بررسی خصوصیات پروتئین‌های محلول در هفت گونهٔ علوفه‌ای با استفاده از تکنیک SDS-PAGE

علی محرری[1]

چکیده

پنج نوع علوفه شامل یونجهٔ آفتاب خشک، شبدر، اسپرس، توت‌روباه و ذرت سیلو شده همراه با دو نوع علوفهٔ مرتعی شامل *Lolium perenne* و *Glyceria plicata* fries به منظور تعیین درصد پروتئین محلول و تأثیر این نوع پروتئین بر تجزیه‌پذیری آنها مورد آزمایش واقع شدند. بعد از عصاره‌گیری علوفه با آب فاقد یون (دیونیزه)، پروتئین محلول در آب اندازه‌گیری و رسوب داده شد و از آن برای ژل الکتروفورز استفاده گردید. از باقیماندهٔ مواد حاصل از عصاره‌گیری نیز به منظور تعیین قابلیت تجزیه‌پذیری در آزمایشگاه (*in vitro*) با اندازه‌گیری گاز تولیدی، مورد استفاده قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که بالاترین درصد پروتئین محلول (تصحیح شده برای کل پروتئین موجود در نمونه) مربوط به علوفه توت روباه (۵/۳۴٪) و کمترین درصد پروتئین محلول مربوط به علوفهٔ مرتعی *Glyceria plicata* fries (۳/۶۴٪) بود که اختلاف بین این دو از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). ترسیب پروتئینهای محلول در آب یونجه، اسپرس، ذرت سیلو شده و گونهٔ مرتعی لولیوم با استن ۷۵٪ انجام و با استفاده از تکنیک SDS-PAGE جداسازی پروتئین‌ها صورت گرفت. باقیمانده‌های ناشی از عصاره‌گیری با آب نیز هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های کامل از نظر تولید گاز ندارند که این خود دلالت بر عدم نقش مؤثر پروتئین‌های محلول در آب بر تجزیه‌پذیری مواد علوفه‌ای در شکمبه دارد.

واژه‌های کلیدی: علوفه، پروتئین‌های محلول، ژل الکتروفورز و تولید گاز.

۱- دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی alimoh@mailcity.com

مقدمه

قسمت بیشتر خوراک دام‌ها را مواد علوفه‌ای تشکیل می‌دهد. پروتئین یکی از مواد مغذی مهم مورد نیاز دام است که کمبود آن سبب وارد آمدن صدمات جدی به تولید و سلامت دام می‌گردد. پروتئین‌های محلول مواد علوفه‌ای از نظر تجزیه‌پذیری در شکمبه تفاوت‌های آشکاری با یکدیگر دارند (Nugent و همکاران، ۱۹۸۳). حلالیت و خصوصیات ساختمانی پروتئین نظیر، پیوندهای دی‌سولفیدی، شارژ سطحی، آب گریزی[1] و چین‌های ساختاری، همگی نقش تعیین کننده‌ای بر تجزیه‌پذیری آنها در شکمبه باقی می‌گذارد (Nugent و همکاران، ۱۹۸۳ و Nugent و Mangan، ۱۹۸۱). بنابراین ارزش استفاده از پروتئین محلول به عنوان شاخصی در تعیین تجزیه‌پذیری آن محدود می‌گردد (Peltekova و Broderick، ۱۹۹۶). افزون بر این اگر در تعیین پروتئین محلول از روش اندازه‌گیری کل نیتروژن استفاده شود در این صورت بین پروتئین محلول و نیتروژن غیرپروتئینی نمی‌توان تفاوتی قائل شد. از این رو علاوه بر تعیین پروتئین واقعی، استفاده از تکنیک الکتروفورز می‌تواند تأثیر فرآیندهای مختلف را بر حلالیت پروتئین علوفه‌ها به‌طور دقیق نشان دهد (Fairbairn و همکاران، ۱۹۸۸؛ Grumو همکاران، ۱۹۹۱ و Makoni و همکاران، ۱۹۹۳).

استفاده از روش اندازه‌گیری گاز تولیدی در شرایط آزمایشگاه نیز می‌تواند تجزیه‌پذیری مواد علوفه‌ای را تحت شرایط مختلف با صرف کمترین هزینه و وقت نشان دهد.

با عنایت به این مقدمه، هدف از انجام آزمایش حاضر تعیین میزان پروتئین حقیقی محلول در آب در عمده‌ترین مواد علوفه‌ای مورد مصرف دام همراه با تعیین کیفیت این

[1]- Hydrophobicity

نوع پروتئین از نظر ساختار مولکولی بوده است. افزون بر این، بررسی تأثیر عصارهٔ آبی (مواد محلول در آب) در تجزیه‌پذیری علوفه‌ها هدف دیگر آزمایش بوده است.

مواد و روشها

پنج نوع علوفه شامل یونجه، شبدر، اسپرس، توت‌روباه و ذرت سیلوشده همگی از مزرعهٔ دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد تهیه شد و دو گونهٔ مرتعی شامل *Lolium perenne* و *Glyceria plicata* fries نیز از مراتع استان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بعد از خشک شدن در آون تحت خلاء، آسیا شده و از توری نمرهٔ ۰/۹ میلیمتر عبور داده شدند. نمونه‌های تحت آزمون شامل برگ و ساقهٔ یک گیاه کامل بودند. استخراج پروتئین محلول در آب با استفاده از روش Peltekova و Broderick (۱۹۹۶) انجام گردید و برای تعیین پروتئین محلول در آب از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده شد. پروتئین کل نمونه‌ها نیز با استفاده از روش کلدال تعیین گردد. از آن‌جایی‌که برخی از پروتئین‌های محلول در آب با محلول ۲۰٪ پلی‌اتیلن‌گلایکول رسوب تولید نکردند از استن برای ترسیب پروتئین محلول استفاده گردید. سپس پروتئین ترسیب شده با روش ژل الکتروفورز جداسازی شد. اما این روش قادر به جداسازی پروتئین نبود، بنابراین روش SDS-PAGE برای جداسازی پروتئین‌های ترسیب شده بکار گرفته شد. بر اساس این روش بعد از محلول نمودن پروتئین ترسیب شده در بافر مخصوص نمونه[1]، به اندازه ۲۰ میکرولیتر از این محلول در هر چاهک ژل که غلظتی برابر ۱۲/۵٪ داشت، قرار داده شد. در چاهک استاندارد نیز مخلوط پروتئین با اوزان مولکولی ۹۷، ۶۷، ۵۵، ۴۲، ۳۱ و ۲۱ قرار داده شد. بعد از پایان الکتروفورز، ژل حاصل با نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید.

[1]- Sample buffer

به منظور تولید گاز، شیرابهٔ شکمبهٔ لازم برای انجام این قسمت از آزمایش از یک رأس گاو مادهٔ غیر شیرده که خوراکی حاوی ۵۰٪ کاه و ۵۰٪ کنسانتره را به‌صورت کاملاً مخلوط دریافت می‌کرد، گرفته شد. به‌این‌منظور از حیوان مورد نظر حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر شیرابهٔ شکمبه با استفاده از تکنیک نمونه‌برداری از شکمبه با سوزن[1] گرفته شد و در شرایط بی‌هوازی به آزمایشگاه تغذیهٔ دام و بیوتکنولوژی دانشکدهٔ کشاورزی انتقال داده شد. نمونهٔ شیرابه به نسبت ۱ به ۵ با بزاق McDougal (۱۹۴۹) مخلوط شده و بعد به اندازهٔ ۶ میلی‌لیتر از این محلول به لوله‌هایی که هر کدام حاوی ۰/۲۵ گرم نمونهٔ کامل علوفه یا نمونهٔ عصاره‌گیری شده با آب بودند، ریخته شد. در لوله‌ها با درپوش لاستیکی کاملاً مسدود گردید و در داخل اینکوباتور مجهز به مخلوط کننده در دمای ۳۹ درجهٔ سانتیگراد قرار داده شدند. سپس هر ۱/۵ ساعت فشار گاز موجود در لوله‌ها با استفاده از مانومتر اندازه‌گیری و ثبت شدند. این عمل به مدت ۲۴ ساعت انجام گردید و در انتهای این قسمت از آزمایش، تمامی لوله‌ها با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و pH و آمونیاک موجود در مایع فوقانی موجود در لوله‌ها اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: مقایسهٔ بین پروتئین محلول موجود در نمونه‌ها در یک طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS (۱۹۸۸) انجام پذیرفت و مقایسه میانگین با آزمون دانکن انجام شد. به علت مقادیر متفاوت پروتئین خام موجود در نمونهٔ کامل از این عامل به عنوان کوواریت استفاده شد و سپس تجزیه و تحلیل انجام پذیرفت. در قسمت تولید گاز، صفات اندازه‌گیری شده از طریق t–جفتی تجزیه و تحلیل آماری شدند. سطح ۵٪ ملاک برای وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

[1]- Ruminocentesis

نتایج

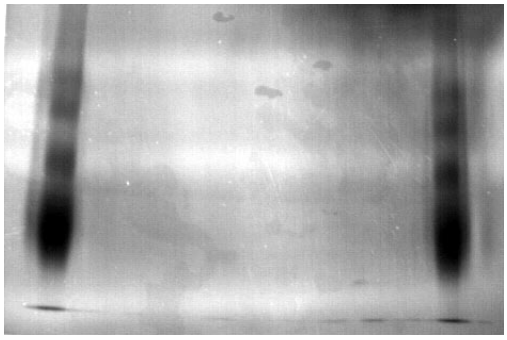
داده‌های مربوط به پروتئین کل و پروتئین محلول در آب نمونه‌های تحت آزمایش در جدول شماره ۱ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین درصد پروتئین محلول در آب مربوط به علوفهٔ توت روباه است و کمترین درصد مربوط به *Glyceria plicata* fries می‌باشد که اختلاف موجود بین آنها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در مورد پروتئین محلول در آب علوفه‌های یونجه، اسپرس، ذرت سیلو شده و لولیوم پرنه، محلول ۲۰٪ پلی‌اتیلن‌گلایکول نتوانست سبب ترسیب پروتئین شود، حتی افزایش حجم این محلول به بیش از ۲۵٪ حجم نمونهٔ تحت آزمایش نیز نتوانست سبب ترسیب پروتئین شود. اما محلول ۷۵٪ استن که دمای آن تا ۲۰- درجهٔ سانتیگراد تقلیل داده شده بود توانست در تمامی نمونه‌ها رسوب پروتئین ایجاد کند (جدول شماره ۱). در این ارتباط Peltekova و Broderick (۱۹۹۶) توانستند پروتئین محلول در آب علوفهٔ یونجه را با استفاده از محلول‌های ۲۰٪ و ۵۰٪ سولفات آمونیوم رسوب دهند. اما بعد از ترسیب پروتئین محلول با سولفات آمونیوم ۵۰٪، افزایش غلظت سولفات آمونیوم تا ۱۰۰٪ نتوانست سبب ترسیب پروتئین قابل الکتروفورز از نمونه‌های یونجهٔ آفتاب خشک و یونجهٔ سیلو شده شود.

جدول شماره ۱- برخی از خصوصیات پروتئین محلول در آب نمونه‌های تحت آزمون.

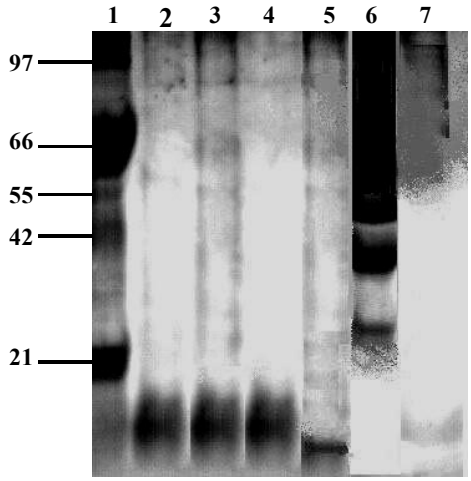
	نمونهٔ علوفه						
	یونجه	شبدر	اسپرس	توت‌روباه	ذرت‌سیلو شده	لولیوم	*Glyceria plicata* fries
پروتئین خام (٪)	۱۶/۳۰	۱۹/۰۰	۱۶/۷۰	۱۶/۷۲	۷/۹۰	۸/۶۰	۸/۹۰
پروتئین محلول در آب (٪)	۴/۵۰ c	۴/۹۸ b	۴/۰۸ b	۵/۳۴ a	۳/۹۸ b	۵/۱۷ ab	۳/۶۴ c
پروتئین محلول از کل پروتئین	۲۷/۵۹ c	۲۶/۲۳ bc	۲۴/۴۰ bc	۳۱/۹۴ b	۵۰/۴۱ b	۶۰/۱۶ a	۴۰/۹۵ c
ترسیب با پلی‌اتیلن‌گلایکول	+	+	-	+	-	-	+
ترسیب با استن	+	+	+	+	+	+	+

در هر ردیف اعدادی که دارای حروف مشترک نمی‌باشند از نظر آماری با هم تفاوت دارند (P<۰/۰۵). در مورد پروتئین خام تجزیه و تحلیل آماری انجام نشد.

الکتروفورز نمونه‌های پروتئین در روش پروتئین غیر تغییر ماهیت یافته نتوانست توسط ژل ۷/۵٪ بدون استفاده از SDS جداسازی شود (شکل شماره ۱). اما استفاده از SDS-PAGE سبب جداسازی پروتئین‌های محلول شد (شکل شماره ۲). الگوی مشاهده شده در شکل شماره ۲ نشان می‌دهد که پروتئین با کمتر از kDa–۲۱ (حدود – ۱۸kDa) در یونجه، شبدر و اسپرس موجود است. اما پروتئین با وزن kDa–۱۵ در توت روباه وجود دارد. الگو در مورد ذرت سیلو شده متفاوت است. پروتئین محلول در این علوفه طیف متنوعی از پروتئین با اوزان مولکولی مختلف را نشان می‌دهد. اما در این نمونه پروتئین با وزن مولکولی کمتر از kDa–۲۱ مشاهده نمی‌شود.



شکل شماره ۱- الکتروفورز پروتئین محلول بدون استفاده از SDS. به غیر از دو طرف تصویر که پروتئین‌های استاندارد را نشان می‌دهد، باند دیگری دیده نمی‌شود.



شکل شماره ۲- الکتروفورز نمونه‌های پروتئین با کمک SDS. نمونه‌های ۱تا ۷ به ترتیب مربوط به پروتئین‌های استاندارد، یونجه، شبدر، اسپرس، توت‌روباه، ذرت سیلو شده و لولیوم پرنه است.

همان‌طور که از داده‌های جدول ۲ مشخص می‌شود، عصاره‌گیری با آب نتوانست حجم گاز تولیدی را در نمونه‌های عصاره‌گیری شده به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. در همین ارتباط عصاره‌گیری سبب شد که اسیدیته شیرابهٔ نهایی حاصل از هضم میکروبی بالاتر از نمونه‌های کامل باشد که اختلاف بین این دو از نظر آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۱). آمونیاک موجود در شیرابهٔ نهایی حاصل از هضم وضعیت متفاوتی را نسبت به اسیدیته نشان می‌دهد و آن اینست که آمونیاک تولیدی بر حسب میکروگرم به ازای هر گرم مادهٔ خشک علوفه (یا عصارهٔ علوفه) در نمونه‌های کامل بیشتر از نمونه‌های عصاره‌گیری شده با آب می‌باشد که اگر چه این اختلاف معنی‌دار نیست، ولی قابل تأمل می‌باشد.

جدول شماره ۲- برخی از عوامل اندازه‌گیری شده بر روی نمونه‌های تحت آزمایش تجزیه‌پذیری.

صفت	نوع نمونه	علوفه							میانگین نوع نمونه		P
		یونجه	شبدر	اسپرس	توت‌روباه	ذرت سیلو شده	لولیوم	GPF	کامل	عصاره	
گاز تولیدی (ml)	کامل	۲۳۶/۷	۳۰۱/۳	۲۶۲/۲	۲۳۰/۲	۲۶۶/۹	۲۶۵/۱	۲۲۱/۹	۲۵۴/۹	۲۵۲/۱	۰/۸۷۴۳
	عصاره	۲۲۳/۴	۲۷۳/۱	۲۹۶/۱	۱۷۳/۹	۲۲۰/۲	۳۲۴/۵	۲۵۳/۷			
pH	کامل	۵/۲۷	۵/۷۴	۵/۵۴	۵/۴۹	۵/۸۴	۶/۴۳	۶/۳۴	۵/۸۱	۶/۹۰	۰/۰۰۰۶
	عصاره	۶/۸۸	۶/۷۷	۶/۸۰	۷/۰۸	۶/۹۷	۶/۸۹	۶/۹۴			
آمونیاک (µg/g DM)	کامل	۱۲/۷۷	۹/۷۰	۸/۱۸	۱/۸۹	۱۵/۳۶	۱۲/۲۵	۱۳/۶۰	۱۰/۵۴	۸/۳۹	۰/۱۹۸۰
	عصاره	۱۱/۲۳	۶/۲۸	۵/۲۹	۶/۵۹	۶/۷۴	۱۰/۴۹	۱۲/۱۴			

بحث

همان‌طور که توضیح داده شد پروتئین محلول برای علوفه‌های یونجه، اسپرس، ذرت سیلو شده و لولیوم پرنه، محلول ۲۰٪ پلی‌اتیلن‌گلایکول نتوانست سبب ترسیب پروتئین شود. حتی افزایش حجم این محلول به بیش از ۲۵٪ حجم نمونهٔ تحت آزمایش نیز نتوانست سبب ترسیب پروتئین شود، اما محلول ۷۵٪ استن که دمای آن تا ۲۰- درجهٔ سانتیگراد تقلیل داده شده بود توانست در تمامی نمونه‌ها رسوب پروتئین ایجاد کند (جدول شماره ۱). در این ارتباط Peltekova و Broderick (۱۹۹۶) توانستند پروتئین محلول در آب علوفهٔ یونجه را با استفاده از محلول‌های ۲۰٪ و ۵۰٪ سولفات آمونیوم رسوب دهند، اما بعد از ترسیب پروتئین محلول با سولفات آمونیوم ۵۰٪، افزایش غلظت سولفات آمونیوم تا ۱۰۰٪ نتوانست سبب ترسیب پروتئین قابل الکتروفورز از نمونه‌های یونجهٔ آفتاب خشک و یونجهٔ سیلو شده شود. ترسیب پروتئین یک نوع تغییر ماهیت پروتئین است که عوامل متعددی می‌تواند سبب آن شود. نتایج این تحقیق نشان داد که در مورد علوفه‌های فوق، پلی اتیلن گلایکول عامل مناسبی برای تغییر ماهیت پروتئین محلول در آب این علوفه‌ها نیست.

پروتئین محلول در آب از لحاظ ماهیتی پروتئین قابل تجزیه توسط میکروارگانیسمها شناخته شده است. زیرا این پروتئین به راحتی در دسترس میکروارگانیسمها قرار گرفته و به‌سرعت تجزیه می‌شوند. در حین عمل سیلوسازی علوفه‌ها (و در این تحقیق ذرت علوفه‌ای) به علت فراهم شدن شرایط مناسب محیطی میکروارگانیسم‌ها خیلی فعال شروع به تخمیر مواد مغذی موجود در محیط می‌نمایند. یکی از این مواد مغذی پروتئین‌ها می‌باشد که بسته به اندازه مولکولی آنها درجات متفاوتی از تجزیه را نشان می‌دهند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در ذرت سیلو شده پروتئین محلول در آب با وزن مولکولی کمتر از ۲۱–kDa مشاهده نمی‌شود. نتایج این تحقیق مشابه نتایج

Fairbairn و همکاران (۱۹۸۸) است. آنها نیز نتوانستند پروتئین با وزن مولکولی کمتر از ۲۱–kDa را از ذرت سیلو شده جدا نمایند.

همان‌طور که نشان داده شد (جدول شماره ۲) عصاره‌گیری با آب نتوانست حجم گاز تولیدی را در نمونه‌های عصاره‌گیری شده کاهش دهد. توضیح برای این مطلب نیاز به تحقیق بیشتری دارد، اما آنچه که به نظر می‌رسد اینست که اگر چه پروتئین‌های محلول در آب اهمیت فراوانی دارند، اما یکسری ممانعت کننده‌ها که می‌توانند محلول در آب نیز باشند وجود دارند که وجود آنها سبب اشکال در کار میکروارگانیسم‌ها می‌شود. با عصاره‌گیری از نمونه‌ها این ممانعت کننده‌ها از محیط عمل خارج شده و راه برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌آید، اما در این‌جا یک تناقص نیز وجود دارد و آن عدم حضور کربوهیدراتهای سهل‌الهضم محلول در آب در نمونه‌های عصاره‌گیری شده است. این نمونه‌ها نمی‌توانند شرایط مطلوبی را در شروع هضم میکروبی فراهم آورند، به همین دلیل انتظار می‌رود که حجم گاز در این نمونه‌ها کمتر باشد که البته این‌گونه نیست. اما همین موضوع در دیگری را بر روی توجیه یکسان بودن گاز تولیدی باز می‌کند. اگر به pH نمونه‌ها در جدول شماره ۲ توجه شود مشخص می‌گردد که به علت فراهم بودن کربوهیدراتهای محلول در آب در نمونه‌های کامل، pH افت زیادی را نسبت به آنچه در نمونه‌های عصاره‌گیری شده مشاهده می‌شود، دارد. این افت pH سبب می‌گردد تا رشد قسمت بیشتر میکروارگانیسمها کند و یا حتی متوقف شود و بنابراین با کند شدن رشد میکروارگانیسمها انتظار تولید گاز نیز کم می‌شود. با این توصیف مشخص می‌گردد که چرا تولید گاز در هر دو نوع نمونه یکسان است.

میزان آمونیاک تولیدی نیز ناشی از فعالیت میکروب‌ها بر روی منابع نیتروژن‌دار است. از آنجایی‌که بخش وسیعی از پروتئین در نمونه‌های عصاره‌گیری شده در محیط وجود ندارد انتظار تولید بیشتر آمونیاک در نمونه‌های کامل منطقی است، اما با توجه به بیشتر بودن آمونیاک در نمونه‌های کامل این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نیست.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بین ۳/۵ تا ۵/۵ درصد از علوفه‌های تحت آزمون را پروتئین از نوع محلول در آب تشکیل می‌دهد. خصوصیت این نوع پروتئین در علوفه‌های مختلف متفاوت است. سیلوسازی علوفه سبب می‌شود که پروتئین با اوزان مولکولی کوچک زودتر از پروتئین‌های بزرگتر تجزیه شوند. از این رو در به نژادی علوفه‌ها به این نوع پروتئین‌ها و پروتئین‌هایی‌که تجزیه‌پذیری کمتری در شکمبه دارند، می‌بایست توجه نمود.

سپاسگزاری

نگارنده لازم می‌داند تا مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از معاونت محترم پژوهشی و ریاست محترم دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد به واسطهٔ فراهم آوردن شرایط آزمایش و تحقیق ابراز دارد.

منابع

Fairbairn, R., Alli, I. and Baker, R. E., 1988. Proteolysis associated with the ensiling chopped alfalfa. J. Dairy Sci. 71:152.

Grum, D. E., Shockey, W. L. and Weiss, W. P., 1991. Electrophoretic examination of alfalfa silage proteins. J. Dairy Sci. 74:146.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265–275.

Makoni, N. F., Shelford, J. A., Nakai, S., Fisher, L. J., and Majak, W., 1993. Characterization of protein fractions in fresh, wilted, and ensiled alfalfa. J. Dairy Sci. 76:1934.

McDougal, E.I., 1949. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochem. J. 43: 99.

Nugent, J.H.A., Johns, W. T., Jordan, D. J., and Mangan J. L., 1983. Rates of proteolysis in the rumen of the soluble proteins casein, Fraction I (18s) leaf protein, bovine serum albumin and bovine submaxillary mucoprotein. Br. J. Nutr. 50:357.

Nugent, J. H., and Mangan, J . L., 1981. Characteristics of the rumen proteolysis of fraction I (18s) leaf protein from lucerne *(Medicago sativa* L.). Br. J. Nutr. 46:39.

Peltekova, V.D. and Broderick, G. A., 1996. In vitro ruminal degradation and synthesis of protein on fractions extracted from alfalfa hay and silage. J Dairy Sci. 79:612.

SAS User's Guide: Statistics, Version 6.03, 4th Ed. 1988. SAS Inst., Inc., Cary, NC.