به مطالعه تجزیه پذیری پروتئین خام با سه رأس گاو نر اخته بالغ سیستانی(با متوسط وزن زنده ۱۶± ۴۵۶ کیلوگرم) مجهز به فیستولای شکمبه انجام شد. حیوانات با جیره حاوی ۸۵ درصد علوفه (یونجه خشک) و ۱۵ درصد کنسانتره(ذرت ۲۵٪، جو ۴۶/۷٪، کنجاله تخم پنبه ۱۱/۳٪، کنجاله سویا ۵٪، کنجاله منداب ۱۰٪، کربنات کلسیم ۱٪، مکمل مواد معدنی ۰/۵٪ و مکمل ویتامین ۰/۵٪) به مقدار ۶ کیلوگرم ماده خشک در روز به صورت جیره کاملاً مخلوط در دو نوبت صبح و عصر در ساعات ۸ و ۱۶ دو هفته قبل و در طی دوره آزمایش تغذیه می‌شدند. حیوانات آزادانه به آب و بلوک‌های لیسیدنی نمک و مواد معدنی دسترسی داشتند.

روش کیسه‌های نایلونی(*in situ*)

به منظور جلوگیری از اختلال در استخراج پروتئین و انجام الکتروفورز، با استفاده از اتر پترولیوم روغن باقی مانده در کنجاله به طور کامل خارج گردید. با استفاده از روش کیسه‌های نایلونی(*in situ*)، مقدار ۵ گرم نمونه کنجاله منداب فرآیند نشده و فرآیند شده بدون روغن (اندازه ذرات ۲ میلی متر) به مدت صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دو تکرار(دو کیسه) برای هر زمان در هر گاو انکوباسیون گردید. کیسه‌های مورد استفاده از جنس پلی استر[۶] و در ابعاد ۱۰×۵ سانتی‌متر با قطر منافذ ۴۵ میکرومتر مطابق استاندارد توصیه شده توسط Huelplund و Weisbjerg (۱۰) بود. پس از انکوباسیون، کیسه‌های حاوی نمونه از شکمبه خارج و پس از شستشو با آب سرد به مدت نیم ساعت، تا زمان انتقال به فریز درایر (خشک برودتی) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روش استخراج پروتئین

برای استخراج پروتئین جهت انجام الکتروفورز مقداری از کنجاله منداب بدون روغن(اندازه ذرات ۰/۱ میلی متر) که حاوی ۱ میلی گرم نیتروژن بود(تقریباً ۱۵ میلی گرم ماده خشک کنجاله منداب) به درون لوله‌های اپندرف منتقل شد. ۷۵۰ میکرولیتر بافر استخراج نمونه[۷] SDS-PAGE حاوی ۰/۶۲۵ مولار تریس- اسیدکلریدریک[۸] (pH=۶/۸)، ۱۰ درصد سدیم دودسیل سولفات[۹]، ۲/۵ درصد بتامرکاپتواتانول[۱۰]، ۷ درصد گلیسرول و ۴ میلی گرم بروموفنل بلو[۱۱] اضافه شد. پس از ۱۵ 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 سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه، مایع صاف شده بالائی جدا شد. مایع بالائی به لوله‌های اپندرف منتقل و تا زمان انجام الکتروفورز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۹، ۱۵).

الکتروفورز

الکتروفورز پروتئین‌ها با استفاده از تکنیک SDS-PAGE به روش لاملی(۱۵) انجام شد. ۲۵ میکرولیتر از مایع بالائی(حاوی تقریباً ۵۰ میکروگرم پروتئین) نمونه‌های انکوباسیون نشده و انکوباسیون شده در شکمبه در ساعات مختلف به چاهک‌های الکتروفورز با ژل بالائی حاوی ۳/۷۵ درصد آکریلامید-بیس آکریلامید و ژل پائینی حاوی ۱۴ درصد آکریلامید-بیس آکریلامید منتقل شد.

ابعاد ژل ۱۴۰ × ۱۱۰ × ۱ میلی متر و زمان الکتروفورز ۳ ساعت(تا رسیدن رنگ بروموفنل بلو به لبه پائینی ژل) و شدت جریان ۳۰ میلی آمپر و دستگاه PROTEIN Π xi SLABGEL (شرکت BIO-RAD) بود. پس از بیرون آوردن ژل از شیشه‌های الکتروفورز با محلول حاوی ۰/۰۶۲۵ گرم رنگ کماسی بریلینت بلو[۱۲]، ۷ درصد اسید استیک گلیسیال و ۲۰ درصد متانول به مدت ۱۲ ساعت رنگ آمیزی و سپس با محلول حاوی ۷ درصد اسید استیک گلیسیال و ۵ درصد متانول به مدت ۱۲ ساعت رنگبری شد. پس از چندبار شستشو با آب دوبار تقطیر در طول موج ۵۸۰ نانومتر دنسیتومتر و با اسکنر معمولی و دوربین تصویربرداری شد(۹).

مارکر پروتئینی و تعیین وزن مولکولی زیرواحدها

از مارکر پروتئینی Fermentas با مشخصات پروتئینی بتاگالاکتوزیداز(۱۱۶ کیلودالتون)، آلبومین سرم گاوی(۶۶/۲ کیلودالتون)، اُلبومین(۴۵ کیلودالتون)، لاکتات دهیدروژناز(۳۵ کیلودالتون)، آندونوکلئاز(۲۵ کیلودالتون)، بتالاکتوگلوبولین(۱۸/۴ کیلودالتون) و لیزوزیم(۱۴/۴ کیلودالتون) برای تعیین وزن مولکولی زیر واحدهای کنجاله مورد مطالعه استفاده شد.

حرکتی نسبی هر پروتئین مارکر در ژل محاسبه و در مقابل لگاریتم وزن مولکولی آن خط استاندارد رسم گردید. با قرار دادن حرکت نسبی هر زیر واحد پروتئین کنجاله منداب، لگاریتم وزن مولکولی آن زیرواحد و با آنتی لگاریتم، وزن مولکولی زیرواحد معین شد(۹).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

با استفاده از رابطه غیرخطی Orskov[۱۳] و Mc donald (۲۴)، فراسنجه‌های مختلف تجزیه پذیری و تجزیه پذیری مؤثر[۱۴] ماده خشک و پروتئین خام در رابطه ۱- محاسبه گردید.

$$p = a + b\,(1 - e^{-ct}) \qquad \text{رابطه ۱}$$

در این رابطه a بخش سریع تجزیه، b بخش کُند تجزیه، c ثابت نرخ تجزیه در واحد زمان و p مقدار ناپدید شدن است. با به کاربردن رابطه ۲ تجزیه پذیری مؤثر(ED) ماده خشک و پروتئین خام در سرعت‌های عبور ۲، ۵ و ۸ درصد در ساعت (k) محاسبه شد.

$$ED = a + bc/(c+k) \qquad \text{رابطه ۲}$$

Archive of SID
www.SID.ir

تجزیه آماری داده‌های مربوط به فراسنجه‌های مختلف تجزیه پذیری و تجزیه پذیری موثر ماده خشک و پروتئین خام(هرکدام شش تکرار، سه گاو × دو کیسه در هر گاو)، با استفاده از بسته نرم افزاری Proc GLM ، SAS (۲۵) انجام شد. پس از تجزیه واریانس، میانگین‌ها با آزمون چند دامنه دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند(۲۶).

آزمایش تعیین قابلیت هضم پروتئین خام

قابلیت هضم پروتئین خام کنجاله منداب فرآیند نشده و فرآیند شده و بخش‌های تجزیه نشده در ساعات صفر، ۸، ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون(مواد باقی مانده در کیسه‌ها) به روش آزمایشگاهی سه مرحله ای Calsamiglia و Stern (۵) اندازه گیری شد. به این منظور ۱ گرم نمونه(اندازه ذرات ۲ میلی متر)، به مدت۱ ساعت در اسید کلریدریک ۱ نرمال حاوی ۱ گرم در لیتر آنزیم پپسین انکوباسیون شد. پس از خنثی کردن اسید با هیدروکسید سدیم ۱ نرمال به مدت ۲۴ ساعت در بافر فسفات با pH=۷/۸ حاوی ۳ گرم پانکراتین گاوی(تولید شرکت سیگما) در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد(طبق سفارش تولیدکننده) انکوباسیون شد. پس از سانتریفیوژ g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه، پروتئین خام محلول بالایی با روش کلدال تعیین و با فرمول Calsmiglia و Stern (۵)، قابلیت هضم پروتئین خام برای نمونه انکوباسیون نشده و باقی مانده هر کیسه در ساعات مختلف تعیین شد.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیائی کنجاله منداب فرآیند نشده و فرآیند شده

مقدار ماده خشک، پروتئین خام، عصاره اتری، خاکستر و دیواره سلولی کنجاله منداب فرآیند نشده به ترتیب ۹۰/۱، ۳۶/۶، ۴/۵، ۶/۹ و ۲۵/۲ درصد و برای کنجاله منداب تف داده شده به ترتیب ۹۲/۱۸، ۳۶/۱، ۴/۶، ۷/۱ و ۳۱/۴ درصد بود. مقدار پروتئین خام کنجاله منداب مورد مطالعه کمتر از عدد ۳۹/۳ درصد گزارش شده به وسیله انجمن تحقیقات ملی(۲۳) و بیشتر از عدد ۲۷/۷ درصد گزارش شده توسط Turcer و Sacakli (۲۸) بود.

تجزیه پذیری ماده خشک و پروتئین خام کنجاله منداب فرآیند نشده و فرآیند شده

مقادیر بخش سریع تجزیه(a)، بخش کُند تجزیه(b)، نرخ ثابت تجزیه(c) و تجزیه پذیری مؤثر ماده خشک و پروتئین خام کنجاله منداب فرآیند نشده و فرآیند شده در سرعت‌های عبور ۲، ۵ و ۸ درصد در ساعت در جدول ۱ گزارش شده است. تفاوت معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بین میانگین فراسنجه‌های مختلف تجزیه پذیری و تجزیه پذیری مؤثر ماده خشک و پروتئین خام کنجاله منداب فرآیند نشده و فرآیند شده مشاهده شد.

بنابر گزارش خراسانی و همکاران(۱۴) و Kendall و همکاران(۱۲) پروتئین کنجاله منداب از نظر پروتئین عبوری در بین سایر مکمل‌های پروتئینی در درجه ضعیف تا متوسط طبقه بندی می‌شود. تجزیه پذیری بالقوه (a+b) پروتئین کنجاله منداب فرآیند نشده در مطالعه حاضر ۹۶/۱۴ درصد بود که بیانگر بالا بودن تجزیه پذیری پروتئین خام کنجاله منداب در شکمبه است. تجزیه پذیری موثر پروتئین خام کنجاله منداب فرآیند نشده در سرعت عبور ۵ درصد در ساعت ۶۵/۱۸ درصد بود. Mckinnon و همکاران(۱۹) تجزیه پذیری مؤثر پروتئین خام کنجاله منداب را در سرعت عبور ۵ درصد در ساعت معادل ۷۳ درصد، Kendall و همکاران(۱۲) مقادیر ۴۴/۳ تا ۵۹ درصد، Lindberg و همکاران(۱۶) معادل ۷۴ درصد، Hvelplund و Madsen (۱۷) این فراسنجه را در دامنه ۷۷-۶۳ درصد گزارش کردند. علت تفاوت بین نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات به متفاوت بودن واریته منداب، نسبت ناپین به کروسیفرین، ترکیبات ضدمغذی از جمله تانن‌ها، اسید فایتیک و گلوکوسینولیت‌ها، خصوصیات کیسه‌ها و شرایط انکوباسیون مربوط است.

فراسنجه‌های مختلف تجزیه پذیری و تجزیه پذیری مؤثر پروتئین خام کنجاله منداب تف داده شده(جدول ۱) نشان داد که این فرآیند سبب کاهش بخش پروتئین سریع تجزیه(a)، افزایش بخش کُند تجزیه(b) و کاهش تجزیه پذیری مؤثر ماده خشک و پروتئین خام می‌شود. نتایج مطالعه حاضر با نتایج Mckinnon و همکاران(۱۹) مطابقت دارد. این محققان با تف دادن کنجاله منداب در دمای ۱۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، تجزیه پذیری پروتئین خام را به نصف کاهش دادند. در مطالعه

جدول۱- فراسنجه‌های مختلف تجزیه پذیری ماده خشک و پروتئین کنجاله منداب فرآیند نشده و تف داده شده

مشخصه	فراسنجه‌های مختلف تجزیه پذیری			نرخ ثابت	تجزیه پذیری موثر(درصد) در سرعت عبور		
	a + b	b	a	تجزیه(c)	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۸
ماده خشک	درصد	درصد	درصد	درصد در ساعت	درصد	درصد	درصد
فرآیند نشده	۳۱/۶۲ a	۵۹/۸۹ b	۹۱/۵۱	۷/۰۰	۷۸/۱۶ a	۶۶/۵۰ a	۵۹/۵۱ a
تف داده شده	۲۲/۳۹ b	۶۸/۴۰ a	۹۰/۷۹	۵/۳۰	۷۲/۰۶ b	۵۷/۶۰ b	۴۹/۶۶ b
اشتباه معیار	۲/۳۷	۳/۲۶	۱/۵۴	۱/۳۵	۲/۵۶	۲/۰۶	۲/۱۶
پروتئین خام							
فرآیند نشده	۲۵/۵۱ a	۷۰/۶۳ b	۹۶/۱۴	۶/۴۰ a	۷۹/۳۴ a	۶۵/۱۸ a	۵۶/۹۲ a
تف داده شده	۱۳/۴۱ b	۸۱/۲۵ a	۹۴/۶۶	۴/۴۰ b	۶۹/۲۰ b	۵۱/۳۶ b	۴۲/۱۶ b
اشتباه معیار	۲/۳۸	۱/۸۰	۱/۴۷	۱/۲۸	۲/۰۹	۲/۵۱	۱/۶۲

درج حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر تفاوت معنی دار($p<۰/۰۵$) است.

Archive of SID
www.SID.ir

این محققان مشخص شد که تف دادن کنجاله منداب در دمای ۱۴۵ درجه سانتیگراد در دسترس بودن پروتئین را برای میکروب‌ها و آنزیم‌های پروتئاز روده کوچک کاهش داده و سبب افزایش فرآورده‌های میلارد غیرقابل هضم می‌شود.

وزن مولکولی زیرواحدهای پروتئین‌های کنجاله منداب

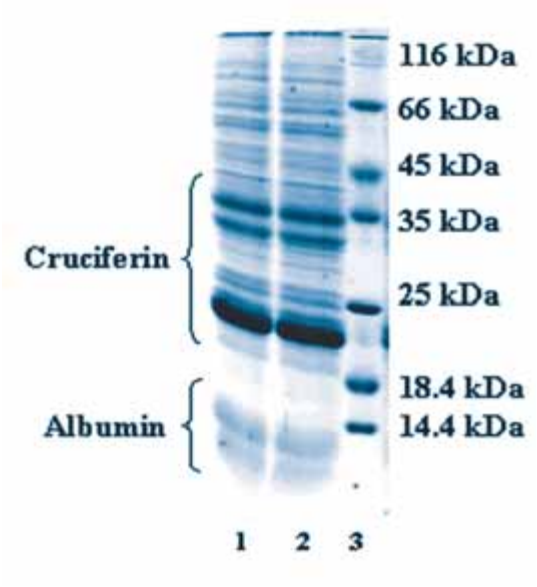
پروتئین‌های با وزن مولکولی بالای ۱۰۰ کیلودالتون از تعدادی زنجیره پلی پپتیدی تشکیل شده اند که به هریک از زنجیره‌های پلی پپتیدی زیرواحد گفته می‌شود. لاین۲ در شکل ۱ الگوی زیرواحدهای پروتئین‌های کنجاله منداب را نشان می‌دهد. دو نوع پروتئین عمده در کنجاله منداب، آلبومین ۲ S (ناپین) و گلوبولین ۱۲ S (کروسیفرین) مشاهده شد. ناپین دارای دو زیرواحد به ترتیب با وزن مولکولی ۸/۵ و ۱۰/۸ کیلودالتون و کروسیفرین دارای چهار زیرواحد با وزن مولکولی ۳۲/۶، ۲۶/۸، ۲۱/۱ و ۲۰/۵ دالتون بود(جدول ۲) که با نتایج گزارش شده توسط Bhatty و همکاران(۴) مشابه است. تفاوت‌هائی بین وزن مولکولی زیرواحدهای کنجاله منداب مطالعه حاضر با و بین مطالعات دیگران(۲، ۴) وجود دارد. دلیل آن به هتروژنسیتی پروتئین‌های عمده منداب، شرایط الکتروفورز نمونه‌ها، غلظت ژل و وزن مولکولی مارکر پروتئینی مربوط می‌شود(۱۱، ۳۱).

مجموع دو پروتئین عمده کنجاله منداب ۷۱/۷ درصد کل پروتئین آن بود (جدول ۴) که به اعداد گزارش شده توسط Bhatty و همکاران (۴) نزدیک است. نتایج دنسیتومتری همچنین نشان داد که ناپین و کروسیفرین به ترتیب ۱۸/۸ و۵۲/۹ درصد کل پروتئین‌های کنجاله منداب را تشکیل می‌دهند. Mahajan و Dua (۱۸) گزارش کردند این دو پروتئین به ترتیب ۳۳/۲ و ۴۱/۰ درصد کل پروتئین دانه منداب را شامل می‌شود. تفاوت بین اعداد گزارش شده توسط این محققان و مطالعه حاضر، صرف نظر از متفاوت بودن نسبت پروتئین‌ها در دانه و کنجاله، به متفاوت بودن واریته منداب مربوط می‌شود. واریته منداب مطالعه Mahajan و Dua (۱۸) *Brasica napus* بود، در حالی که واریته مورد مطالعه حاضر حاصل تلاقی *Brasica napus* و *Brasica campestris* (کنجاله منداب رقم دوصفر) است.

آنالیز الکتروفورزی تجزیه پذیری پروتئین‌های کنجاله منداب

آنالیز ژل ۱۴٪ سدیم دودسیل سولفات- الکتروفورز ژل پلی آکریلامید(SDS-PAGE) کنجاله منداب فرآیند نشده و انکوباسیون شده در شکمبه در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت که در شکل ۲ و نمودار دنسیتومتر زمان‌های صفر و ۸ انکوباسیون که در شکل ۴ گزارش شده است نشان داد که در زمان صفر بخش عمده آلبومین (ناپین) کنجاله منداب ناپدید می‌شود. نبودن و یا کم بودن پروتئین ناپین در زمان صفر انکوباسیون نشان دهنده شسته شدن و خارج شدن آن از کیسه‌ها است. به دلیل وجود اسیدهای آمینه آب دوست در سطح پروتئین ناپین، این مولکول به مقدار زیادی در آب محلول است (۳، ۴، ۷، ۸، ۱۸، ۲۰).

در زمان صفر انکوباسیون(شکل ۲) چهار زیرواحد گلوبولین(کروسیفرین) و سه زنجیره پلی پپتیدی با وزن مولکولی بالاتر از کروسیفرین وجود داشت. این سه زنجیره پلی پپتیدی تا زمان ۴ انکوباسیون وجود داشتند و در زمان‌های بعدی ناپدید شدند. زیرواحدهای ۱ و ۲ کروسیفرین تا زمان ۱۲، زیرواحد ۳ کروسیفرین تا زمان ۴۸ انکوباسیون و زیرواحد ۴ کروسیفرین تا



شکل۱- الگوی زیرواحدهای کنجاله منداب(۱ و۲) و مارکر پروتئینی(۳).

زمان ۸ انکوباسیون وجود داشت و در زمان‌های بعدی ناپدید شد. در زمینه مطالعه الکتروفورزی تجزیه پذیری پروتئین کنجاله منداب فرآیند نشده و فرآیند شده گزارشی در منابع علمی‌منتشر نشده است

الگوی زیرواحدهای پروتئین‌های کنجاله منداب تف داده شده(شکل ۳)، محافظت زیرواحد ۱ و ۲ کروسیفرین تا زمان ۱۲ و زیرواحد ۳ کروسیفرین تا زمان ۴۸ انکوباسیون را نشان داد. اما زیرواحد ۴ این پروتئین تا زمان ۶ محافظت گردید، ولیکن در زمان‌های بعدی ناپدید شد. در زمان صفر، زیرواحدهای ۱ و ۲ پروتئین ناپین کنجاله منداب تف داده شده مشاهده شد. این فرآیند سبب محافظت جزئی این زیرواحدها تا زمان ۴ انکوباسیون گردید. علت وجود زیرواحدهای ناپین تا زمان ۱۲ انکوباسیون و همچنین محافظت بیشتر کروسیفرین در مقابل تجزیه شدن، واسرشتی بر اثر حرارت است. Folawiyo و Apenten (۷) گزارش کردند ناپین خالص شده در دمای ۶۷-۶۰ درجه سانتیگراد و کروسیفرین خالص شده در دمای ۹۵-۷۱ درجه سانتیگراد تغییرات ساختمانی غیرقابل برگشت واسرشتی[۱۵] نشان می‌دهند.

در زمان ۸ انکوباسیون کنجاله منداب در شکمبه، زیرواحدهای پروتئین کروسیفرین هنوز تجزیه نشده است. با فرض اینکه نرخ رقت[۱۶] بخش مایع شکمبه ۰/۱۲ در ساعت باشد، زمان ماندگاری[۱۷] این بخش ۸/۳ ساعت است. نتایج دنسیتومتری لاین ۶ (شکل ۴) نشان داد که پس از ۸ ساعت انکوباسیون، ۴۶ درصد پروتئین کنجاله منداب فرآیند نشده و ۵۶ درصد پروتئین کنجاله تف داده شده از شکمبه می‌تواند عبور کرده و در تأمین پروتئین قابل متابولیسم سهیم باشد.

بنابراین وقتی کنجاله منداب تف داده شده به عنوان مکمل پروتئینی به جیره نشخوارکنندگان اضافه می‌شود، چهار زیرواحد کروسیفرین بخش قابل ملاحظه ای از پروتئین قابل متابولیسم را تشکیل می‌دهد. آنالیز دنسیتومتری نشان داد که پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون، حدود ۳۶ درصد

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- وزن مولکولی زیرواحدهای پروتئین‌های کنجاله منداب مورد مطالعه و مقایسه با نتایج سایر محققان

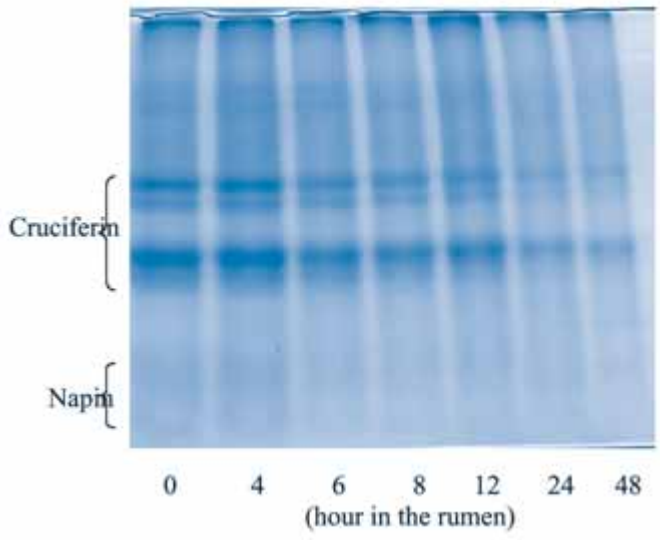
زیرواحد	نتایج پژوهش حاضر	باتی و همکاران(۱۹۹۹)	افرر و همکاران(۱۹۹۱)	درصد از کل پروتئین (نتایج دنسیتومتری)
کروسیفرین				۵۲/۹
زیرواحد ۱	۳۲/۶*	۳۲/۰	۳۰/۰	۱۴/۰
زیرواحد ۲	۲۶/۸	۲۸/۲	۲۶/۰	۶/۵
زیرواحد ۳	۲۱/۱	۲۱/۰	۲۲/۰	۱۶/۷
زیرواحد ۴	۲۰/۵	۱۸/۲	۲۰/۰	۱۵/۷
آلبومین				۱۸/۸
زیرواحد ۱	۱۰/۸	۱۰/۳	۶/۰	۹/۲
زیرواحد ۲	۸/۵	۸/۰	۴/۰	۹/۶

* کیلودالتون

پروتئین کنجاله منداب فرآیند نشـده و ۴۲ درصد پروتئین کنجاله تف داده شـده که عمدتاً زیرواحدهای کروسیفرین است، تجزیه نشده و از شکمبه به روده منتقل می‌شود.

قابلیت هضم

تفاوت معنی دار($p<0/05$) بین قابلیت هضم پروتئین خام کنجاله منداب فرآیند نشده و تف داده شده مشاهده نشد. قابلیت هضم آزمایشگاهی(*in vitro*) پروتئین خام کنجاله منداب انکوباسیون شده در ساعات صفر، ۸، ۱۲ و ۲۴ به ترتیب ۶۵/۳۲، ۷۳/۲۸، ۷۳/۵۰ و ۷۵/۳۰ درصد و برای کنجاله تف داده شده به ترتیب ۶۶/۲۸، ۷۱/۳۸، ۷۳/۱۲ و ۷۵/۵۰ درصد بود. Dakowski و همکاران(۶) نیز تفاوت غیرمعنی دار($p<0/05$) بین قابلیت هضم پروتئین خام کنجاله منداب فرآیند نشده و فرآیند شده گزارش کردند. در مطالعه مک Mckinnon و همکاران(۱۹) قابلیت هضم کنجاله منداب فرآیند نشده در



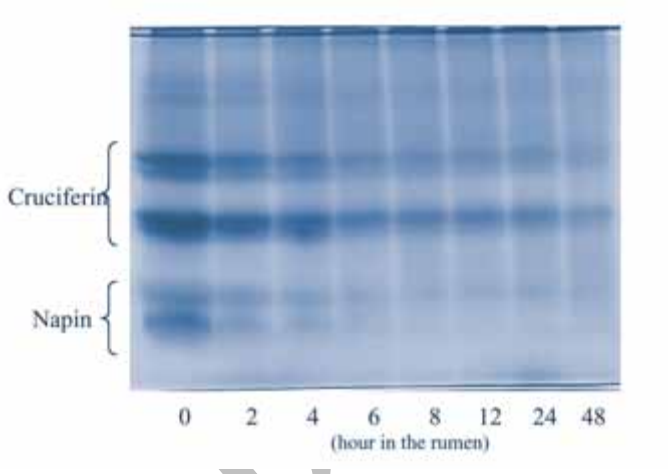
شکل ۲- الکتروفورز ژل پلی آکریلامید کنجاله منداب فرآیند نشده

زمان‌های انکوباسیون ۱۲ و ۲۴ به ترتیب ۸۰/۵۰ و ۷۷/۳ درصد بوده که از مطالعه حاضر بیشتر است. متفاوت بودن واریته منداب و ترکیب پروتئین آن، محتوی عوامل ضدمغذی و شرایط آزمایش علت تفاوت نتایج قابلیت هضم اسـت. نتایج مطالعه حاضر نشـان داد که فرآیند تف دادن کنجاله منـداب در دمـای ۱۲۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقـه اثری بر قابلیت هضم پروتئین خام ندارد. Moshtaghi Nia و Ingalls (۲۱) گزارش کردند دمای ۱۲۵ درجـه به مدت ۱۰ تـا ۳۰ دقیقه اثر جزئی بر افزایش قابلیت هضم پروتئین خام دارد. در مطالعه این محققان دمای ۱۴۵ درجه سـانتیگراد سبب کاهش معنی دار($p<0/05$) قابلیت هضم شده است. بنابر مطالعات Van Soest (۳۰) در دمای ۱۴۵ درجه سانتیگراد و بالاتر ترکیبات میلارد تشـکیل و مقدار آن افزایش می‌یابد. همچنین Dakowski و همکاران(۶) گزارش کردند که حرارت ۱۴۰ و ۱۵۰ درجه سانتیگراد سبب کاهش هضم پروتئین کنجاله منداب در روده می‌شـود. در مطالعه این محققان دمای ۱۳۰ درجه سانتیگراد بهترین نتیجه را در عبوری کردن پروتئین از شکمبه به روده، بدون اثر سوء بر قابلیت هضم داشته است.

نتیجه کلی

نتایـج مطالعه حاضر نشـان داد که تجزیه پذیـری پروتئین خام کنجالـه منداب تولید داخل زیاد اسـت و بـرای افزایش بازدهی مورد اسـتفاده قرارگرفتن پروتئیـن خام آن انجام فرآیند راهبرد مناسـبی اسـت. با توجه به نتایج تجزیه پذیری موثر، الکتروفورز، دنسیتومتری و قابلیت هضم کنجاله منداب فرآیند نشـده و فرآیند شـده، تف دادن کنجالـه منداب در دمای ۱۲۵ درجه با ۲۵ درصد رطوبت به مدت ۱۵ دقیقه سـبب عبوری شـدن بیشـتر پروتئین کنجاله منداب بدون اثر سـوء بر قابلیت هضم پروتئین خام آن می‌شود. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشـان داد که اسـتفاده از تکنیک SDS-PAGE و دنسیتومتر برای ارزشـیابی و مطالعه روند تجزیه پذیری پروتئین مواد خوراکی در شـکمبه، می‌تواند اطلاعات دقیق و مفیدی در مـورد تجزیه پروتئین در شکمبه، برآورد وتامین پروتئین قابل متابولیسم مورد نیاز حیوان و

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۳ - الکتروفورز ژل پلی آکریلامید کنجاله منداب تف داده شده

تنظیم جیره نشخوارکنندگان در اختیار محققین قرار دهد.

تشکر و قدردانی

از همکاری و مساعدت مدیریت گروه علوم دامی دانشگاه تهران که امکان انجام آزمایش *in situ* را فراهم کردند، ریاست و معاونین محترم واحد علوم و تحقیقات به جهت تأمین مالی و کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی واحد علوم و تحقیقات سرکارخانم مهندس موسوی به جهت کمک در انجام الکتروفورز عمودی تشکر و قدردانی می‌شود.

پاورقی‌ها

۱ - اخیراً واژه گلزا برای آن انتخاب شده است و با منداب بومی‌که حاوی مقادیر زیاد گلوکوسینولیت است فرق دارد.

2- Canola meal

3- Roasting

4- Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamid Gel Electrophoresis

5- Densitometrical Scanning

6- Poly Ester

7- SDS-PAGE sample buffer

8 - Tris-Hcl

9- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

10- B-mercaptoethanol

11- Bromophenol blue

12- Comassie Brilliant Blue G-250

13- Nonlinear regression

14- Effective Degradability

15- Denaturation

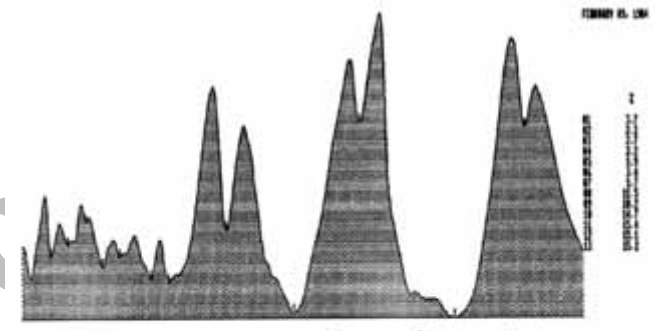
16- Dilution rate

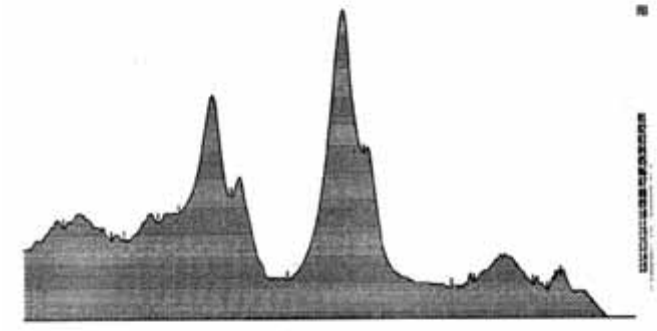
17- Retention time

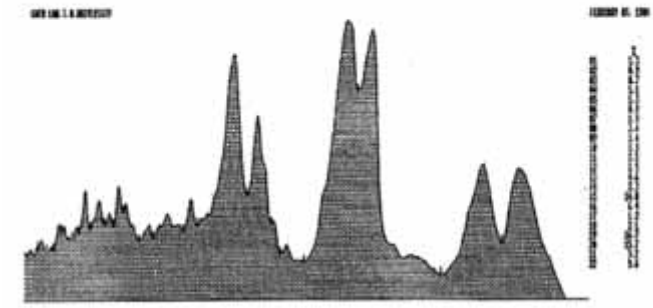
منابع مورداستفاده

1- AOAC. 1990; Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 15th ed. Washington, DC. USA.

2- Aufrere, J., D. Graviou, C. Demarquilly, R. Verite, B. Michalet-Doreau, and P. Chapoutot. 1991; Predicting *in situ* degradability of feed proteins in the rumen by two laboratory methods (solubility


کنجاله منداب (فرآیند نشده) انکوباسیون نشده


بعد از ۸ ساعت انکوباسیون (کنجاله فرآیند نشده)


بعد از ۸ ساعت انکوباسیون (کنجاله تف داده شده)

شکل۴- دنسیتومتر ژل پلی آکریلامید در طول موج ۵۸۰ نانومتر در ساعات مختلف انکوباسیون

Archive of SID
www.SID.ir

and enzymatic degradation). Anim. Feed Sci. Technol. 33: 97-116.

3- Aufrere, J. and D. Gravio 1998; The significance of the degradation products of rapeseed meal proteins in the rumen according to different meal processing techniques. Ann Zeotech.47: 127-140.

4- Bhatty, R. S., S. L. McKenzie and A. J., Finlayson.1999; The proteins of rapeseed soluble in salt solutions. Can. J. Biochem. 46: 1191-1197.

5- Calsamiglia, S. and M.D., Stern, 1995; A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. J. Anim. Sci.73: 1459-1465.

6- Dakowski, P., M.R., Weisbjerg, and T., Hvelplund. 1996; The effect of temperature during processing of rape seed meal on amino acid degradation in the rumen and digestion in the intestine. Anim. Feed Sci. Technol. 58: 213-226.

7- Folawiyo Y. L. and R. K. O., Apenten. 1997; The effect of heat- and acid-treatment on the structure of rapeseed albumin (napin). Food Chemistry. 58: 237-243.

8- Gerbanowski, A.C.R. and J. Gueguen. 2002; Behaviors of bovine serum albumin and rapeseed proteins at the air/water interface after grafting aliphatic or aromatic chains. Journal of Colloid and Interface Science 262: 391-399.

9- Hames, E.D. and D. Rickwood.1990; Gel Electrophoresis of proteins. 2nd Ed. IRL Press. Oxford. UK.

10- Hvelplund T. and M.R. Weisbjerg. 2000; In situ techniques for the estimation of protein degradability and postpartum availability. Eds. Givens, D.J., E. Owen, R.F.F. Axford and H.M. Omed. p.233-258. CAB International Publishing. UK.

11- Hu, B. and A. Esen. 1981; Heterogeneity of soybean seed proteins: One-dimensional electrophoretic profiles of six different solubility fractions. J. Agric. Food Chem. 29:497-508.

12- Kendall, E.M., Ingalls, J.R. and R.J., Boila. 1991; Variability in the rumen degradability and post-ruminal digestion of the dry matter, nitrogen and amino acids of canola meal. Can. J. Anim. Sci. 71: 739-754.

13- Kennelly, J. J. and G. R. Khorasani. 1993; Enhancement of the nutritive value of canola protein by acid treatment. Part C. Influence of acid treatment of canola meal on milk production of early-lactation dairy cows. 10th Project report: Research on canola seed, oil and meal. Canola Council of Canada.

14- Khorasani, G. R., P. H. Robinson, and J. J. Kennelly. 1993; Effects of canola meal treated with acetic acid on ruminal degradation and intestinal digestibility in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 76:1607-1616.

15- Laemmli, U. K. 1970; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-688.

16- Lindberg, J. E., H. S. Soliman, and S. Stanne.1982; A study of the rumen degradation of untreated and heat treated rapeseed meal and of whole rapeseed including a comparison between two nylon bag techniques. Swed. J. Agri. Res.12: 83-88.

17- Madsen, J., and T. Hvelplund. 1985; Protein degradation in the rumen. Acta Agric. Scand. Suppl. 25:103-124.

18- Mahajan, A. and S. Dua.1994; Physicochemical properties of rapeseed proteins and ionizable groups. J. Agri. Food. Chem. 42:1411-1414.

19- McKinnon, J.J., J.A. Olubobokun, A. Mustafa and R.D.H.Christensen. 1995; Influence of dry heat treatment of canola meal on site and extent of nutrient disappearance in ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 56: 243-252.

20- Monsalve R. I., C. Lopez-Otin, M. Villalba and R. Rodriguez. 2003; A new distinct group of 2 S albumins from rapeseed. FEBS. 295: 207-210

21- Moshtaghi Nia, S.A. and J.R. Ingalls. 1992; Effect of heating on canola meal protein degradation in the rumen and digestion in the lower gastrointestinal tract of steers. Can. J. Anim. Sci. 72: 83-88.

22- Moshtaghi Nia, S.A. and J.R. Ingalls. 1995; Influence of moist heat treatment on ruminal and intestinal disappearance of amino acids from canola meal. J. Dairy Sci. 78: 1552-1560.

23- National Research Council, 2001; Nutrient requirements of dairy cattle seventh revised ed. National Academy of Sciences, Washington, DC.

24- Orskov, E.R. and I., McDonald. 1979; The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. 92: 499–503.

25- SAS Institute Inc., 1996; Statistical Analysis System (SAS) User's Guide, SAS Institute, Cary, NC, USA.

26- Steel, R.G.D. and J.H., Torrie. 1980; Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach, 2nd ed., McGraw Hill, New York, NY, USA, pp. 187-188.

27- Stern, M.D., Bach A. and S. Calsamiglia. 1997; Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. J.Anim.Sci. 75:2256.

28- Tuncer, S.D.and P., Sacakli. 2003; Rumen degradability characteristics of xylose treated canola and soybean meals. Anim. Feed Sci. and Tech. 107: 211-218.

29- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and B.A., Lewis. 1991; Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.

30- Van Soest, P.J. 1994; Nutritional Ecology of the Ruminants. 2nd Edition. Cornell University Press. NY. USA.

31- Utsumi, S., H. Iuaba, and T. Mori. 1981; Heterogeneity of soybean glycinin. Phytochemistry 20:585-591.

Archive of SID

www.SID.ir