مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۳، سال ۱۳۸۴ (۷۵۴-۷۴۳)

مطالعه روند تجزیه پذیری پروتئین کنجاله سویا با روش کیسه‌های نایلونی و الکتروفورز ژل پلی آکریلامید

علی اصغر صادقی[۱]، علی نیکخواه[۲] و محمد مرادی شهر بابک[۳]
۱، دانشجوی دوره دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
۲، ۳، استاد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران – کرج
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۷/۸

خلاصه

به منظور مطالعه روند تجزیه‌پذیری ماده خشک، پروتئین خام، پروتئین حقیقی و تعیین نوع پروتئین قابل تجزیه کنجاله سویا در شکمبه، آزمایشی با تلفیق روش *in situ* و تکنیک الکتروفورز ژل پلی آکریلامید (SDS-PAGE) انجام گردید. با استفاده از کیسه‌های نایلونی، مقدار ۵ گرم نمونه کنجاله سویا به مدت صفر، ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۲، ۲٤ و ٤۸ ساعت در شکمبه سه رأس گاو نر بالغ سیستانی انکوباسیون شد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون و شستشوی کیسه‌ها، مواد باقیمانده منجمد و با فریز درایر (انجماد خشک) خشک گردید. ماده خشک، پروتئین خام، پروتئین حقیقی، الگوی زیرواحدهای پروتئین‌های عمده کنجاله سویا و دنسیتومتری پروتئین‌ها تعیین شد. تجزیه پذیری ماده خشک، پروتئین خام، پروتئین حقیقی و مجموع زیرواحدهای پروتئین کنجاله سویا در سرعت عبور ۲، ۵ و ۸ درصد در ساعت به ترتیب ۸۳/۳، ۷۱/٤ و ٦۳/۵ درصد (برای ماده خشک)؛ ۸۲/۷، ٦۸/۳ و ۵۹/۲ درصد (برای پروتئین خام)؛ ۸۲/۷، ٦۹/۲ و ٦۰/۳ درصد (برای پروتئین حقیقی)؛ ۸۳/۸ ، ۷۰/۱ و ٦۰/۹ درصد (برای مجموع زیرواحدها) بود. تفاوت غیرمعنی‌دار (P >۰/۰۵) بین تجزیه پذیری پروتئین خام، پروتئین حقیقی و مجموع زیرواحدهای پروتئین‌های کنجاله سویا در سرعت‌های عبور مختلف مشاهده شد. دو نوع پروتئین عمده در کنجاله سویا شامل بتاکنگلیسینین با سه زیرواحد $\acute{\alpha}$، α وβ به وزن مولکولی ۹۰/۵، ۷۱/۵ و ۵۵/۲ کیلودالتون و گلیسینین با دو زیرواحد اسیدی و بازی به وزن مولکولی ۳۷/٦ و ۱۹/۸ کیلودالتون مشاهده شد که به ترتیب ۳۱ و ۳۸/۸ درصد از کل پروتئین کنجاله سویا را به خود اختصاص دادند. زیرواحد α و $\acute{\alpha}$ بتاکنگلیسینین طی ۲ ساعت و زیرواحد β پروتئین بتاکنگلیسینین طی ۱۲ ساعت انکوباسیون به طور کامل تجزیه شد. تجزیه‌پذیری گلیسینین کمتر از بتاکنگلیسینین بود. زیرواحد اسیدی این پروتئین تا ۲٤ ساعت و زیرواحد بازی آن تا ٤۸ ساعت انکوباسیون تجزیه نشد. نتایج تعیین قابلیت هضم به روش آزمایشگاهی سه مرحله‌ای نشان داد که با افزایش ساعات انکوباسیون کنجاله سویا در شکمبه، قابلیت هضم پروتئین خام کنجاله سویا افزایش می‌یابد. قابلیت هضم باقیمانده نمونه کنجاله سویا در زمان صفر، ۸، ۱۲ و ٤۸ انکوباسیون به ترتیب ٦۹/۷، ۸۳/۲، ۹٤/۲ و ۹٦/۸ درصد بود.

واژه‌های کلیدی: کنجاله سویا، تجزیه پذیری، پروتئین خام، پروتئین حقیقی، الکتروفورز

مقدمه

به عقیده ون سوست (۱۹۹۴) بهترین ملاک ارزشیابی پروتئین مواد خوراکی در تغذیه نشخوارکنندگان، اندازه‌گیری مقدار تجزیه پذیری پروتئین حقیقی در شکمبه است. عوامل متعددی تجزیه‌پذیری پروتئین مواد خوراکی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. مقدار و نوع زیرواحدهای پروتئین‌های مواد خوراکی،

مکاتبه کننده: علی اصغر صادقی
e-mail: draasadeghi@yahoo.co.uk

ترکیب اسیدهای آمینه زیرواحدها و نوع ساختمان پروتئین از جمله این عواملاند (۲۱). در سیستم‌های جدید تنظیم جیره نشخوارکنندگان (۱۵، ۱۹، ۲۲) جهت تخمین سنتز پروتئین و تجزیه آن در شکمبه، فراسنجه[1]های پیچیده‌ای وارد محاسبات و مدل‌ها شده است. بکارگیری موفقیت آمیز 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.

کنجاله سویا به دلیل داشتن درصد بالای پروتئین، تعادل مطلوب اسیدهای آمینه، دارابودن بیوپپتیدهای مؤثر در تولید شیر به مقدار زیادی در تغذیه گاوهای شیرده پرتولید و گوساله‌های پرواری با سرعت رشد زیاد به عنوان مکمل پروتئینی استفاده می‌شود (۱۴، ۱۵). پروتئین‌های عمده کنجاله سویا بیشتر از نوع گلوبولین (محلول در محلولهای نمکی) می‌باشد و نسبت به سایر پروتئین‌ها (گلیادین و گلوتلین در غلات) ارزش بیولوژیکی و همچنین تجزیه پذیری بالاتری دارد (۳، ۵، ۱۱). بنابراین تعیین مقدار و نسبت هر کدام از این پروتئین‌ها در مواد خوراکی به دلیل اثر زیادی که بر تجزیه‌پذیری کل پروتئین در شکمبه دارند، محققان را در تأمین الگوی مناسب اسیدهای آمینه وارد شده به روده کوچک کمک می‌کند (۲۱).

تجزیه‌پذیری پروتئین خام کنجاله سویا توسط پژوهشگران متعددی (۱۳، ۱۴، ۲۵) مطالعه شده است، اما اطلاعات کمی دربارهٔ تجزیه‌پذیری پروتئین حقیقی و نوع پروتئین قابل تجزیه کنجاله سویا در شکمبه و قابلیت هضم پروتئین عبوری (پروتئین باقیمانده در کیسه‌ها) کنجاله سویا در ساعات مختلف انکوباسیون وجود دارد. تکنیک SDS-PAGE و دنسیتومتر، امکان مطالعه نوع پروتئین موجود در مواد خوراکی، تعداد زیرواحدهای هر پروتئین و وزن مولکولی زیر واحدها را فراهم می‌کند. روش کیسه‌های نایلونی (*in situ*) نیز با رعایت استانداردهای توصیه شده (۱۶، ۲۱)، به عنوان روش معمول در تعیین تجزیه پذیری پروتئین خام استفاده می‌شود. با تلفیق این دو تکنیک می‌توان تجزیه‌پذیری پروتئین حقیقی و یا زیر واحدهای 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 پروتئین حقیقی، تعیین نوع پروتئین قابل تجزیه کنجاله سویا در شکمبه و اندازه‌گیری قابلیت هضم آن در ساعات مختلف انکوباسیون به روش *in vitro* است.

مواد و روش‌ها

مشخصات و روش تعیین ترکیبات کنجاله سویا

در این مطالعه از کنجاله سویا روغن کشی شده در دمای ۱۴۰ درجه سانتیگراد به روش حلال استفاده شد. تعیین ترکیبات شیمیایی نمونه خشک شده کنجاله سویا پس از آسیاب کردن با آسیاب دارای الک با قطر منافذ ۱ میلی متر صورت گرفت. چربی خام، پروتئین خام و خاکستر به روش AOAC (۲) و NDF به روش ون سوست (۱۹۹۱) بدون استفاده از سولفیت سدیم، استون و آنزیم آلفا آمیلاز اندازه گیری شد. پروتئین حقیقی به روش براد فورد (۱۹۷۶) تعیین شد.

حیوانات مورد استفاده، جیره و شرایط بهداشتی

آزمایش‌های مربوط به مطالعه تجزیه‌پذیری پروتئین خام در سه رأس گاو نر بالغ سیستانی (با متوسط وزن زنده ۲۳± ۳۹۵ کیلوگرم) مجهز به فیستولای شکمبه انجام شد. حیوانات در سطح نگهداری با جیره حاوی ۸۵ درصد علوفه (یونجه خشک) و ۱۵ درصد کنسانتره (ذرت ۲۵٪، جو ۴۶/۷٪، کنجاله تخم پنبه ۱۱/۳٪، کنجاله سویا ۱۵٪، کربنات کلسیم ۱٪، مکمل مواد معدنی ۰/۵٪ و مکمل ویتامین ۰/۵٪) به مقدار ۷ 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 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 باقیمانده در کنجاله

1. Parameters

به طور کامل حذف شد. با استفاده از روش کیسه‌های نایلونی (*in situ*)، مقدار ۵ گرم نمونه کنجاله سویای بدون روغن (اندازه ذرات ۲ میلی‌متر) به مدت صفر، ۲، ۴ ، ۶، ۸ ، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دو تکرار (دو کیسه) برای هر زمان در هر گاو انکوباسیون شد. کیسه‌های مورد استفاده از جنس پلی استر و در ابعاد ۱۰×۵ سانتیمتر با قطر منافذ ۴۵ میکرومتر مطابق استاندارد توصیه شده به وسیله هوپلند و ویزبرگ (۲۰۰۰) بود. پس از طی شدن مدت انکوباسیون، کیسه‌های حاوی نمونه از شکمبه خارج و پس از شستشو با آب سرد به مدت نیم ساعت، تا زمان انتقال به فریز درایر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. با استفاده از فریز درایر نمونه‌ها خشک و سپس توزین شد.

روش استخراج پروتئین

برای استخراج پروتئین جهت انجام الکتروفورز مقداری از کنجاله سویای بدون روغن (اندازه ذرات ۰/۱ میلیمتر) که حاوی ۱ میلی‌گرم نیتروژن بود (تقریباً ۱۲میلی‌گرم ماده خشک کنجاله سویا و باقیمانده در کیسه‌ها) به درون لوله‌های اپندرف منتقل شد. ۷۵۰ میکرولیتر بافر استخراج نمونه SDS-PAGE حاوی ۰/۶۲۵ مولار تریس - اسیدکلریدریک (pH=۶/۸)، ۱۰ درصد سدیم دودسیل سولفات، ۲/۵ درصد بتامرکاپتواتانول، ۷ درصد گلیسرول و ۴ میلی‌گرم بروموفنل بلو اضافه 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.

به منظور تعیین نوع پروتئین‌هائی که در زمان صفر همراه با آب و ذرات جامد(بدون تجزیه شدن) از کیسه‌ها خارج می‌شوند، کیسه حاوی نمونه ۵ گرمی کنجاله سویا در آب معمولی ۳۹ درجه سانتیگراد(دمای شکمبه) به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد. سپس آب منجمد شد و با استفاده از انجماد در خلاء(فریز درایر) مواد حل شده به صورت پودر تبدیل شد و مانند کنجاله سویا و مواد باقیمانده در کیسه‌ها، پروتئین آن استخراج و الکتروفورز شد.

الکتروفورز

الکتروفورز پروتئین‌ها با استفاده از تکنیک SDS-PAGE به روش لاملی(۱۹۷۰) انجام شد. ۲۵ میکرولیتر از مایع بالایی(حاوی تقریباً ۵۰ میکروگرم پروتئین) نمونه‌های انکوباسیون نشده و انکوباسیون شده در شکمبه در ساعات مختلف به چاهک‌های الکتروفورز با ژل بالایی حاوی ۳/۷۵٪ آکریلامید-بیس آکریلامید و ژل پایینی حاوی ۱۲٪ آکریلامید-بیس آکریلامید منتقل شد.

ابعاد ژل۱۴۰ × ۱۱۰ × ۱ میلی‌متر و زمان الکتروفورز ۳ ساعت (تا رسیدن رنگ بروموفنل بلو به لبه پائینی ژل) و شدت جریان ۳۰ میلی آمپر 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، 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.

مارکر پروتئيني و تعيين وزن مولكولي زيرواحدها

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

حرکت نسبی هر پروتئین مارکر در ژل محاسبه و در مقابل لگاریتم وزن مولکولی آن خط استاندارد رسم شد. با قرار دادن حرکت نسبی هر زیرواحد پروتئین کنجاله سویا، لگاریتم وزن مولکولی آن زیرواحد و با آنتی لگاریتم وزن مولکولی زیرواحد تعیین شد.

آزمایش تعیین قابلیت هضم پروتئین خام

قابلیت هضم پروتئین خام کنجاله سویا و مواد باقیمانده در کیسه‌ها در ساعات مختلف انکوباسیون به روش آزمایشگاهی سه مرحله‌ای کالسامگلیا و استرن (۱۹۹۵) اندازه‌گیری گردید. به این منظور ۱ گرم نمونه (اندازه ذرات ۲ میلی‌متر) کنجاله سویای انکوباسیون نشده و انکوباسیون شده در ساعات ۲، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ در شکمبه به درون کیسه‌های نایلونی با ابعاد ۵×۳ سانتیمتر ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال حاوی ۱ گرم در لیتر آنزیم پپسین انکوباسیون گردید. پس از خنثی نمودن اسید با هیدروکسید سدیم ۱ نرمال به مدت ۲۴ ساعت در بافر فسفات با pH=۷/۸ حاوی ۳ گرم پانکرآتین گاوی (تولید شرکت سیگما) در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد (طبق سفارش تولیدکننده) انکوباسیون گردید. پس از سانتریفیوژ g × ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه، پروتئین خام محلول بالایی با روش کلدال تعیین و با فرمول کالسامگلیا و استرن (۱۹۹۵)، قابلیت هضم پروتئین خام برای نمونه انکوباسیون نشده و باقیمانده هر کیسه در ساعات مختلف تعیین شد.

تجزیه و تحلیل آماري داده‌ها

با استفاده از بسته نرم افزاری SAS (۱۹۹۶) و رابطه غیرخطی ۱، فراسنجه‌های مختلف تجزیه‌پذیری و تجزیه‌پذیری مؤثر ماده خشک، پروتئین خام، پروتئین حقیقی و مجموع زیرواحدهای گلیسینین و بتاکنگلیسینین محاسبه گردید.

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

$$ED = a + bc/(c+k) \qquad (۲$$

در این دو رابطه a بخش سریع تجزیه، b بخش کند تجزیه، c ثابت نرخ تجزیه در واحد زمان و P پتانسیل تجزیه پذیری و ED تجزیه‌پذیری موثر ماده خشک، پروتئین خام، پروتئین حقیقی و مجموع زیرواحدها است. با بکاربردن رابطه ۲ تجزیه پذیری مؤثر(ED) ماده خشک، پروتئین خام، پروتئین حقیقی و مجموع زیرواحدها در نرخ‌های عبور ۲، ۵ و ۸ درصد در ساعت (k) محاسبه شد. تجزیه آماری داده‌های مربوط به فراسنجه‌های مختلف تجزیه‌پذیری و تجزیه‌پذیری موثر پروتئین خام، پروتئین حقیقی و مجموع زیرواحدها (هرکدام شش تکرار، سه گاو × دو کیسه در هر گاو)، با استفاده از بسته نرم افزاری SAS (۱۹۹۶)، Proc GLM انجام گردید. پس از تجزیه واریانس، میانگین ها با آزمون چند دامنه دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند (۲۰).

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیائي کنجاله سویا

مقادیر ماده خشک، پروتئین خام، عصاره اتری، خاکستر، دیواره سلولی و پروتئین محلول در بافر بورات-فسفات(pH=۷/۸) کنجاله سویای مورد مطالعه بترتیب ۹۸/۰، ۴۵/۶، ۲/۲، ۷/۳، ۱۴/۳ و ۲۰/۰ درصد بود. پروتئین خام کنجاله سویای مورد مطالعه کمتر از عدد ۴۹/۹ درصد گزارش شده بوسیله انجمن تحقیقات ملی (۲۰۰۱) و ۴۹/۶ درصد گزارش شده بوسیله تونسر و ساکاکلی (۲۰۰۵) می‌باشد. مقدار پروتئین محلول در بافر بورات-فسفات (pH=۷/۸) مطالعه حاضر (۲۰ درصد) بیشتر از مقدار (۱۵ درصد) گزارش شده توسط انجمن تحقیقات ملی (۲۰۰۱) بود.

تجزیه پذیري ماده خشك و پروتئین خام کنجاله سویا

مقادیر بخش سریع تجزیه(a)، بخش کند تجزیه(b)، ثابت نرخ تجزیه(c) و تجزیه پذیری مؤثر ماده خشک، پروتئین خام، پروتئین حقیقی و مجموع زیرواحدهای پروتئین کنجاله سویا در نرخ‌های عبور ۲، ۵ و ۸ درصد در ساعت در جدول ۱ گزارش شده است. تفاوت غیرمعنی‌دار (P >۰/۰۵) بین میانگین فراسنجه‌های مختلف تجزیه‌پذیری و تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام، پروتئین حقیقی و مجموع زیرواحدهای پروتئین کنجاله سویا مشاهده شد.

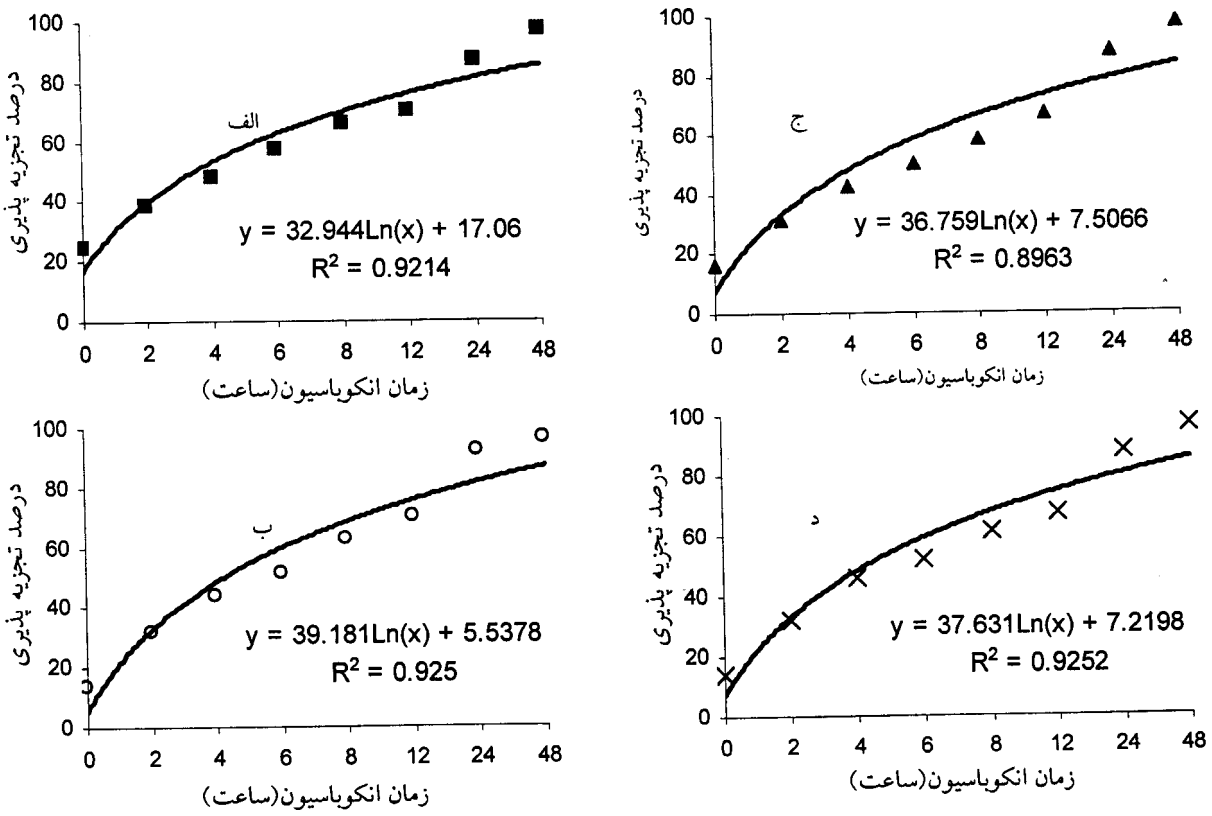
مقادیر تجزیه پذیری موثر پروتئین خام این مطالعه به اعداد مانترولا و همکاران (۲۰۰۱) نزدیک است. تونسر و ساکاکلی (۲۰۰۳) در سرعت عبور ۵ درصد در ساعت، تجزیه پذیری مؤثر پروتئین خام کنجاله سویا را ۵۴/۶ درصد گزارش کرده که از نتایج مطالعه حاضر کمتر است. تامینگا و همکاران (۱۹۹۴) میانگین تجزیه‌پذیری مؤثر پروتئین خام کنجاله سویا ۱۱ آزمایشگاه مختلف را در سرعت عبور ۸ درصد در ساعت، ۶۴ درصد گزارش کردند که از مطالعه حاضر بیشتر است. تفاوت بین نتایج مطالعه حاضر و سایر مطالعات به تفاوت در ترکیب شیمیائی و واریته کنجاله سویا، خصوصیات کیسه‌ها و شرایط انکوباسیون بر می‌گردد.

جدول۱ – فراسنجه‌های مختلف تجزیه‌پذیری و تجزیه‌پذیری موثر ماده خشک و پروتئین کنجاله سویا

	فراسنجه های مختلف تجزیه پذیری			تجزیه پذیری مؤثر(درصد) در سرعت عبور (درصد در ساعت)			
	a	b	c	۲	۵	۸	RSD
	درصد	درصد	درصد در ساعت				
ماده خشک	۲۵/۵۰	۶۹/۹۹	۹/۵۲	۸۳/۳	۷۱/۴	۶۳/۵	۲/۴۷
پروتئین خام	۱۷/۷۸	۸۰/۲۰	۸/۵۳	۸۲/۷	۶۸/۳	۵۹/۲	۱/۶۱
پروتئین حقیقی	۱۶/۶۴	۷۹/۶۱	۹/۷۳	۸۲/۷	۶۹/۲	۶۰/۳	۲/۹۸
مجموع زیر واحدها*	۱۴/۶۴	۸۲/۸۰	۱۰/۱۵	۸۳/۸	۷۰/۱	۶۰/۹	۲/۳۱

عدم درج حروف در هر ستون مربوط به پروتئین خام، پروتئین حقیقی و مجموع زیرواحدها بیانگر نبودن اختلاف معنی دار($P>0/05$) است.

* مجموع زیرواحدهای گلیسینین و بتاکنگلیسینین کنجاله انکوباسیون شده نسبت به انکوباسیون نشده بصورت درصد در ساعات مختلف



شکل ۱- تجزیه‌پذیری ماده خشک (الف)، پروتئین خام (ب)، پروتئین حقیقی (ج) و مجموع زیرواحدهای پروتئین (د) کنجاله سویا

پروتئین حقیقی کنجاله سویا

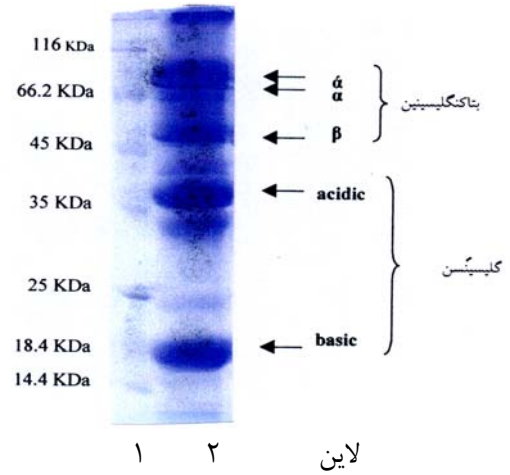
مقدار پروتئین حقیقی کنجاله سویا در مطالعه حاضر برابر ۸۹ درصد پروتئین خام آن بود که به گزارش‌های کوشیاما (۱۹۸۳)، هیل و بریندباخ (۱۹۷۴) و همچنین اوتسومی و همکاران (۱۹۸۱) نزدیک است. با توجه به شکل ۱ تجزیه شدن پروتئین حقیقی کنجاله سویا در ساعات اولیه انکوباسیون کمتر

از پروتئین خام بود، ولی در ساعات بعد تجزیه‌پذیری پروتئین حقیقی بیشتر شد. احتمالاً حل شدن نیتروژن غیرپروتئینی در ساعات اولیه علت این تفاوت باشد.

وزن مولکولي زير واحدهاي پروتئين‌هاي کنجاله سويا

پروتئین‌های با وزن مولکولی بیش از ۱۰۰ کیلودالتون دارای تعدادی زنجیره پلی پپتیدی‌اند که به هریک از زنجیره‌های پلی پپتیدی زیرواحد گفته می‌شود. لاین ۲ در شکل ۲ و لاین ۱ در شکل ۳ الگوی زیرواحدهای پروتئین‌های کنجاله سویای انکوباسیون نشده در شکمبه را نشان می‌دهد. در این مطالعه دو نوع پروتئین عمده در کنجاله سویا شامل گلیسینین و بتاکنگلیسینین مشاهده شد. گلیسینین دارای دو زیرواحد اسیدی (عمدتا دارای اسیدهای آمینه اسیدی) و بازی (دارای اسیدهای آمینه بازی) به ترتیب با وزن مولکولی ۳۷/۶ و ۱۹/۸ کیلودالتون بود.

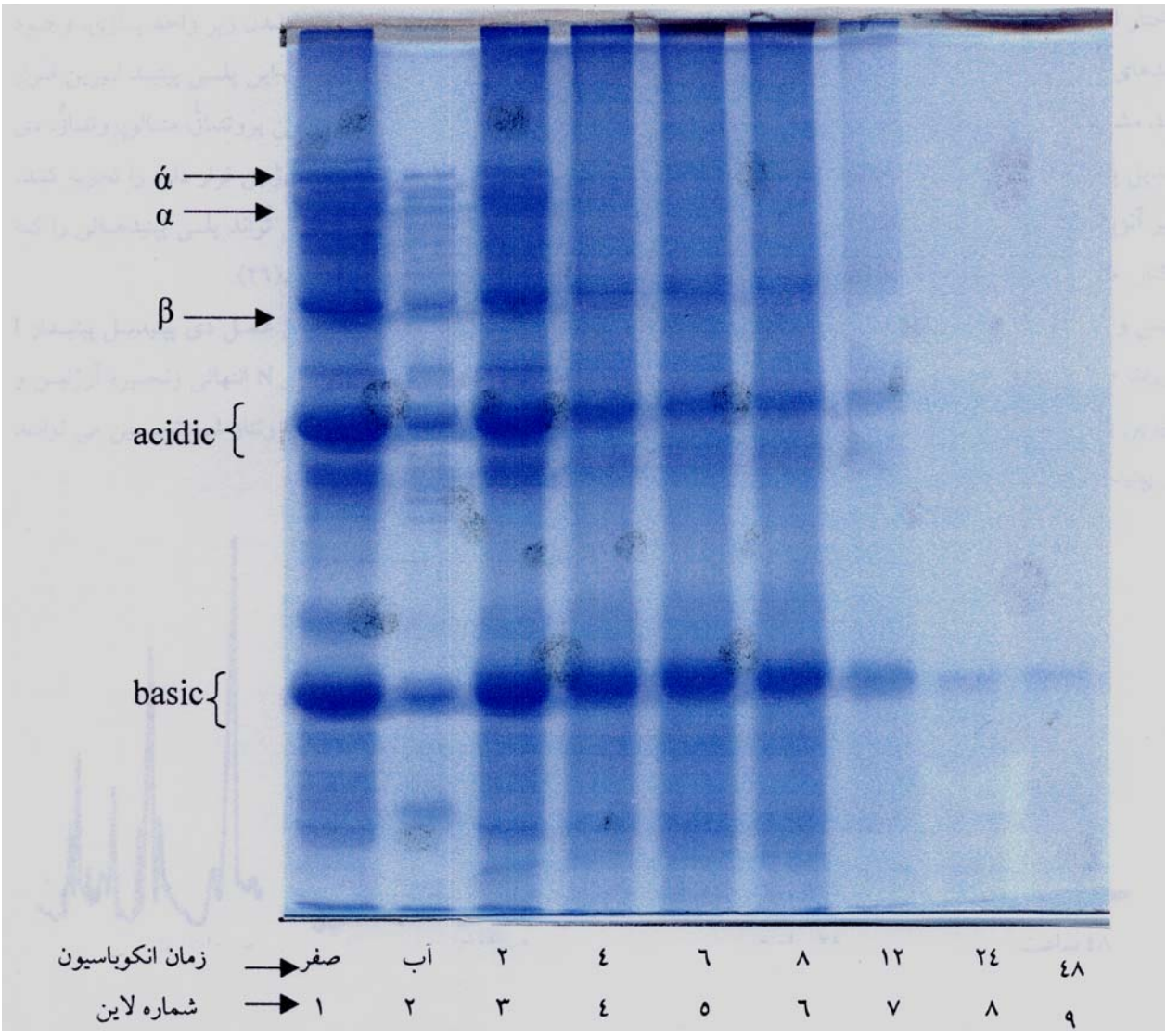
پروتئین بتاکنگلیسینین دارای سه زیرواحد α ، ά و β با وزن مولکولی ۹۰/۵، ۷۱/۵ و۵۵/۲ کیلودالتون بود. این پروتئین بسته به نوع واریته و شرایط تغذیه‌ای گیاه سویا، زیرواحدهای متفاوتی دارد (۲۳، ۲۴). مجموع دو پروتئین عمده کنجاله سویا، بتاکنگلیسینین (۳۱ درصد) و گلیسینین (۳۸/۸ درصد) تقریباً ۶۹/۸ درصد کل پروتئین کنجاله سویا را شامل می‌شود که به عدد (۷۰ درصد) گزارش شده توسط کوشیاما (۱۹۸۳) و اوتسومی و همکاران (۱۹۸۱) نزدیک است. وزن مولکولی پروتئین کنجاله سویا مطالعه حاضر و مطالعه سایر محققان در جدول ۲ آمده است. تفاوت‌هایی بین وزن مولکولی زیرواحدهای کنجاله سویای مطالعه حاضر با سایر مطالعات و همچنین بین مطالعات دیگران(۱۱، ۲۶) وجود دارد. دلیل آن به هتروژنسیتی که خصوصیت ذاتی پروتئین‌های عمده سویا است، همچنین شرایط الکتروفورز نمونه‌ها، غلظت ژل و وزن مولکولی استاندارد (مارکر پروتئینی) مربوط می‌شود (۹، ۲۳).



شکل۲- الگوی زیرواحدهای مارکر پروتئینی و کنجاله سویا انکوباسیون نشده

جدول ۲- وزن مولکولی زیرواحدهای پروتئین های کنجاله سویا(کیلودالتون)

زیرواحد	پژوهش حاضر	اوتسومی و همکاران(۱۹۸۱)	کوشیاما و همکاران(۱۹۸۳)	درصد از کل پروتئین (نتایج دنسیتومتری)	نرخ تجزیه (درصد در ساعت)
بتاکنگلیسینین				۳۱	
ά	۹۰/۵	۸۹/۱	۹۳/۲	۹/۷	›۵۰
α	۷۱/۵	۸۲/۵	۷۲/۴	۹/۵	›۵۰
β	۵۵/۲	۵۳/۶	۴۸/۴	۱۱/۸	۱۶/۹
گلیسینین				۳۸/۸	
اسیدی	۳۷/۶	۳۳/۰	۳۶/۳-۳۸/۹	۱۹/۲	۱۴/۷
بازی	۱۹/۸	۱۴/۱	۱۸-۲۰	۱۹/۶	۹/۸



شکل۲ - الکتروفورز ژل پلی آکریلامید کنجاله سویا انکوباسیون شده در شکمبه در ساعات مختلف

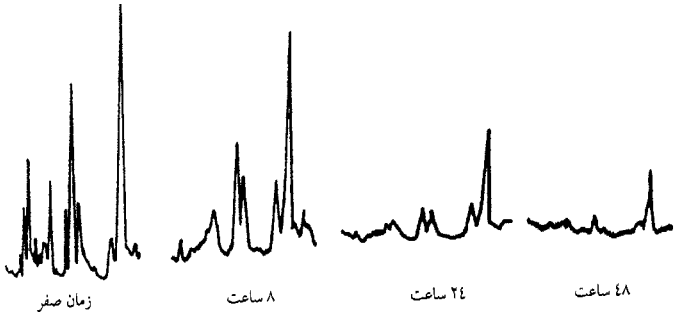
آناليز الكتروفورزي تجزيه پذيري پروتئين‌هاي كنجاله سويا

آنالیز ژل ۱۲٪ سدیم دودسیل سولفات- الکتروفورز ژل پلی آکریلامید(SDS-PAGE) در شکل ۳ و نمودار دنسیتومتر در شکل ۴ نشان داده شده است. زیرواحد α و ά پروتئین بتاکنگلیسینین کنجاله سویا پس از ۴ ساعت و زیرواحد β این پروتئین بعد از ۱۲ ساعت انکوباسیون، به وسیله میکروارگانیسم‌های شکمبه به طور کامل تجزیه می‌شود. یکی از دلایل کمتر بودن تجزیه‌پذیری زیر واحد β پروتئین بتاکنگلیسینین نسبت به دو زیرواحد α و ά وجود لوسین در نیتروژن انتهایی آن می‌باشد. والیس و مک کین (۱۹۹۱) گزارش کردند درصورتی که لوسین در N انتهائی زنجیره پلی پپتیدی باشد، باکتری پریوتلا رومینوکولا نمی‌تواند آن را تجزیه کند.

زیرواحد اسیدی و بازی گلیسینین نسبت به زیرواحدهای پروتئین بتاکنگلیسینین آهسته‌تر تجزیه می‌شود و قسمت عمده پروتئین عبوری کنجاله سویا را تشکیل می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر، گزارش لینچ و همکاران (۱۹۸۸) را تأیید می‌کند. این محققان گزارش کردند که باکتری پریوتلا رومینوکولا، پروتئین‌های سویا با وزن مولکولی زیاد را نسبت به پروتئین‌های با وزن مولکولی کم سریعتر تجزیه می‌کند. آهسته‌تر تجزیه شدن گلیسینین به وسیله آنزیم‌های پروتئولیتیک میکروارگانیسم‌های

شکمبه مربوط به باند دی سولفیدی آن است که سبب متصل شدن دو زیرواحد اسیدی و بازی می‌شود (۳، ۵). همان طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، پلی پپتید بازی گلیسینین نسبت به پلی پپتید اسیدی به تجزیه شدن مقاوم‌تر است. دلیل آن به آب گریزتر بودن پلی پپتید بازی نسبت به پلی پپتید اسیدی مربوط می‌شود. هرچه یک پلی پپتید آب گریزتر باشد، ساختار آن متراکم‌تر می‌شود و تجزیه شدن آن کاهش می‌یابد (۹). از دلایل دیگر آهسته‌تر تجزیه شدن زیرواحد بازی، وجود اسیدهای آمینه لیزین و آرژنین در قسمت N انتهایی این پلی پپتید است. مشخص شده است که باکتری‌های پروتئولیتیک بویژه پریوتلا رومینوکولا دارای فعالیت سیستئین پروتئاز، دی پپتیدیل پپتیداز و گلی تامیل ترانسفراز می‌باشند و نمی‌توانند پپتیدهایی را که در قسمت نیتروژن انتهایی، لیزین یا آرژنین دارند را تجزیه کنند. سایر آنزیم‌های پروتئولیتیک نیز چنین خصوصیتی را نشان می‌دهند (۳۰).

آلن (۱۹۸۹) گزارش کرد که تریپسین نمی‌تواند پلی پپتیدهای دارای اسید آمینه لیزین و اسیدهای آمینه اسیدی (بویژه اسیدگلوتامیک) در مجاور هم را به طور کامل تجزیه کند. والیس و مک‌کین (۱۹۹۱) گزارش کردند که مکانیسم عمده تجزیه پلی پپتیدها در شکمبه از طریق عمل دی پپتیدیل پپتیداز I صورت می‌گیرد. این آنزیم دی پپتیدها را از نیتروژن انتهایی زنجیره پلی پپتیدی جدا می‌کند، ولی وقتی در نیتروژن انتهایی زنجیره آرژنین و یا لیزین باشد، این فعالیت متوقف می‌شود. بنابر گزارش وارد (۱۹۸۳) فقط آنزیم سیستئین پروتئاز شبه پاپائین و متالوپروتئاز (پروتئیناز Π) می‌تواند این نوع زنجیره‌های پلی پپتیدی را تجزیه کند.



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

همانطور که در لاین ۱ شکل ۳ مشاهده می‌شود، تعدادی باند کوچک بین زیرواحد آلفا و بتا پروتئین بتاکنگلیسینین در مطالعه حاضر و همچنین در بعضی مطالعات (۷، ۲۳) مشاهده شده است. در مطالعه حاضر این باندها در زمان ۴ انکوباسیون به طور کامل ناپدید شدند. با استفاده از تکنیک‌های ایمونولوژیکی و ژنتیکی، بارتون و همکاران (۱۹۸۲) نشان دادند که این باندها نتیجه پروتئولیز می‌باشند. به دلیل تجاری بودن کنجاله سویای مورد مطالعه، اطلاعی از مدت زمان بین تولید دانه تا روغن کشی و همچنین شرایط ذخیره دانه سویا در انبار از نظر رطوبت و حرارت در دسترس نبود. این باندها ممکن است به پلی پپتیدهای حاصل از تجزیه زیرواحدهای ά و α بوسیله آنزیم‌های پروتئولیز موجود در دانه سویا مربوط باشد. در لاین ۱ شکل ۳ همچنین یک باند پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۱۰ کیلو دالتون (بالاتر از زیرواحد ά) وجود داشت. این باند متعلق به آنزیم لیپوکسیژناز است. این آنزیم سبب تشکیل هیدروپراکسیدها با افزودن اکسیژن به پیوندهای دوگانه اسید لینولئیک و اسید لینولنیک می‌شود. هیدروپراکسیدها منجر به اکسیداسیون لیپیدها و تشکیل ترکیبات بودار در فرآورده‌های سویا از جمله کنجاله آن می‌شود (۲۷). این آنزیم پس از ۲ ساعت انکوباسیون در شکمبه به طور کامل تجزیه شد.

لاین ۲ شکل ۳ الگوی زیرواحدهای پروتئین کنجاله سویا که پیش از انکوباسیون در شکمبه، با شستشو از کیسه‌ها خارج می‌شود را نشان می‌دهد. بخش زیادی از پروتئین کنجاله سویا بدون این که به وسیله آنزیم‌های میکروارگانیسم‌ها تجزیه شود، در زمان شستشو و پیش از انکوباسیون در شکمبه از کیسه‌ها خارج می‌شود. این یافته گزارش هوپلند و ویزبرگ (۲۰۰۰) دربارهٔ معایب روش کیسه‌های نایلونی را تأئید می‌کند. اطلاعات کمی درباره سرنوشت بخش محلول پروتئین مواد خوراکی در شکمبه وجود دارد.

لاین ۶ شکل ۳ الگوی زیرواحدهای پروتئین کنجاله سویا را در زمان انکوباسیون ۸ ساعت نشان می‌دهد. در این لاین قسمتی از زیرواحد β پروتئین بتاکنگلیسینین و بخش عمده پلی پپتیدهای اسیدی و بازی گلیسینین هنوز تجزیه نشده است. با این فرض که میزان رقیق شدن بخش مایع شکمبه

۰/۱۲ در ساعت باشد، زمان ماندگاری بخش مایع در شکمبه ۸/۳ ساعت می‌شود. نتایج دنسیتومتری لاین ۶ در مقایسه با لاین ۱ (شکل ۳) نشان داد که تقریباً ۵۳ درصد پروتئین کنجاله سویا پس از ۸ ساعت انکوباسیون در شکمبه دست نخورده از شکمبه می‌تواند عبور کرده و در تأمین پروتئین قابل متابولیسم مورد نیاز نشخوارکنندگان سهیم باشد.

بنابراین وقتی کنجاله سویا به عنوان مکمل پروتئینی به جیره نشخوارکنندگان اضافه می‌شود، زیرواحد اسیدی و بازی گلیسینین و تا حدودی زیرواحد β پروتئین بتاکنگلیسینین و چند پپتید با وزن مولکولی کمتر از ۲۳ کیلودالتون بخش قابل ملاحظه‌ای از پروتئین قابل متابولیسم را تشکیل می‌دهد. همچنین دنسیتومتری لاین ۷ شکل ۳ نشان داد که پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون، حدود ۳۱ درصد پروتئین‌های سویا که عمدتاً زیرواحدهای اسیدی و بازی گلیسینین و بخش کمی از زیرواحد β پروتئین بتاکنگلیسینین است، تجزیه نشده و از شکمبه به روده منتقل می‌شود.

قابلیت هضم درون شیشه‌اي (*in vitro*)

قابلیت هضم درون شیشه‌ای(*in vitro*) پروتئین خام کنجاله سویای انکوباسیون نشده و مواد باقیمانده در کیسه‌ها پس از ۲، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون در شکمبه به ترتیب ۶۹/۷، ۷۰/۷، ۸۳/۲، ۸۰/۴، ۹۴/۲ و ۹۶/۸ درصد بود. با افزایش زمان انکوباسیون کنجاله سویا در شکمبه، قابلیت هضم پروتئین خام باقیمانده در کیسه‌ها افزایش نشان داد. دلیل افزایش قابلیت هضم پروتئین خام با افزایش زمان انکوباسیون کنجاله سویا در شکمبه برای ما مشخص نیست. احتمالاً حذف عوامل ضدمغذی بویژه لکتین‌ها و غیرفعال شدن مهارکننده‌های آنزیم تریپسین علت افزایش قابلیت هضم باشد (۸).

نتیجه کلي

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از تکنیک SDS-PAGE و دنسیتومتر برای ارزشیابی و مطالعه روند تجزیه‌پذیری پروتئین مواد خوراکی در شکمبه، اطلاعات دقیق و مفیدی در جهت درک بهتر هضم و تجزیه پروتئین در شکمبه، برآورد و تامین پروتئین قابل متابولیسم مورد نیاز حیوان و تنظیم جیره نشخوارکنندگان در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهد. همچنین در این مطالعه مشخص شد که تفاوت غیرمعنی‌دار ($P > ۰/۰۵$) بین نتایج تجزیه‌پذیری موثر پروتئین خام و پروتئین حقیقی کنجاله سویا وجود دارد.

سپاسگزاری

از همکاری و مساعدت مدیریت گروه علوم دامی دانشگاه تهران آقای مهندس ابولفضل زالی سرپرست ایستگاه تحقیقات دامپروری که امکان انجام آزمایش *in situ* را فراهم کردند، معاونین محترم مالی و پژوهشی واحد علوم و تحقیقات به جهت تأمین مالی، از زحمات سرکار خانم مهندس شورنگ به جهت کمک در انجام آزمایش‌های *in situ* و کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی واحد علوم و تحقیقات سرکارخانم مهندس موسوی به جهت کمک در انجام الکتروفورز عمودی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Allen, G. 1989. Sequencing of Proteins and Peptides. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
2. AOAC.1990. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 15th ed. Washington, DC. USA.
3. Barton, K. A., J. F. Thompson, J. T. Madison, R. Rosenthal, N. P. Jarvis, & R. N. Beachy. 1982. The biosynthesis and processing of high molecular weight precursors of soybean glycinin sub-units. J. Biol. Chem. 257: 6089.
4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248.
5. Bradley, R. A., D. Atkinson, H. H. Hauser, D. Oldani, J. P. Green, & J. M. Stubbs. 1975. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. Biochim. Biophys. Acta 412:214.

6. Calsamiglia, S. & M.D. Stern. 1995. A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. J.Anim.Sci.73: 1459.
7. Hill J.E. & R.W. Breidenbach.1974. Proteins of soybean seeds. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. Plant Physiol. 53:742–746.
8. Hoffmann, E. M., S. Muetzel, & K. Becker. 2003.The fermentation of soybean meal by rumen microbes in vitro reveals different kinetic features for the inactivation and the degradation of trypsin inhibitor protein. Anim. Feed Sci. and Tech. 106: 189–197
9. Hu, B. & A. Esen. 1981. Heterogeneity of soybean seed proteins: One-dimensional electrophoretic profiles of six different solubility fractions. J. Agric. Food Chem. 29:497.
10. Hvelplund T. & 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.
11. Koshiyama, I. 1983. Storage proteins of soybean. In: W. Gottschakand H. P. Muller (Ed.) Seed ProteinsL: Biochemistry, Genetics, and Nutritive Value. p 156. W. Junk, The Hague, The Netherlands.
12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680.
13. Lynch, G. L., L. L. Berger, & G. C. Fahey, Jr. 1988. Effects of ethanol, heat, and lipid treatment of soybean meal on nitrogen utilization by ruminants. J. Dairy Sci. 70:91.
14. Manterola, H.B., D.A. Cerda, & J.J. Mira.2001. Protein degradability of soybean meal coated with diferent lipid substances and its effect on ruminal parameters when included in steer ration. Anim. Feed Sci. and Tech.92: 249-257.
15. National Research Council, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle seventh revised ed. National Academy of Sciences, Washington, DC.
16. Olaisen, V., T. Mejdell, H. Volden, & N. Nesse.2003.Simplified *in situ* method for estimating ruminal dry matter and protein degradability of concentrates. J. Anim. Sci. 81:520–528.
17. Orskov, E.R. & McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. 92, 499–503.
18. SAS Institute Inc., 1996. Statistical Analysis System (SAS) User's Guide, SAS Institute, Cary, NC, USA.
19. Sniffen, C., J. O'Connor, P. Van Soest, D. Fox & J. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. J. Anim. Sci. 70, 3562–3577.
20. Steel, R.G.D. & J.H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach, 2nd ed., McGraw Hill, New York, NY, USA, pp. 187-188.
21. Stern, M. D., Bach A. & S. Calsamiglia. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. J.Anim.Sci. 75:2256.
22. Tamminga, S., W. Van Straalen, A. J. P. Subnel, R. G. M., Meijer, A. Steg, C. J. G. Wever, & M. C. Blok. 1994. The Dutch protein evaluation system: the DVE/OEB-system. Livestock Prod. Sci. 40, 139–155.
23. Thanh, V. H. & K. Shibasaki. 1976. Heterogeneity of β-conglycinin. Biochim. Biophys. Acta 439:326.
24. Thanh, V. H. & K. Shibasaki, 1977. Beta-conglycinin from soybean properties: Isolation and immunological and physiochemical properties of the monomeric forms. Biochim. Biophys. Acta490:370.
25. Tuncer, S.D. & P. Sacakli. 2003. Rumen degradability characteristics of xylose treated canola and soybean meals. Anim. Feed Sci. and Tech. 107 : 211–218.
26. Utsumi, S., H. Iuaba, & T. Mori. 1981. Heterogeneity of soybean glycinin. Phytochemistry 20:585.
27. Utsumi,S., Y. Matsumura, & T. Mori. 1997. Structure–function relationships of soy proteins. Food proteins and their applications (pp.257 –291). New York: Dekker.
28. Van Soest, P.J., J. B. Robertson, & 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.

29. Van Soest, P.J. 1994.Nutritional Ecology of the Ruminants. 2nd Edition. p.294. Cornell University Press. NY. USA.
30. Wallace, R. J. & N. McKain. 1991. A survey of peptidase activity in rumen bacteria. J. Gen. Microbiol. 137:2259.
31. Ward, O. P. 1983. Proteinases. In: W. M. Fogarty (Ed.) Microbial Enzymes and Biotechnology. p 251. Applied Science Publishers, London.

A Study of Protein Degradation Kinetics in Soybean Meal by Used of Nylon Bags And SDS-PAGE Techniques

A.A. SADEGHI[1], A. NIKKHAH[2] AND M. MORADI SHAHREBABAK[3]
1, Ph. D. Student, Islamic Azad University, 2, 3, Professor and Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran- Karaj
Accepted. Sep. 29, 2004

SUMMARY

This study was carried out to determine soybean meal dry matter (DM), crude protein (CP), true protein (TP) and protein subunits degradation characteristics by using nylon bags and SDS-PAGE techniques. Nylon bags containing five grams of defatted soybean meal (in duplicates) were suspended in the rumen from 0 to 48 h. After incubation, bags were removed, washed and freeze dried. DM, CP, TP, protein subunits and densitometric scanning patterns in each sample were determined. The rumen DM, CP, TP and subunits summation degradability of soybean meal at rumen outflow rates of 2, 5 and 8 % were 83.3, 71.4, 63.5% (for DM); 82.7, 68.3, 59.2% (for CP); 82.7, 69.2, 60.3% (for TP) and 83.7, 70.1, 60.9 (for summation of subunits) respectively. No significant differences (P>0.05) among effective rumen degradability values in CP, TP as well as summation of subunits components were observed at different rumen outflow rates. From it is revealed that, slab gel analysis, soybean meal proteins are composed of two major components, β-conglycinin and glycinin, accounting for approximately 31 and 38.8 percent of the total meal protein, respectively. Both proteins are multisubunits. The molecular weight of 90.5, 71.5, 55.2 KDa for ά, α, β subunits of β-conglycinin and 37.6, 19.8 KDa for acidic and basic states of glycinin were estimated in this study. Electrophoretic and densitometric analysis of protein residues revealed that conglycinin α & ά subunits were degraded completely within 2 h, whereas β subunit of β-conglycinin (12 h) as well as the acidic (24 h) and basic (48 h) polypeptide components of glycinin were more resistant to degradation. In addition, the basic polypeptides in glycinin were shown to be more resistant to degradation than acidic polypeptides. *In vitro* digestibility of CP residues was increased as incubation time increased. Digestibility values of CP residues at 0, 8, 12 and 48h of incubation time were 69.7, 83.2, 94.2 and 96.8 percent, respectively. In conclusion, through SDS-PAGE it was indicated that the basic subunits of glycinin make an appreciable contribution to metabolizable protein when soybean protein is fed to ruminants. This methodology can not only be used to predict ruminal degradation directly and accurately, but also to determine and assess the type of proteins that will escape the rumen.

Key words: Soybean meal, Degradation, Crude protein, True protsein, SDS-PAGE.