مطالعه پروتئینهای پودر آب پنیر و تعیین تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای آن به روش کیسه‌های نایلونی (Nylon Bag Technique)

چکیده

آزمایشی به منظور بررسی تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین سه نوع پودر آب پنیر با نام‌های تجاری شیذر 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 پروتئین های عمده پودر آب پنیر عبارت بودند از: β- لاکتوگلوبولین، α- 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 وWP2 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 وWP2 دارای بیشترین نرخ تجزیه در ۰/۲۰ در ساعت بودند ($p<0/05$). این آزمایش نشان داد که بالاترین میزان تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای موثر پروتئین پودر آب پنیر به ترتیب مربوط به نمونه‌های WP2، WP1 بودند.

کلید واژه‌ها: آب پنیر خشک شده، الکتروفورز، تکنیک حیوان آزمایشگاه، پروتئین، نرخ تجزیه.

مقدمه

آب پنیر به عنوان یکی از فرآورده های جانبی فرآوری شیر، مایع بی‌رنگی است که پس از تهیه پنیر به‌دست می‌آید. سالیانه حدود ۲ میلیون تن آب پنیر در کشور تولید می شود 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 می کنند لذا سالیانه مقادیر زیادی آب پنیر به هدر می رود که علاوه بر ایجاد مشکلات زیست محیطی، سبب هدر رفتن ماده ای با ارزش غذایی بالا می شود که به راحتی می توان از آن در جیره دام و طیور استفاده نمود. آب پنیر تازه، pH ای معادل ۶/۹-۵/۸ دارد و ماده‌ی 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 می شود، مقدار ریبوفلاوین و اسید پانتوتنیک آن نیز قابل توجه است ، ضمن اینکه نسبتآ از نظر لیزین و ترئونین غنی ولی از نظر اسیدآمینه های گوگردی و گلیسین فقیر می باشد. آب پنیر حاوی ۱۱ ٪ پروتئین خام ، ۱۹۰۰ کیلو کالری در کیلوگرم انرژی متابولیسمی و ۶۵ ٪ لاکتوز است. رایج‌ترین روش استفاده از آب پنیر، خشک‌کردن آن به صورت پودر آب پنیر، پودر آب پنیر و آب پنیر به صورت 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 نانوایی، شیرینی و بیسکویت سازی، نوشابه سازی، 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 (Mehri *et L.*, 2004).

گزارش کرده‌اند مصرف چهار درصد پودر آب پنیر در جوجه های گوشتی، بطور معنی‌داری اضافه وزن و ضریب تبدیل را نسبت به گروه شاهد بهبود داد. این محققان اظهار داشتند که در طیور بواسطه نبود آنزیم لاکتاز در روده، لاکتوز جذب نشده، بلکه تخمیر گردیده و به اسید لاکتیک و اسیدهای چرب فرار تبدیل می شود 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 موثر خواهد بود. پیشنهاد شده است که استفاده از پودر آ ب پنیر سبب افزایش رشد میکروویلی‌های روده در جوجه‌های گوشتی شد که این موضوع سبب افزایش سطح جذب مواد مغذی شده و استفاده موثر از مواد مغذی را افزایش می دهد (Schingoethe *et al.*, 1975) .

گزارشی هم وجود دارد که اضافه کردن پودر آب پنیر به جیره‌ی غذایی، میزان ماده خشک مصرفی در گاوهای شیری را افزایش داد (Susmel *et al.*, 1995). هم‌چنین نشان داده‌اند که پودر آب پنیر، ترشح کیموزین و لخته شدن شیر در قسمت شیردان را کاهش داده و بدین 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 جیره‌ی غذایی تغییر می‌یابد (Tolera *et al.*, 1997) . بنابراین، هرچند تا کنون تحقیق مستقلی در رابطه با بررسی فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پودر آب پنیر انجام نگرفته است، ولی از پودر آب پنیر به عنوان 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 هلشتاین با متوسط وزن زنده ۲۵±۴۰۰ کیلوگرم که دارای فیستولای شکمبه‌ای بودند، استفاده شد. هر یک از گوساله ها 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 جیره‌ی 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 شیذر 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 خاکسترخام 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 Buchiمدل B-342 B-322 کشور سوئیس تعیین شد. در 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=8 تهیه شد. سپس مقدار یک گرم از هر پودر هر یک از نمونه‌ها را در فالکون 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 فالکن‌ها جداسازی شد. پس از آن مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره با مقدار ۵۰ میکرولیتر بافر استخراج نمونه SDS-PAGE[1] حاوی ۰/۵ مولار تریس – اسیدکلریدریک[2] (pH =۶/۸) ، ۱۰ درصد سدیم دودسیل سولفات[3]، ۲/۵ درصد بتامرکاپتواتانول[4]، ۷ درصد گلیسرول[5] و ۴ میلی گرم بروموفنل بلو[6] درون لوله‌ی اپندرف[7] 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 g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه، مایع صاف شده بالائی جدا گردید. مایع بالائی که حاوی پروتئین دناتوره بود به لوله‌های اپندرف منتقل و تا زمان انجام الکتروفورز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه SDS-PAGE

برای تهیهٔ SDS-PAGE از ژل ۱۲/۵ درصد اکریل‌آمید استفاده شد. این ژل شامل دو قسمت تفکیک‌کننده و ردیف‌کننده است. قسمت تفکیک کننده شامل ۳/۱۲۵ میلی‌لیتر محلول A (۲۹:۱ آکریل آمید به بیس آکریل آمید)، 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[8] و ۰/۳۸ میکرولیتر APS[9] و ژل ردیف کننده شامل ۲/۵ میلی‌لیتر محلول A، ۵ میلی‌لیتر محلول D (بافر ۰/۵ مولار تریس اسید کلریدریک با pH=۶/۵)، ۱۱/۳ میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۵ میلی‌لیتر APS، ۲۰۰ میکرولیتر SDS و ۱۲ میکرولیتر TEMED بود. ابتدا ژل تفکیک کننده ریخته و پس از ۴۰ دقیقه که ژل بست، ژل ردیف‌کننده تزریق شد و شانه‌ی ژل درون آن قرار گرفت. پس از حدود ۴۰ دقیقه که ژل به طور کامل بست شانه‌ی ژل

---

[1] SDS-PAGE sample buffer
[2] Tris-Hcl
[3] Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
[4] B-mercaptoethanol
[5] Glycerol
[6] Bromophenol blue
[7] Ependorf tube
[8] Tetramethyethylenediamine
[9] Ammonium Per Sulfate

خارج و شیشه‌ی حاوی ژل به تانک الکتروفورز منتقل شد. بافر تانک (شامل تریس، گلایسین با pH ۸/۳) تهیه و درون تانک ریخته شد.
در نهایت نمونه‌ها به داخل چاهک‌های تزریق شد. ابعاد ژل ۱۴۰ × ۱۱۰ × ۱ میلی متر و زمان الکتروفورز ۳ ساعت (تـــا 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[1] ، ۷ درصد اسید استیک گلیسیال[2] و ۲۰ درصد متانول به مدت ۱۲ ساعت رنگ آمیزی[3] و سپس با محلول حاوی ۷ درصد اسید استیک گلیسیال و ۵ درصد متانول به مـدت ۱۲ ساعت رنگبری[4] تا روشن شدن زمینه ژل ادامه یافت. پس از چند چند بار شستشو با آب دو بار تقطیر با اسکنر معمولی و دوربین تصویر برداری 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 فاصلهٔ هر یک از باندهای مربوط بـه مارکر پروتئینی نیز از ابتدای ژل اندازه‌گیری شد. سپس، مقدار Rf (نسبت فاصلهٔ باند پروتئین تـا چاهک به فاصله‌ی جبهه‌ی حلال از چاهک، منظور از جبهه‌ی حلال جایی که در انتها ژل تا آن نقطه جریان یافته است) محاسبه شد (Rickwood D H, 1990).

برآورد تجزیه پذیری به روش کیسه های نایلونی

برای این روش از کیسه‌های نایلونی از جنس داکرون (الیاف پلی استرمصنوعی[5]) که در شکمبه قرار می‌گرفتند، استفاده شد. کیسه‌ها دارای سوراخ‌هایی به قطر ۴۵ میکرومتر بوده به گونه ای که میکروارگانیسم‌ها می‌توانستند وارد آن شده و گاز حاصله از آن خارج می‌شد. ابعاد کیسه‌ها ۵×۱۰ 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 بوسیله چسب مسدود گردید. زمان‌های انکوباسیون صفر،دو، چهار، هشت ، ۱۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بود. برای هر تیمار در هر ساعت ۴ تکرار تهیه شد، بطوری که درون شکمبه هر گوساله دو کیسه قرار داده شد، بدین

[1] Commasie Brilliant Blue
[2] Glycial Acetic Acid
[3] Staining
[4] Destaining
[5] Synthetic Polyester Fiber

صورت که قبل از قرار دادن کیسه‌ها درون شکمبه حیوانات، کیسه‌ها در داخل کیسه‌ای از جنس پلی استر با قطر منافذ سه میلی‌متر قرار داده شدند بطوریکه 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 بوسیله نخ پلاستیکی گره زده شده و با استفاده از لوله لاستیکی به طول ۳۰ سانتی متر در داخل شکمبه شناور شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، کیسه ها از طریق درب کانولا خارج شده سپس جهت شستشو در معرض جریان آب سرد قرار گرفتند تا زمانی که اعمال تخمیر متوقف شده آب خارج شده کاملا شفاف شود (در رابطه با زمان صفر، انکوباسیون صورت نگرفت)، زمان صفر تجزیه پذیری فقط با شستن نمونه ها در مجاورت آب اندازه‌گیری گردید (Petit *et al*., 1992) در مرحله شستشو 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 کیسه ها به مدت ۲۴ ساعت در درجه ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرارگرفته و سپس به منظور تعیین درصد ماده خشک آن، مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در داخل آون قرار داده شدند. میزان ناپدید شدن مواد مغذی و فراسنجه های هضمی با استفاده از معادله ارسکوف و مکدونالد(Orskov and McDonald ., 1979) محاسبه شد.

محاسبات و تجزیه تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده 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 تجزیه پذیری از رابطه ۱ استفاده گردید، با این توضیح که، در ابتدا ضرایب تجزیه‌پذیری (از قبیل a، b، c و غیره) با نرم افزار Neway بدست آمده، سپس داده‌های نهایی حاصل شده با نرم‌افزار SAS تجزیه گردیدند. ضمناً برای رسم نمودارهای استاندارد ترکیبات شیمیایی نمونه‌ها و سایر نمودارهای لازم از برنامه Excel استفاده گردید.

$$Y= a + b (1 - e^{-ct}) \qquad (۱$$

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی نمونه‌های آب پنیر

میانگین مواد مغذی اندازه گیری شده 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: شیذر WP2: نصر دالیا WP3 :پگاه خراسان

تعیین پروتئین‌های پودر آب پنیر به کمک ژل الکتروفورز

پودر آب پنیر حاوی۲۰-۱۸ درصد از کل پروتئین‌های موجود در شیر می‌باشد. این پروتئین‌ها شامل چهار گروه اصلی هستند: β- لاکتوگلوبولین (β-Lg)، α- لاکتالبومین (α-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 پروتئوزپپتون‌ها (PP)، ویتامین‌های باند شده با پروتئین‌ها، لاکتوفرین و حدود ۶۰ آنزیم indigenous می‌باشد (Jovanovic *et al*., 2007). ژل الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات- پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE) به عنوان روشی کارآمد برای بررسی پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس جداسازی در این روش، تفاوت در وزن مولکولی و بارالکتریکی و ساختمان پروتئین‌های مختلف می باشد.
ژل الکتروفورز پودر آب پنیر تعداد ۴ باند اصلی را نشان می‌دهد که مشخص کننده β- لاکتوگلوبولین A و B، α- 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 خشک کردن می‌باشد. در نتیجه افزایش دمای خشک کردن 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 بدین ترتیب شدت باند کاهش یافته و باند ناپدید می‌گردد. واسرشت شدن آلفا لاکتالبومین در مقایسه با سایر پروتئین‌ها، به شدت قابل برگشت می‌باشد و بنابراین نسبت به بتالاکتوگلوبولین مقاوم‌تر به حرارت است (Bramaud *et al*., 19970). نمونه‌های پودر آب پنیر دارای دو باند با حرکت سریع شامل بتا لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و آلفا لاکتالبومین (۱۴ کیلودالتون) و 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 تاثیر بار الکتریکی و شدت میدان الکتریکی است، بلکه عواملی نظیر اندازه، وزن مولکولی و شکل فضایی مولکول نیز در این امر دخیل هستند (Goetz J and Koehler P., 2005).

تجزیه پذیری پروتئین نمونه‌های مورد مطالعه

نتایج حاصل از تجزیه داده های تجزیه پذیری پروتئین نمونه‌های مورد مطالعه در زمان‌های انکوباسیون در جدول (۲) آمده است. ناپدید شدن پروتئین از کیسه‌های انکوبیت 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(Tolera *et al*., (1997.

جدول ۲- میانگین تجزیه پذیری پروتئین نمونه‌ها در ساعات مختلف انکوباسیون شکمبه‌ای (درصد)

نمونه	مدت انکوباسیون (ساعت)							
	۰	۲	۴	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۷۲
WP1	۲۳/۳۱^{a}	۳۱/۸۱^{a}	۴۱/۱۲^{a}	۵۲/۲۷	۷۲/۶۲^{b}	۸۲/۱۷^{b}	۹۳/۲۲^{a}	۹۵/۷۷^{b}
WP2	۲۱/۶۳^{b}	۲۶/۷۰^{b}	۳۵/۸۷^{b}	۵۰/۴۲	۷۴/۹۱^{a}	۸۴/۱۱^{a}	۹۳/۶۱^{a}	۹۷/۲۵^{a}
WP3	۲۰/۳۲^{b}	۲۸/۱۲^{b}	۳۶/۱۹^{b}	۴۹/۶۸	۷۱/۰۸^{b}	۸۱/۵۴^{b}	۹۰/۴۶^{b}	۹۵/۰۰^{b}
SEM	۰/۴۹	۰/۸۱	۱/۰۴	۰/۵۸	۰/۶۴	۰/۴۵	۱/۱۴	۰/۸۳
P Value	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۲۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱

SEM: خطای استاندارد میانگین

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

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. مقدار و نوع زیرواحدهای پروتئین‌های مواد خوراکی، ترکیب اسیدهای آمینه زیرواحدها و نوع ساختمان پروتئین از جمله این عوامل‌اند. در سیستم‌های جدید تنظیم جیره نشخوارکنندگان، جهت تخمین سنتز پروتئین و تجزیه آن در شکمبه، فراسنجه‌های پیچیده‌ای وارد محاسبات و مدل‌ها شده است. بکارگیری موفقیت‌آمیز این سیستم‌ها به منظور تعادل بین سنتز پروتئین میکروبی و پروتئین

عبوری از شکمبه و در نتیجه کاهش دفع نیتروژن از بدن، مستلزم کسب اطلاعات دقیق از روند تجزیه‌پذیری پروتئین مواد خوراکی در شکمبه است (Mehri *et al*., 2004) .

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 شکمبه دام زنده صورت می‌گیرد. آن قسمت از پروتئین جیره که تحت تأثیر میکروارگانیسم‌های شکمبه قرار می‌گیرد و تجزیه می‌شود، پروتئین قابل تجزیه در شکمبه گفته می‌شود. میزان تجزیه پذیری مواد خوراکی در شکمبه اثرات شدیدی روی فرآورده‌های نهائی تخمیر و توان تولیدی حیوان می‌گذارد. اگر چه پروتئین عبوری ممکن است ازنقطه نظر میزان تجمع آمونیاک در شکمبه مفید باشد، ولی کاهش پروتئین تجزیه شده در شکمبه ممکن است سبب کاهش بازده سنتز پروتئین میکروبی گردد. باکتری‌های شکمبه قادر به استفاده از آمونیاک به عنوان منبع ازت برای سنتز پروتئین میکروبی هستند، ولی تخمیر پروتئین در شکمبه، 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 غذائی بصورت آمونیاک از دست می‌رود (Nowa *et al*., 2005).

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 ناپدید شدن بالقوه قسمت قابل تجزیه در ساعت و t مدت زمان توقف غذا در شکمبه می‌باشد. محلولیت پروتئین میزان تجزیه‌پذیری آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. پروتئین‌های محلول ممکن است با سرعت یا به کندی تجزیه شوند. پروتئین‌های غیر محلول نیز با سرعت‌های متغیر و خاصی تجزیه می‌شوند. همچنین تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام پودر آب پنیر برای نرخ‌های عبور مختلف خروج از شکمبه نشان داده شده است، که با افزایش نرخ خروج مواد از شکمبه، درصد تجزیه‌پذیری پروتئین خام کاهش می‌یابد. از بین خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین، حلالیت پروتئین در شکمبه از مهمترین عوامل موثر بر تجزیه آن در شکمبه می‌باشد. از آنجا که میکروارگانیسم‌های شکمبه 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 شکمبه تجزیه می‌شوند.

میزان حلالیت پروتئین‌ها در شکمبه تا اندازه زیادی به نسبت آلبومین و گلوبولین (هر دو محلول) و پرولامین و گلوتلین (هر دو نامحلول در مایع شکمبه) در آنها بستگی دارد. برای مثال درپروتئین‌های کروی، عدم وجود گروه کربوکسیل یا آمینی انتهایی، مانع از تجزیه شدن آنها بوسیله اگزوپپتیدازهای میکروبی می‌گردد. مصرف جیره با پروتئین بیشتر به افزایش جذب آمونیاک از شکمبه 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 شکمبه باید به جیره افزوده شود تا تفاوت بین اسیدهای آمینه مورد نیاز دام‌های پرتولید 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 شکمبه را دارند (Nowa *et al*., 2005). ولی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیش از ۹۶ درصد از پروتئین پودر آب پنیر بطور بالقوه تجزیه‌پذیر می‌باشد. نشان داده‌اند که رژیم‌های غذایی که حاوی مقادیر بالایی از کربوهیدارت قابل تخمیر در دسترس می‌باشند، موجب تخمیر شدید شده و تولید میزان زیادی اسیدهای چرب فرار می‌کنند که سبب افزایش تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین خواهد (Aldrich *et al*., 1993).

نتایج تحقیقی نشان داد که توان تجزیه‌پذیری بالقوه پروتئین پودر آب پنیر در حدود ۹۷ درصد می‌باشد در حالی‌که این مقدار برای پودر شیر خشک و کازئین ۹۵ درصد است. همچنین میزان انرژی خالص پودر آب پنیر نیز بیشتر می‌باشد (Alaviuhkola T and Harju M., 1985). افزودن پودر آب پنیر به رژیم یونجه و ذرت موجب افزایش تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین گردید. پیشنهاد کرده‌اند که با افزودن پودر آب پنیر، تجزیه پذیری 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).

جدول ۳- درصد فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری پروتئین پودر آب پنیر

نمونه	درصد فراسنجه‌های تجزیه پذیری				تجزیه پذیری مؤثر		
	بخش تجزیه‌پذیر سریع (درصد)	بخش تجزیه‌پذیر آهسته (درصد)	پتانسیل تجزیه‌پذیری (درصد)	نرخ تجزیه-پذیری (درصد در ساعت)	۰/۰۲ (نرخ عبور در ساعت)	۰/۰۵ (نرخ عبور در ساعت)	۰/۰۸ (نرخ عبور در ساعت)
WP1	۲۳/۳۴[a]	۷۳/۸۲[c]	۹۷/۱۶[ab]	۰/۰۶۷	۸۰/۱۹[a]	۶۵/۶۱	۵۶/۹۸
WP2	۱۸/۴۸[b]	۷۹/۹۱[a]	۹۸/۳۹[a]	۰/۰۶۸	۸۰/۲۲[a]	۶۴/۵۳	۵۵/۲۰
WP3	۱۸/۹۰[b]	۷۷/۰۲[b]	۹۶/۹۵[b]	۰/۰۶۹	۷۸/۶۱[b]	۶۳/۵۶	۵۴/۵۷
SEM	۱/۱۴۰	۱/۲۴	۳/۱۴	۰/۰۱۹	۰/۰۱	۰/۰۱۱	۰/۰۱۴
P Value	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۱۵	۰/۰۱	۰/۳۳	۰/۱۱

SEM: خطای استاندارد میانگین

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

پروتئین عبوری، قسمتی از پروتئین موجود در غذاست که از هضم توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه مصون مانده و به قسمت‌های پایین‌تر از شکمبه یعنی جائی‌که 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. اسید های 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*., 1997) . 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 آنکه 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 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 مشخص کننده β- لاکتوگلوبولین A و B، α- لاکتالبومین و سرم آلبومین گاوی می‌باشد. 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 ساعات انکوباسیون، درصد تجزیه‌پذیری ماده خشک بیشتر از دو نمونه دیگر می‌باشد.

Refrences

Alaviuhkola T and 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 LD, Varga G A and Griel LC (1993). Nonstructural carbohydrate and protein effects on rumen fermentation, nutrient flow, and performance of dairy cows. Journal of dairy science 76 (4):1091-1105.

AOAC (1990) Official Methods of Analysis. 15th edn. Association of Official Analytical Chemists Arlington, U.S.A.

Bramaud C, Aimar P and Daufin G (1997) Whey protein fractionation: Isoelectric precipitation of α-lactalbumin under gentle heat treatment.Biotechnology and bioengineering 56(4): 391-397.

Goetz J, and 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 and 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, and Samie A. (2004). The Effects of Supplementation of Whey Powder on Broiler Performance. Iranian, J. Agric. Sci. Vol. 35. No. 4

Nowa W, Michalak S and 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 and 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 HV and Tremblay GF (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 acidsa practical approach (No. 574.8732 G4).

Sampelayo MS, Pérez M L, Extremera FG, Boza JJ and 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 DJ (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 CR and 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. and Orskov ER (1997) Nutritive evaluation of some browse species. Animal Feed Science and Technology 67: 181–195.

Study of Whey Powder and Determine the Ruminal Degradability of Protein by the Nylon Bags Method

Abstract

This experiment was conducted to study three types of Ruminal degradability of protein whey powder brands with product Shyzr 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 β- 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**.**