علوم دامی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۵ (ص ۸۷-۷۹)
DOI: 10.22059/ijas.2016.58001

تأثیر عمل‌آوری‌های فیزیکی و شیمیایی بر اجزای پروتئین خام دانۀ کلزا و گلرنگ با استفاده از مدل CNCPS و SDS-PAGE

مریم صاحبی اعلا[1]، فرخ کفیل‌زاده[2*] و معصومه حیدری[3]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه رازی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۱۱/۹)

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی تأثیر عمل‌آوری‌های فیزیکی و شیمیایی بر حلالیت بخش‌های مختلف پروتئین خام دو رقم دانۀ کلزا (اکاپی، مودنا) و دانۀ گلرنگ (٦٢، زرفان) با استفاده از سامانۀ کربوهیدرات و پروتئین خالص کرنل (CNCPS) و بر زیر واحدهای پروتئینی آن‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل پلی اکریلامید (SDS-PAGE) بود. از فرمالدهید به‌عنوان عمل‌آوری شیمیایی و از برشته کردن و اتوکلاو کردن به‌عنوان عمل‌آوری‌های فیزیکی استفاده شد. برای تعیین حلالیت پروتئین تیمارهای مختلف، بخش‌های مختلف (A، B1، B2، B3، C و NDIP) به روش آزمایشگاهی تعیین شد. نتایج نشان داد که رقم‌های دانۀ کلزا و گلرنگ ازنظر مادۀ خشک، مادۀ آلی، پروتئین خام، عصارۀ اتری، دیوارۀ یاخته‌ای و دیوارۀ یاخته‌ای بدون همی‌سلولز با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۰۱). عمل‌آوری‌ها باعث کاهش بخش پروتئین محلول (A+B1) و افزایش بخش B2 و B3 شد که اثر عمل‌آوری با فرمالدهید نسبت به دو تیمار دیگر چشمگیرتر بود. نقشۀ الکتروفورزی زیر واحدهای پروتئینی رقم‌ها نشان داد که در هر دو دانه، برشته کردن تأثیری بر باندهای پروتئینی نداشت، اما اتوکلاو کردن باعث ناپدید شدن شماری از باندها و عمل‌آوری با فرمالدهید در رقم‌های کلزا برخلاف گلرنگ باعث ناپدید شدن همۀ باندهای با وزن مولکولی بالاتر از ١٤/٤ کیلودالتون شد.

واژه‌های کلیدی: دانۀ کلزا، دانۀ گلرنگ، CNCPS، SDS-PAGE.

مقدمه

دانه‌های روغنی از محصولات باارزش بخش کشاورزی به شمار می‌روند و با توجه به اینکه بخش عمدۀ زراعت دانه‌های روغنی در ایران به آفتابگردان و سویا اختصاص دارد، ناتوانی در توسعۀ کشت این دو گیاه و محدود بودن زراعت آن‌ها به برخی از استان‌های کشور، برخی از مسئولان و کارشناسان را به این امر واداشته که امکان توسعۀ کشت دیگر گیاهان روغنی به‌ویژه کلزا را که در پاییز کشت می‌شود، بیش از دو گیاه یادشده فراهم کنند. به‌طوری‌که در سال‌های اخیر، وزارت کشاورزی سطح زیر کشت این دانه‌های روغنی را در کشور افزایش داده است. دانۀ کلزا در حدود ۲۱درصد پروتئین خام و ۴۳درصد روغن است و ترکیب اسید آمینه‌های آن برای نشخوارکنندگان بسیار مناسب است که می‌تواند به‌عنوان منبع انرژی و پروتئین در جیرۀ نشخوارکنندگان استفاده شود (Khorasani *et al*., 1992; Shahidi, 1990; Laws *et al*., 1982). دانۀ گلرنگ نیز ۱۷/۵۰درصد پروتئین خام و ۳۲درصد روغن دارد (Greg, 2008).

* تلفن: ۰۹۳۳۵۹۳۶۹۲۴
E-mail: kafilzadeh@razi.ac.ir

دانهٔ کلزا پوستهٔ سختی دارد که حدود ۱۶ درصد از مادهٔ خشک دانه را شامل می‌شود (Appelquist, 1972) و همانند سد مؤثری در برابر حملهٔ میکروبی در شکمبه عمل می‌کند، لذا هضم دانهٔ کلزا به میزان ناچیزی در نشخوارکنندگان صورت می‌گیرد مگر آنکه پوشش دانه شکسته شود. از سویی درنتیجهٔ شکسته شدن پوسته، پروتئین دانه به‌سرعت در شکمبه تجزیه می‌شود (Madsen & Hvesplund, 1985). لذا یافتن روش‌های مناسب عمل‌آوری بسیار توجه شده است. مهم‌ترین عامل‌هایی که در انتخاب یک روش مناسب عمل‌آوری توجه می‌شود، مقرون‌به‌صرفه بودن آن و آسانی اجرای عمل‌آوری بدون نیاز به عملیات پیچیده است. عمل‌آوری گرمایی خوراک‌ها به‌منظور تلاش برای دستکاری رفتار هضم درشت مغذی‌های موجود در خوراک انجام می‌شود. برای مثال در مورد خوراک‌های پروتئینی، در اصطلاح تغذیهٔ نشخوارکنندگان، هدف از عمل‌آوری گرمایی این خوراک‌ها افزایش میزان پروتئین عبوری از شکمبه[1] بدون تأثیر منفی بر هضم پروتئین در لولهٔ گوارش است (Yu *et al*., 2002). عمل‌آوری با فرمالدهید نیز سال‌ها است که به‌منظور حفاظت پروتئین از تجزیه‌پذیر در شکمبه استفاده می‌شود (Faichney & Davies, 1973). در دام‌های پر تولید عمل‌آوری گرمایی مکمل‌های پروتئینی به‌منظور افزایش میزان پروتئین عبوری از شکمبه و درنتیجه افزایش اسیدآمینه‌های ورودی به رودهٔ کوچک استفاده شده است (Faldet & Satter, 1991). بدین منظور روش‌های مختلفی اعم از درون‌تنی و برون‌تنی و *in sacco* منظور ارزیابی تجزیه‌پذیری پروتئین در خوراک در دسترس است. یکی از روش‌های تعیین ویژگی‌های تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای پروتئین استفاده از سامانهٔ کربوهیدرات و پروتئین خالص کرنل[2] (CNCPS) به‌منظور جداسازی بخش‌های پروتئین است. در این مدل پروتئین خام را به‌طورکلی به سه قسمت A، B و C که به ترتیب شامل نیتروژن غیرپروتئینی، پروتئین حقیقی و پروتئین غیرقابل دسترس برای دام است، تقسیم‌بندی می‌شود. در مورد بخش B نیز با توجه به‌شدت تجزیه‌پذیری به سه بخش تقسیم می‌شود که شامل بخش‌های B1 (با تجزیه‌پذیری سریع در شکمبه)، B2 (تجزیه‌پذیر در شکمبه و بخش‌های پایین‌تر لولهٔ گوارش) و B3 (بدون تجزیه‌پذیری سریع و مؤثر در شکمبه) است (Van soest *et al*., 1992). با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی دربارهٔ اثرگذاری‌های چندین روش عمل‌آوری بر رقم‌های دانهٔ کلزا و گلرنگ بر بخش‌های مختلف پروتئینی و مقایسهٔ رقم‌های کلزا و گلرنگ و روش‌های عمل‌آوری صورت نگرفته و یا بررسی‌های انجام‌شده به‌طور عمده روی کنجاله‌ها بوده است این تحقیق باهدف بررسی تأثیر عمل‌آوری‌های فیزیکی و شیمیایی بر بخش‌های مختلف پروتئین خام دو رقم از دانهٔ کلزا و دو رقم از دانهٔ گلرنگ با استفاده از سامانهٔ کربوهیدرات و پروتئین خالص کرنل انجام شد و برای بررسی زیر واحدهای پروتئینی از الکتروفورز ژل پلی اکریلامید[3] (SDS-PAGE) استفاده شد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش رقم‌های کلزا (اکاپی، مودنا) و گلرنگ (۶۲ و زرفان) از مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال بذر کرج تهیه شدند. در این تحقیق از برشته کردن و اتوکلاو کردن به‌عنوان روش‌های عمل‌آوری فیزیکی و از فرمالدهید به‌عنوان عمل‌آوری شیمیایی استفاده شد. در عمل‌آوری با برشته کردن، رقم‌ها به‌وسیله یک کورهٔ الکتریکی در دمای ۱۵۰ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در مورد کلزا و مدت ۶۰ دقیقه در مورد گلرنگ عمل‌آوری شدند و بی‌درنگ دانه‌ها به درون فلاسک منتقل شد و اجازه داده شد که به مدت نیم ساعت دمای آن‌ها درون فلاسک حفظ شود و دچار افت دمایی نشوند (این عمل را ذخیره‌سازی گرمایی می‌گویند) پس‌ازآن دانه‌ها از فلاسک خارج و پس از سرد شدن، در کیسه ذخیره شدند (Fathi Nasri *et al*., 2008). برای اتوکلاوکردن، رقم‌ها در دمای ۱۲۵ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱۱۷ کیلو پاسکال به مدت سی دقیقه در مورد کلزا و ۶۰ دقیقه در مورد گلرنگ اتوکلاو (Mustafa *et al*., 2003; Razligi *et al*., 2011) شدند. برای عمل‌آوری با

1. By pass protein
2. Comell Net Carbohydrate and Protein System
3. Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis

فرمالدهید از فرمالین ۳۷ درصد در غلظت ۳/۵درصد استفاده شد که به این منظور میزان ۰/۷ سی‌سی فرمالین ۳۷ درصد را در ۲۰ گرم از رقم‌ها درون یک ظرف دربسته تزریق کرده و به‌آرامی مخلوط کردیم تا کل دانه‌ها آغشته به فرمالدهید شوند. دانه‌های آغشته به فرمالدهید به مدت پنج روز در دمای اتاق نگهداری شدند پس‌ازاین مدت حدود ۲۴ ساعت در نمونه‌ها باز شد تا بخارهای فرمالدهید به‌طور کامل خارج شوند (Mustafa *et al.*, 2000). سپس دانه‌ها با آسیاب آزمایشگاهی با استفاده از یک الک ۱ میلی‌متری آسیاب شدند. تجزیهٔ تقریبی مواد آزمایشی شامل مادهٔ خشک، مادهٔ آلی، پروتئین خام و عصارهٔ اتری بر اساس روش AOAC[1] (1995) و الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی[2] (دیوارهٔ یاخته‌ای) و الیاف نامحلول در شویندهٔ اسیدی[3] (دیوارهٔ یاخته‌ای بدون همی‌سلولز) بر اساس روش Van Soest & Mason (1991) انجام شد.

در تعیین بخش‌های مختلف پروتئین خام، پروتئین حقیقی نمونه‌ها با تنگستات اسید به‌عنوان عامل رسوب‌دهنده رسوب داده شد و غلظت پروتئین رسوب‌کرده که همان پروتئین حقیقی است، تعیین شد (Licitra *et al.*, 1996). نیتروژن نامحلول در شویندهٔ اسیدی[4] و شویندهٔ خنثی[5] در ادامه اندازه‌گیری الیاف نامحلول در شویندهٔ اسیدی و الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی بر اساس روش Van Soest & Mason (1991) تعیین شدند. در اندازه‌گیری الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی، آنزیم استفاده نشد. برای تهیهٔ نقشهٔ الکتروفورز در آغاز استخراج پروتئین رقم‌های کلزا و گلرنگ بدون عمل‌آوری (شاهد) و عمل‌آوری‌شده به روش‌های فیزیکی و شیمیایی با استفاده از بافرهای استخراج (Tris-HCl) برابر روش Xi *et al.* (2006) باکمی تغییرات (Kakaei & Kahrizi, 2010) انجام شد. الکتروفورز پروتئین‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE به روش Laemmli (1970) انجام شد. ۲۵ میکرولیتر از مایع بالایی (حاوی نزدیک‌به ۵۰ میکروگرم پروتئین) نمونه‌های شاهد و عمل‌آوری‌شدهٔ رقم‌های کلزا و گلرنگ به چاهک‌های الکتروفورز با ژل بالایی حاوی ۳/۷۵درصد آکریلامید-بیس آکریلامید و ژل پایینی حاوی ۱۲درصد اکریلامید-بیس آکریلامید منتقل شد. ابعاد ژل ۱۴۰×۱۱۰×۱ میلی‌متر و زمان الکتروفورز سه ساعت (تا رسیدن رنگ بروموفنل بلو به لبهٔ پایینی ژل) و شدت‌جریان ۳۰ میلی‌آمپر 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[6]، ۷ درصد اسید استیک گلیسیال[7] و ۲۰ درصد متانول به مدت دوازده ساعت رنگ‌آمیزی[8] شد و سپس با محلول حاوی ۷ درصد اسید استیک گلیسیال و ۵ درصد متانول به مدت دوازده ساعت رنگبر[9] شد. پس از چند بار شستشو با آب دو بار تقطیر در طول‌موج ۵۸۰ نانومتر دنسیومتر و با اسکنر معمولی و دوربین تصویربرداری شد (Hames & Rickwood, 1990).

آنالیز آماری داده‌ها

آزمایش به‌صورت فاکتوریل ۴×۴ (چهار رقم و چهار سطح عمل‌آوری) در قالب طرح کامل تصادفی، دارای شانزده تیمار و سه تکرار برای تعیین تأثیر رقم‌ها و روش‌های عمل‌آوری و اثر متقابل آن‌ها تجزیه آماری شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 (2003) و مقایسهٔ میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنهٔ دانکن (1955) انجام پذیرفت ($P<0/01$). مدل آماری استفاده‌شده به‌صورت رابطهٔ زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{ij}$$

Y_{ijk}: مقدار حلالیت پروتئین در مدل CNCPS، μ: میانگین کل داده‌ها، A_i: اثر i امین رقم، B_j: اثر j امین نوع عمل‌آوری، AB_{ij}: اثر متقابل i امین رقم و j امین نوع عمل‌آوری، e_{ij}: اثر خطای آزمایش.

1. Association of Official Analytical Chemists
2. Neutral Detergent fiber
3. Acid Detergent fiber
4. Acid Detergent Insoluble Nitrogen
5. Neutral Detergent Insoluble Nitrogen
6. Commasie Brilliant Blue
7. Glycial Acetic Acid
8. Staining
9. Destaining

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی

ترکیب شیمیایی رقم‌های دانهٔ کلزا و گلرنگ بدون عمل‌آوری (شاهد) در جدول ۱ نشان داده شده است. گزارش‌های زیادی در مورد ترکیب شیمیایی کلزا و گلرنگ ازجمله جدول‌های استاندارد غذایی وجود دارد. میزان پروتئین خام گزارش‌شده در این بررسی برابر با گزارش‌های Ebrahimi *et al.* (2009) و Latha & Prakash (1984) و میزان عصارهٔ اتری نیز نزدیک به گزارش‌های NRC (2001) و Bozan & Temelli (2008) در مورد دانهٔ کلزا و گلرنک بود. درصد مادهٔ خشک و خاکستر و پروتئین خام و عصارهٔ اتری و NDF و ADF تفاوت معنی‌داری در بین رقم‌های دانهٔ کلزا و گلرنگ نشان داد. رقم‌های دانهٔ کلزا میزان خاکستر، پروتئین خام و عصارهٔ اتری بیشتری نسبت به رقم‌های گلرنگ داشتند. درصورتی‌که میزان NDF و ADF در رقم‌های گلرنگ بیشتر از کلزا بود.

حلالیت بخش‌های مختلف پروتئین

نتایج حلالیت نیتروژن در حلال‌های بافر فسفات، شویندهٔ خنثی و شویندهٔ اسیدی و همچنین دیگر بخش‌های پروتئین خام در رقم‌های شاهد و عمل‌آوری‌شده با روش‌های فیزیکی و شیمیایی در جدول ۲ و اثرات متقابل رقم و عمل‌آوری در جدول ۳ گزارش شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین و کمترین درصد پروتئین خام رقم‌های شاهد به ترتیب مربوط به بخش‌های پروتئین محلول (SCP) و B3 است (جدول ۳) که SCP در حقیقت مجموع بخش‌های A و B1 است که این بخش در رقم‌های کلزا بیشتر از رقم‌های گلرنگ است. بخش B3 در رقم‌های گلرنگ بسیار کمتر از رقم‌های کلزا بود. در مورد تأثیر عمل‌آوری‌ها بر بخش‌های پروتئینی هم در رقم کلزا و هم در گلرنگ (جدول۳) عمل‌آوری‌های انجام‌شده منجر به کاهش بخش پروتئین محلول و افزایش بخش B2 شد. افزایش به‌دست‌آمده در بخش B2 در اثر عمل‌آوری‌ها درنتیجه کاهش بخش A و B1 است. بنابراین، انتظار می‌رود که نرخ کلی تجزیه‌پذیری در اثر عمل‌آوری به‌دلیل تغییر بخش سریع تجزیه‌شونده در شکمبه (A و B1) به بخش آهستهٔ تجزیه‌شونده (B2) کاهش یابد. عمل‌آوری گرمایی سبب ایجاد پل‌های عرضی در داخل و بین زنجیره‌های پپتیدی با کربوهیدرات‌ها شده و حلالیت پروتئین را کاهش می‌دهد که خود سبب کاهش حساسیت به تجزیه در شکمبه می‌شود. کاهش حلالیت پروتئین درنتیجه گرما دادن مکمل‌های پروتئینی توسط Moshtaghi Nia & Ingalls (1992) و McAllister *et al.* (1993) نیز گزارش شده است. همچنین در بررسی Mustafa *et al.* (2003) روی دانهٔ آفتابگردان اتوکلاوشده و Gonthie *et al.* (2004) روی بذر کتان میکرونیزه‌شده نیز کاهش بخش محلول پروتئین در اثر این عمل‌آوری‌ها گزارش شده است. Lin & Kung (1999) گزارش کردند که عمل‌آوری گرمایی موجب تسهیل تشکیل واکنش میلارد (واکنش قهوه‌ای شدن غیرآنزیمی بین گروه‌های آلدهیدی قندها و گروه‌های آمینواسیدی آزاد پروتئین‌ها) و تشکیل کمپلکس قند-پروتئین می‌شود که این کمپلکس نسبت به پپتیدهای معمولی در برابر هیدرولیز آنزیمی مقاوم‌تر بوده و برگشت‌پذیری این واکنش بستگی به دما و زمان گرما دارد.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی (درصد مادهٔ خشک) رقم‌های دانهٔ کلزا و دانهٔ گلرنگ بدون عمل‌آوری

Table 1. Chemical composition (%DM) of untreated canola and safflower varieties

Varieties	Constituent					
	DM	ASH	CP	EE	NDF	ADF
Okapi	98.91[a]	40.9[a]	23.82[a]	34.84[b]	23.69[d]	16.35[d]
Modena	99.04[a]	3.78[a]	19.17[b]	45.29[a]	31.68[c]	18.98[c]
62	97.68[b]	1.813[b]	14.53[c]	22.04[d]	46.44[b]	30.34[b]
Zarfan	96.61[b]	1.520[b]	14.09[d]	27.72[c]	48.24[a]	37.99[a]
SEM	3.38	3.58	1.19	2.62	3.09	2.633
Sig.	**	***	***	***	***	***

abc حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

SEM: میانگین خطای استاندارد.

** اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۱. *** اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۰۱.

Means within the same column with differing superscripts are significantly different.
DM: dry matter; CP: crude protein; EE: ether extract; NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber
SEM: Standard Error Mean, Significantly.
**P<0.01; *** P<0.001

جدول۲. بخش‌های مختلف پروتئین خام رقم‌های دانهٔ کلزا و دانهٔ گلرنگ شاهد و عمل‌آوری‌شده بر اساس مدل سامانهٔ کربوهیدرات و پروتئین کرنل (درصد پروتئین خام)

Table 2. Protein fractions based on Cornell Net Carbohydrate and Protein System for raw (control) and different treated canola and safflower seeds (%CP)

	CP (%DM)	Protein Fraction (%CP)						
		SCP	A	B1	B2	B3	C	NDIP
Varieties								
Okapi	23.82^{a}	50.45^{a}	6.27^{c}	44.18^{a}	32.98^{d}	9.14^{b}	7.43^{d}	16.58^{b}
Modena	19.17^{b}	42.51^{b}	5.16^{d}	37.35^{b}	36.34^{c}	13.62^{a}	7.73^{b}	21.55^{a}
62	14.53^{c}	35.17^{d}	10.57^{b}	24.60^{d}	56.49^{a}	0.79^{c}	7.60^{c}	8.39^{d}
Zarfan	14.09^{d}	40.02^{c}	11.55^{a}	28.59^{c}	50.65^{b}	0.54 ^{d}	8.56^{a}	9.10^{c}
SEM	0.11	0.05	0.07	0.07	0.08	0.05	0.02	0.05
Processing								
Control	17.90	62.35^{a}	14.03^{a}	48.38^{a}	26.69^{d}	2.79^{d}	8.12^{a}	10.90^{d}
toasting	17.90	47.52^{b}	11.14^{b}	36.45^{b}	39.57^{c}	4.77^{c}	8.08^{a}	12.85^{c}
autoclaving	17.92	35.15^{c}	6.17^{c}	28.96^{c}	49.58^{b}	7.79^{b}	7.99^{b}	15.78^{b}
Formaldehyde	17.93	23.15^{d}	2.21^{d}	20.97^{d}	60.61^{a}	8.84^{a}	7.24^{c}	16.08^{a}
SEM‡	0.11	0.05	0.07	0.07	0.08	0.05	0.02	0.05
Varieties effect	***	***	***	***	***	***	***	***
Processing effect	ns	***	***	***	***	***	***	***
Processing × Varieties	ns	***	***	***	***	***	***	***

اعداد یک ردیف با حروف ناهمسان ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۱).

CP= پروتئین خام؛ SCP= بخش پروتئین محلول؛ A= بخش به‌سرعت حل‌شونده؛ B1= پروتئین حقیقی محلول؛ B2= پروتئین حقیقی نامحلول با سرعت تجزیهٔ متوسط؛ B3= پروتئین حقیقی نامحلول با سرعت تجزیهٔ پایین؛ C= پروتئین غیرقابل تجزیه.

SEM= میانگین خطای استاندارد.

***: اختلاف معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۰۱ ؛ NS: بدون تفاوت معنی‌دار.

Different letters within column indicates differences (p<0.001).
CP, crude protein; SCP, soluble crude protein; A, Non-protein nitrogen; B1, rapidly degradable protein; B2, Intermediately degradable protein; B3, Slowly degradable protein; C, unavailable protein; NDIP, neutral detergent insoluble protein.
***p<0.001; ns: Non significant P > 0.05.
SEM: Standard Error Mean.

جدول۳. اثرات متقابل رقم و روش‌های عمل‌آوری در بخش‌های مختلف پروتئین خام رقم‌های دانهٔ کلزا و دانهٔ گلرنگ

Table 3. Interaction effect of varieties and processing for raw (control) and different treated canola and safflower seeds (%CP)

Varieties	Processing	Protein fractions						
		SCP	A	B1	B2	B3	C	NDIP
okapi	Control	65.85^{a}	12.31^{a}	53.54^{a}	23.90^{d}	2.73^{d}	7.52^{b}	10.25^{d}
	toasting	53.81^{b}	8.72^{b}	45.1^{b}	33.4^{c}	5.08^{c}	7.71^{a}	12.79^{c}
	autoclaving	43.21^{c}	3.63^{c}	39.58^{c}	36.91^{b}	12.32^{b}	7.56^{b}	19.88^{b}
	Formaldehyde	38.93^{d}	0.42^{d}	38.50^{d}	37.68^{a}	16.45^{a}	6.94^{c}	23.39^{a}
Modena	Control	54.84^{a}	10.30^{a}	44.54^{a}	29.35^{d}	7.71^{d}	8.10^{b}	15.80^{d}
	toasting	41.65^{b}	7.82^{b}	33.83^{d}	37.08^{c}	12.79^{c}	8.47^{a}	21.26^{c}
	autoclaving	38.40^{c}	1.99^{c}	36.41^{b}	38.66^{b}	16.78^{b}	8.16^{b}	24.94^{a}
	Formaldehyde	35.54^{d}	0.53^{d}	35.01^{c}	40.26^{a}	17.61^{a}	6.59^{c}	24.20^{b}
62	Control	57.52^{a}	15.74^{a}	42.03^{a}	34.04^{d}	0.39^{c}	7.8^{a}	8.19^{b}
	toasting	47.78^{b}	14.04^{b}	33.79^{b}	44.43^{c}	0.25^{c}	7.5^{b}	7.75^{c}
	autoclaving	26.35^{c}	9.23^{c}	16.95^{c}	64.79^{b}	1.33^{a}	7.7^{a}	9.03^{a}
	Formaldehyde	8.74^{d}	3.30^{d}	5.43^{d}	83.04^{a}	0.84^{b}	7.4^{b}	8.24^{b}
Zarfan	Control	71.17^{a}	17. 78^{a}	53.39^{a}	19.45^{d}	0.32^{ab}	9.05^{a}	9.37^{a}
	toasting	46.85^{b}	13.99^{b}	33.07^{b}	43.70^{c}	0.6^{a}	8.64^{b}	9.24^{a}
	autoclaving	32.66^{c}	9.84^{c}	22.92^{c}	58.64^{b}	0.08^{b}	8.53^{b}	8.61^{b}
	Formaldehyde	9.41^{d}	4.59^{d}	4.97^{d}	81.47^{a}	0.47^{a}	8.03^{c}	8.5^{b}
SEM		0.10	0.14	0.14	0.16	0.09	0.04	0.11

اعداد یک ردیف با حروف ناهمسان ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۱).

CP= پروتئین خام؛ SCP= پروتئین محلول در بافر فسفات؛ A= بخش به‌سرعت حل‌شونده؛ B1= پروتئین حقیقی محلول؛ B2= پروتئین حقیقی نامحلول با سرعت تجزیه‌پذیری متوسط؛ B3= پروتئین حقیقی نامحلول با سرعت تجزیه‌پذیری پایین؛ C= پروتئین غیرقابل تجزیه.

SEM= میانگین خطای استاندارد.

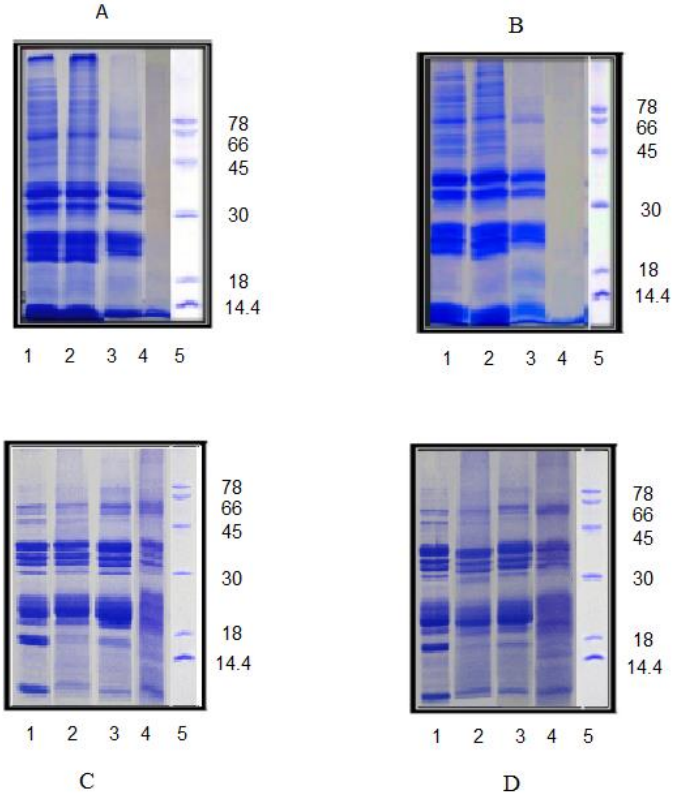
Different letters within columns indicates differences (p<0.01).
CP, crude protein; SCP, soluble crude protein; A, Non-protein nitrogen; B1, rapidly degradable protein; B2, Intermediately degradable protein; B3,Slowly degradable protein; C, unavailable protein; NDIP, neutral detergent insoluble protein.
SEM: Standard Error Mean.

بخش B3 پروتئین در اکثر مواد خوراکی، به‌ویژه پروتئین‌های گیاهی، بسیار کم است. پروتئین‌ها به دیوارهٔ یاخته‌ای متصل شده و در شویندهٔ خنثی نامحلول هستند (Van soest, 1994). در رقم‌های دانهٔ کلزا (اکاپی و مودنا) برشته کردن و اتوکلاو کردن و فرمالدهید به ترتیب بیشترین تأثیر را در افزایش بخش B3 داشتند اما در رقم ۶۲ بیشترین افزایش مربوط به عمل‌آوری با اتوکلاوکردن و در رقم زرفان مربوط به

برشته کردن بود. بخش C قابل‌تجزیه و تخریب در شکمبه نیست. عمل‌آوری‌های انجام‌شده رفتارهای متفاوتی را در بین رقم‌های دانهٔ کلزا و گلرنگ نشان دادند. در بین عمل‌آوری‌های انجام‌گرفته در این بررسی تأثیر عمل‌آوری با فرمالدهید در کاهش بخش محلول و افزایش بخش‌های B2 و B3 نسبت به دو عمل‌آوری گرمایی دیگر چشمگیرتر بود. به نظر می‌رسد که فرمالدهید باعث تشکیل کمپلکس قوی‌تری با ساختمان پروتئین‌ها می‌شود. Nitschmann *et al.* (1943) دریافتند که ساختمان پروتئین‌ها با فرمالدهید کمپلکس قوی و محکمی را تشکیل می‌دهد که در برابر آنزیم‌های پروتئولایتیک در pH شکمبه مقاومت نشان می‌دهد. اما در pH شیردان اتصال‌ها شکسته شده و به میزان زیادی حفاظت پروتئین برطرف می‌شود.

تأثیر عمل‌آوری بر زیر واحدهای پروتئینی رقم‌های دانهٔ کلزا و دانهٔ گلرنگ

الگوی زیر واحدهای پروتئینی رقم‌های اکاپی، مودنا، ۶۲ و زرفان در شکل ۱ (A تا D) ارائه شده است.



شکل۱. الگوی زیر واحدهای پروتئینی. A۱: شاهد، ۲: برشته‌شده، ۳: اتوکلاوشده، ۴: فرمالدهید، ۵: مارکر: اکاپی، B: مودنا، C: ۶۲، D: زرفان.

Figure 1. Electrophoresis pattern of untreated (1), toasted treated (2), autoclaved treated (3), formaldehyde treated (4), and molecular weight of standard (5) in A: Okapi, B: Modena, C: 62, D: Zarfan.

رگه (لاین)های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ به ترتیب الگوی زیر واحدهای پروتئین‌های رقم‌های شاهد، برشته‌شده، اتوکلاوشده، آغشته به فرمالدهید و مارکر را با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌آکریلامید نشان می‌دهد. در نقشهٔ الکتروفورز رقم اکاپی و مودنا رگهٔ مربوط به دانه‌های شاهد و برشته‌شده (رگهٔ ۱ و ۲) باند با وزن مولکولی کمتر از ۱۴/۴کیلو دالتون را به‌خوبی نشان می‌دهد اما این باندها در رگهٔ ۳ و ۴ بسیار ضعیف‌تر شده به‌طوری‌که در باند ۴ در حال ناپدید شدن است. همچنین در دامنهٔ بین باندهای ۱۸ تا ۳۰ کیلودالتون در رگه‌های ۱ و ۲، سه باند به‌کلی روشن دیده می‌شود. درحالی‌که در رگهٔ ۳ یکی از باندها و در رگهٔ ۴ هر سه باند به‌کلی محو شد.

در فاصلهٔ بین ۳۰ تا ۴۵ کیلو دالتون نیز در رگه‌های ۱، ۲ و ۳ دو باند به‌کلی مشخص دیده شد که باندهای مربوط به اتوکلاو باریک‌تر شده و فرمالدهید باعث ناپدیدشدن هر دو باند شد. همچنین در رگهٔ مربوط به اتوکلاو و فرمالدهید برخلاف رگه‌های مربوط به شاهد و برشته، باندهایی که در دامنهٔ وزن مولکولی بین ۴۵ تا ۷۸کیلو دالتون و بالاتر از ۷۸ کیلو دالتون بودند به‌کلی محو شدند و باند ۶۶ کیلودالتون در رگهٔ ۳ نیز بسیار ضعیف‌تر شد. برخلاف رقم‌های کلزا که برشته کردن تأثیری بر باندها نداشت در رقم‌های ۶۲ و زرفان این عمل‌آوری باعث ناپدید شدن باند موجود در وزن مولکولی پایین‌تر از ۱۴/۴ کیلودالتون و باند با وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون شد. اتوکلاو کردن (رگهٔ ۳) نیز برخلاف تأثیری که بر باندهای رقم کلزا داشت در رقم‌های گلرنگ تنها باعث ناپدید شدن باند با وزن مولکولی پایین‌تر از ۱۴/۴ کیلودالتون و باند با وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون شد.

آنچه در این نقشه قابل‌توجه است این است که در رگهٔ مربوط به عمل‌آوری با فرمالدهید در رقم‌های کلزا به‌جز باند اول هیچ باند دیگری مشاهده نشد و عمل‌آوری با اتوکلاو و فرمالدهید بیشترین تأثیر را بر باندهای با وزن مولکولی بالا داشت. به‌عبارت‌دیگر به‌نظر می‌رسد باندهای کوچک‌تر نسبت به عمل‌آوری‌های اعمال‌شده مقاوم‌تر بودند. Sulieman *et al.* (2008) در بررسی خود روی پروتئین‌های عدس گزارش کردند که پختن عدس باعث تغییرات کیفی و کمی در پروتئین‌ها شد و شمار زیر واحدهای پروتئین پس از پختن کاهش یافت که تأثیر پختن به‌طور عمده روی مولکول‌های با وزن بالاتر بود. همچنین Ebrahimi *et al.* (2009) با بررسی روی دانهٔ کلزای پرتوتابی‌شده گزارش کردند که پرتوتابی باعث واسرشته (دناتوره) شدن و تجمع این پروتئین‌ها شد و به همین دلیل باعث کاهش حلالیت و ناپدید شدن از راه شستشو با آب شد. نکتهٔ قابل‌توجه در نقشهٔ الکترو فورزی رقم‌ها ظاهر نشدن باندها در رقم‌های کلزای عمل‌آوری‌شده با فرمالدهید برخلاف رقم‌های گلرنگ است. به‌رغم تکرار مراحل الکتروفورز برای چندین بار هم در رقم‌های کلزا و هم در رقم‌های گلرنگ و با غلظت‌های مختلف از ژل آگارز برای بار دوم نیز همان نقشه و تصویر از باندهای پروتئینی به دست آمد و نتایج همسانی به دست آمد. محققان با استفاده از بررسی‌های کدورت‌سنجی گزارش کردند که آلبومین منداب بر اثر فرآیند گرمایی گرایش زیادی برای تشکیل ژل دارد اما دلیل اینکه چرا در رگهٔ مربوط به فرمالدهید هیچ باندی مشاهده نشد به‌خوبی معلوم نیست. با توجه به اینکه Ebrahimi *et al.* (2009) گزارش کردند که در دزهای بالاتر از ۱۵ کیلوگرم، برخی از پروتئین‌های منداب به دلیل ایجاد پیوندهای عرضی در بین مولکول‌های پروتئینی نمی‌توانند در ژل نفوذ کنند. همچنین Gaber (2005) دریافت که رادیکال‌های آنیونی هیدروکسیل و سوپراکسید که با پرتوتابی تولید می‌شوند، می‌توانند ویژگی‌های مولکولی پروتئین را با پیوندهای عرضی و متراکم کردن زنجیره‌های پلی‌پپتیدی تغییر دهند. افزون بر این Ressouany *et al.* (1998) نشان دادند که پرتوتابی پروتئین‌های سویا در ۳۲ کیلوگرمی وزن مولکولی را از ۶۰ تا ۲۰۰۰ کیلو دالتون افزایش داد. به‌احتمال فرمالدهید نیز در سازوکاری همسان با پرتوتابی مانع نفوذ پروتئین‌ها به درون ژل شده باشد. Davies & Delsignore (1987) گزارش کردند که پیوندهای عرضی منجر به تشکیل باندهای شیمیایی بین دو مولکول پروتئینی مجاور هم می‌شود، درنتیجه اثر متقابل بین دو پروتئین افزایش می‌یابد چراکه نیروی الکترواستاتیکی مولکول‌ها به کمترین میزان رسیده و آب کمتری در تعامل با پروتئین‌ها قرار می‌گیرد و این شرایط مساعدی برای مولکول‌های پروتئینی برای نزدیک شدن به یکدیگر و احتمال رسوب است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج این بررسی نشان داد که عمل‌آوری دانه‌ها باعث کاهش میزان پروتئین محلول (A+B1) و افزایش بخش B2 و B3 شد که تأثیر عمل‌آوری با فرمالدهید در کاهش پروتئین محلول و افزایش بخش B2 و B3 بیشتر از دیگر عمل‌آوری‌ها بود. به نظر می‌رسد که فرمالدهید در محافظت از تجزیه‌پذیری دانه‌ها در شکمبه مؤثرتر باشد. همچنین تأثیر عمل‌آوری با فرمالدهید و اتوکلاو بیشتر روی باندهای با وزن مولکولی بالا بود که باعث ناپدید شدن باند و کاهش شمار آن‌ها شد. به‌عبارت‌دیگر به نظر می‌رسد که باندهای کوچک‌تر نسبت به عمل‌آوری‌های اعمال‌شده مقاوم‌تر باشند.

REFERENCES

1. Aminipur, H., S. Dust nobar, R., Maheri sis, N., Najafyar, S. & Salamat azar, M. (2010). Determine degredation of safflower varieties of whole grain 111-IL with nylon bags. *Journal of Animal Science*, 3(3), 43-50. (in Farsi)
2. AOAC. (1995). Official methods of analysis, 16th ed. Association of official analytical chemists, arlington, VA, USA.
3. Appelquist, L. A. (1972). *Chemical constituents of rapeseed*. Pages 123-127 in Rapeseed, cultivation, composition, processing and utilization. Amsterdam, the Netherlands. Pp. 123-127.
4. Bozan, B. & Temelli, F. (2008). Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*, 6354-6359.
5. Davies, K. J. A. & Delsignore, M. E. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary structure and tertiary structure. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 9908-9913.
6. Duncan, D. B. (1955). Multiple range and multiple F-tests. *Biometrics*, 11, 1-42.
7. Ebrahimi, S. R., Nikkah, A., Sadeghi, A. A. & Raisali, G. (2009). Chemical composition, secondary compounds, ruminal degradation and in vitro crude protein digestibility of gamma irradiated canola seed. *Animal Feed Science and Technology*, 151, 184-193.
8. Faichney, G. J. & Davies, H. L. (1973). The performance of calves given concentrate diets treated with formaldehyde. *Australian Journal of. Agricultural Research*, 24, 613-621.
9. Faldet, M. A. & Satter, L. D. (1991). Feeding heat treated full-fat soybeans to cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 74, 3047-3054.
10. Fathi Nasri, M.H., France, J., Danesh Mesgaran, M. & Kebreab, E. (2008). Effect of heat processing on ruminal degradability and intestinal disappearance of nitrogen and amino acids in Iranian whole soybean. *Livestock Science*, 113, 43-51.
11. Gaber, M. H. (2005). Effect of irradiation on molecular properties of bovine serum albumin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 203-206.
12. Gonthier, C., Mustafa, A. F., Berthiaume, R. & Petit, H. V. (2004). Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 1854-1863.
13. Greg, L. (2008). Biodiesel *benefits for cattle producers: Feeding byproducts of biodiesel production*. Ph. D. dissertation, North Dakota State University.
14. Hames, E. D. & Rickwood, D. (1990). Gel Electrophoresis of proteins. 2nd Ed. IRL Press. Oxford. UK.
15. Kakaei, M. & Kahrizi, D. (2010). Study of seed proteins pattern of brassica napus varieties via sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis. *International Research Journal of Biotechnology* (ISSN: 2141-5153) Vol. 2(1) pp.026-028, February, 2011.
16. Khorasani, G. R., De Boer, G., Robinson, P. H. & Kennelly, J. J. (1992). Effect of canola fat on ruminal and total tract digestion, plasma hormones, and metabolites in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 75, 492-501.
17. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
18. Latha, T. S. & Prakash, V. (1984). Studies on the proteins from safflower seed (Carthamus tinctorius L). *Journal of Agriculture. Food Chemistry*, 32, 1412-1416.
19. Laws, B., Stedman, J. A. & Hill, R. (1982). Rapeseed meal in animal feed. *Agritrade*, (Feb.), 27-33.
20. Licitra, G., Hernandez, T. M. & Van Soest, P. J. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 57, 347-358.
21. Lin, C. & Kung, L. (1999). Heat treated soybeans and soybean meal in ruminant nutrition. Technical Bull. American soybean associaton. & united soybean board. pp. 1-18.
22. Madsen, J. & Hvesplund, P. G. (1985). Protein degradation in the rumen. *Acta Agriculturae Scand*, 25(Suppl.1), 103-124.
23. McAllister, T. A., Cheng, K. J., Beauchemin, K. A., Bailey, D. R. C., Pickard, M. D. & Gilbert, R. P. (1993). Use of lignosulfonate to decrease the rumen degradability of canola meal protein. *Canadian. Journal of Animal Science*, 73, 211-215.
24. Moshtaghi Nia, S. A. & Ingalls, J. R. (1992). Effect of heating on canola meal protein degradation in the rumen and digestion in the lower gastroitestinal tract of steers. *Canadian Journal of Animal Science*, 72, 83-88.
25. Mustafa, A. F., Chouinard, Y. P., Ouellet, D. R. & Soita, H. (2003). Effects of moist heat treatment on ruminal nutrient degradability of sunflower seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1059-1064.

26. Mustafa, A.F., McKinnon, J.J. & Christensen, D. (2000). Protection of canola (low glucosinolate rapeseed) meal and seed protein from ruminal degradation. *Asian-Aus. Journal of Animal Science*, 13(4), 535-542.
27. Nitschmann, yon Hs., Hadorn, H. & Lauener, H. (1943). Quantitative determination of formaldehyde in casein hardened with formaldehyde. *Heir Claim Acta*, 26, 1069.
28. NRC. (2001). *Nutrient requirement of dairy cattle*. 7th ed. National Research Council, National Academy of Science, Washington, DC.
29. Razligi, S. N., Salamat, D.N.R., Maheri Sis, N., Fartash, A., Salamatazar, M. & Aminipour, H. (2011). stimation of net energy and degradability kinetics of treated whole safflower seed by *in vitro* gas production and nylon bag methods. *Annals of Biological Research*, 2(4), 295-300.
30. Ressouany, M., Vachon, C. & Lacroix, M. (1998). Irradiation dose and calcium effect of the mechanical properties of cross-linked caseinate films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 1618-1623.
31. SAS. (2003). SAS 9.1 for Windows. SAS Institute. Cary, NC
32. Shahidi, F. (1990). Canola and rapeseed production, chemistry, nutrition and processing technology. In: global production and distribution chapter 1, Fereidoon, S. (Ed.). Published by Van Nostrand Reinhold, New York, ISBN: 0.442.00295-5, pp: 3-14.
33. Sulieman, M. A., Hassan, A. B., Osman, G. A., El Tyeb, M. M., El Khalil, E. A. I., El Tinay A. H. & Babiker, E. E. (2008). Changes in total protein digestibility, fractions content and structure during cooking of lentil cultivars. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(6), 801-805.
34. Van Soest, P. J. & Mason, V. C. (1991). The influence of the Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 32, 45-53.
35. Van Soest, P. J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.
36. Van soest, P. J., Sniffen, C. J., Oconnor, J. D., Fox, D. G. & Russel, J. B. (1992). Anet carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: 2. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal. Science*, 70, 3562-3577.
37. Xi, J., Wang, X., Li, S., Zhou, X., Yue, L., Fan, J. & Hao, D. (2006). Polyethylene glycol fractionation improved detection of lowabundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. *Phytochemistry*, 67, 2341-2348.
38. Yu, P., Goelema, J. O., Leury, B. J., Tamminga, S. & Egan, A. R. (2002). An analysis of the nutritive value of heat processed legume seeds for animal production using the DVE/OEB model: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 99, 141-176.

Iranian Journal of Animal Science, Vol. 47, No. 1, Spring 2016

The effect of physical and chemical treatments on crude protein fractions of canola and safflower seeds using CNCPS and SDS-PAGE

Maryam Sahebi Ala[1], Farokh Kafilzadeh[2*] and Masoumeh Heydari[3]
1, 2, 3. Former M. Sc. Student, Associate Professor and Former M. Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Razi University of Kermanshah, Iran
(Received: Aug. 27, 2013 - Accepted: Jan. 29, 2016)

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of physical and chemical processing on crude protein fractions of two varieties of canola (Okapi and Modena) and safflower (62 and Zarfan) seed using cornel net carbohydrate and protein system and on protein subunits using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Formaldehyde was used as chemical treatment, while toasting and autoclaving were used as physical treatments. In vitro protein fractionations were determined to find out the contribution of different protein fractions (A, B1, B2, B3, C and NDIP). Results showed that there was significant difference in OM, CP, EE, NDF and ADF in canola and safflower seeds ($p<0.001$). The proportion of soluble crude protein fraction (SCP) decreased while B2and B3 fractions increased as the result of processing. Formaldehyde had a more significant impact than the other two treatments. The SDS-PAGE pattern of varieties showed that treatment with toasting had no effect on protein bands in canola and safflower varieties while autoclaving resulted in the disappearance of some bands and formaldehyde resulted in the disappearance of all bands with molecular weights higher than 14.4 KD in canola but not in safflower varieties.

Keywords: Canola seed, comell net carbohydrate and protein system, safflower seed, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

* Corresponding author E-mail: kafilzadeh@razi.ac.ir Tel: +98 933 5936924