Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 15, Issue 2, 2024 p: 131-139

OPEN ACCESS

**Research Paper**

# Comparative Evaluation of Protein Values and Electrophoretic Patterns of Buffalo Milk and Cow Milk Proteins by the SDS-PAGE Method

**Maryam Karimi-Dehkordi[1], Hadis Karampour[2], Seyede Zeinab Peighambarzadeh[3] and Majid Gholami-Ahangaran[1]**

1- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2- Department of Food Industry Engineering, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran
3- Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Shoushtar, Iran,
(Corresponding author: peighambarzade@yahoo.com)

Received: 07 May, 2023 Accepted: 10 December, 2023

## Extended Abstract

**Background**: Milk is a complex physiological and biological liquid that contains water, protein, lactose, fat, vitamins, and minerals. Milk proteins (lactoferrin and lactoperoxidase) are known to have antimicrobial and immunomodulatory effects. More than half of the world's population consumes buffalo milk and milk products. Due to its unique properties, buffalo milk is highly regarded in developing countries and has been cultured in Iran for a long time. The main proteins of milk are casein and whey. Casein exists in the form of micelles, and 80% of milk proteins include alpha S1 casein, alpha S2 casein, beta casein, and kappa casein. Whey proteins comprise about 20% of milk proteins, which have four main components, including betalactoglobulin, alphalactalbumin, bovine serum albumin, and immunoglobulin. Lactoferrin, peptone protease, calmodulin, prolactin, and folate-binding proteins are also found in milk and are considered accessory proteins. Milk proteins have positive effects on different structures of the body, such as the immune, nervous, digestive, and cardiovascular systems. In addition, milk proteins are considered to contain a wide variety of biologically active peptides with superior nutritional and immunological activities. Therefore, obtaining complete information about the physicochemical properties of milk from different species and its nutritional value seems essential for liquid milk technology. Milk proteins have been analyzed continuously, and the information about this very important and complex system has been increasingly rising in recent years, mainly due to technological advances. In addition, the scope of research work on the analysis of proteins in milk has increased significantly due to the increased knowledge of bioactive proteins in milk. The present study aimed to measure the total protein values of cow and buffalo milk samples in the climatic conditions of Khuzestan province. The electrophoretic pattern of buffalo milk proteins was also compared with cow milk.

**Methods**: Milk samples were collected from 30 apparently healthy cows and 30 buffaloes from the surrounding villages of Shushtar City and cattle farms of Masjid Suleiman City. Raw milk proteins were then evaluated by the Kjeldahl method. To measure milk proteins, milk was first digested with the addition of sulfuric acid with gentle heat. Complete digestion continued until the milk became colorless. After cooling, distillation was done by adding boric acid and methyl red, and the contents were titrated with 0.1 normal tetrazole sulfuric acid. The first color change marked the end of the titration, followed by calculating the protein content. After separating milk serum, the milk protein content in these two types of animals was compared with the sodium dodecyl sulfate (SDS) plate method. In this technique, milk protein molecules are linearized using SDS, and their movement is based on weight, that is, the larger the protein, the shorter the traveled distance. The relationship between the distance traveled by proteins and the logarithm of their molecular weight was investigated and milk proteins were identified in the samples. T-test statistical analysis was used to compare the average total protein in cows and buffaloes at a 95% confidence level as the statistical significance ($p < 0.05$).

**Results**: In sodium dodecyl sulfate plates, standard samples were able to create 14, 18, 22, and 70 kD bands for alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, casein, and albumin proteins according to the protein marker. The average protein contents of buffalo and cow milk samples were equal to 4.71±1.79 and 3.91±1.19 mg/liter, respectively, meaning that the total protein content in buffalo milk is significantly higher than that of the cow ($p < 0.05$). In addition, cow's milk contained

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15 ]

[ DOI: 10.61186/rap.15.2.131 ]

Copyright ©2024 Karimi-Dehkordi et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

lower levels of beta-lactoglobulin and casein than buffalo's milk while the amount of alpha-lactalbumin in cow's milk was higher than in buffalo's milk. The bands obtained from the electrophoresis of casein and alpha-lactalbumin on the gel showed genetic diversity among the subunits of casein and alpha-lactalbumin in cow and buffalo milk samples.
**Conclusion**: In the comparison of the protein profile in animal milk, various reports show that protein profiles of milk are different in animal species. So far, the protein profile of buffalo milk has not been compared in the literature, which was investigated in this study. In general, the present study shows that cow and buffalo milk are different in terms of the protein profile due to the higher total protein content, especially the casein and beta-lactoglobulin levels in buffalo's milk than in cow's milk. It seems that the nutritional value of buffalo milk is higher than cow milk.

**Keywords:** Amino Acid, Biotechnology, dairy product, livestock, Nutritional value

**How to Cite This Article:** Karimi-Dehkordi, M., Karam pour, H., Peighambarzadeh, S. Z., & Gholami-Ahangaran, M. (2024). Comparative Evaluation of Protein Values and Electrophoretic Patterns of Buffalo Milk and Cow Milk Proteins by the SDS-PAGE Method. *Res Anim Prod,* 15(2), 131-139. DOI: 10.61186/rap.15.2.131

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15 ]

[ DOI: 10.61186/rap.15.2.131 ]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

# ارزیابی مقایسه‌ای مقادیر پروتئین و الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های شیر گاومیش و شیر گاو با روش SDS-PAGE

مریم کریمی دهکردی[۱]، حدیث کرم‌پور[۲]، سیده زینب پیغمبرزاده[۳] و مجید غلامی آهنگران[۱]

۱- گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲- گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران
۳- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران، (نویسنده مسوول: peighambarzade@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۹
صفحه: ۱۳۱ تا ۱۳۹

## چکیده مبسوط

**مقدمه و هدف:** شیر یک مایع پیچیده فیزیولوژیکی و بیولوژیکی است که حاوی آب، پروتئین، لاکتوز، چربی، ویتامین‌ها و مواد معدنی است. پروتئین‌های شیر (لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز) به‌دلیل داشتن اثر ضد میکروبی و تعدیل کننده ایمنی شناخته شده است. در بیش از نیمی از جمعیت جهان شیر و فراورده‌های شیر گاومیش مصرف می‌شوند. شیر گاومیش به‌دلیل خواص منحصر به‌فرد در کشورهای در حال توسعه بسیار مورد توجه قرار گیرد و پرورش آن در ایران از دیرباز وجود داشته است. پروتئین‌های اصلی شیر کازئین و آب پنیر هستند. کازئین به شکل میسل وجود دارد و ۸۰ درصد پروتئین‌های شیر شامل آلفا اس یک کازئین، آلفا اس دو کازئین، بتا کازئین و کاپا کازئین می‌باشد. پروتئین‌های آب پنیر حدود ۲۰ درصد پروتئین‌های شیر هستند که دارای چهار جزء اصلی شامل بتالاکتوگلوبولین، آلفالاکتالبومین، آلبومین سرم گاوی و ایمونوگلوبولین هستند. پروتئین‌هایی مانند لاکتوفرین، پروتئوز پپتون، کالمودولین، پرولاکتین و پروتئین‌های اتصال دهنده فولات نیز در شیر یافت می‌شوند و به‌عنوان پروتئین‌های فرعی در نظر گرفته می‌شوند. پروتئین‌های شیر اثرات مثبتی بر ساختارهای مختلف بدن مانند سیستم ایمنی، عصبی، گوارشی و سیستم قلبی عروقی دارند. علاوه بر این، پروتئین‌های شیر به‌عنوان طیف گسترده‌ای از پپتیدهای فعال بیولوژیکی با فعالیت‌های تغذیه‌ای و ایمنی برتر در نظر گرفته می‌شوند. بنابراین دستیابی به اطلاعات کاملی درباره خواص فیزیکوشیمیایی شیر گونه‌های مختلف و ارزش تغذیه‌ای آن برای تکنولوژی شیر مایع ضروری به‌نظر می‌رسد. پروتئین‌های شیر به‌طور مداوم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند و اطلاعات مربوط به این سیستم بسیار مهم و پیچیده در سال‌های اخیر به‌طور فزاینده‌ای افزایش یافته است که عمدتاً به‌دلیل پیشرفت‌های تکنولوژی بوده است. علاوه بر این، به‌دلیل افزایش آگاهی در مورد پروتئین‌های فعال زیستی موجود در شیر، وسعت کار تحقیقاتی بر روی تجزیه و تحلیل پروتئین‌های موجود در شیر به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است. مطالعه حاضر با هدف اندازه‌گیری مقادیر پروتئین تام نمونه‌های شیر گاو و گاومیش در شرایط آب و هوایی استان خوزستان انجام شد. همچنین الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های شیر گاومیش با شیر گاو مقایسه گردید.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌های شیر، از ۳۰ گاو و ۳۰ گاومیش به ظاهر سالم از روستاهای اطراف شهرستان شوشتر و گاوداری‌های شهرستان مسجدسلیمان جمع‌آوری گردید. پس از آن پروتئین‌های شیر خام به‌روش کجلدال مورد ارزیابی قرار گرفت.
جهت سنجش پروتئین‌های شیر، ابتدا شیر با اضافه شازی اسید سولفوریک و در کنار حرارت ملایم هضم شد. هضم کامل تا زمان بی‌رنگ شدن شیر ادامه می‌یابد. پس از خنک شدن، با اضافه‌سازی اسید بوریک و متیل رد تقطیر انجام شد و محتویات با تترازول اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد. اولین تغییر رنگ نشانه پایان تیتراسیون بود. در نهایت میزان پروتئین محاسبه گردید. در مرحله بعد سرم شیر جداسازی شد و با روش صفحات سدیم دودسیل سولفات میزان پروتئین شیر در این دو نوع دام مقایسه گردید. در این تکنیک مولکول‌های پروتئینی شیر با استفاده از سدیم دودسیل سولفات به‌صورت خطی در می‌آیند و حرکت آن‌ها بر اساس وزن می‌باشد به‌طوریکه هرچه پروتئین بزرگتر باشد مسافت طی شده کمتر خواهد بود. ارتباط مسافت طی شده پروتئین‌ها با لگاریتم وزن مولکولی آنها بررسی شد و پروتئین‌های شیر شناسایی گردید. برای مقایسه میانگین توتال پروتئین در گاو و گاومیش، از آنالیز آماری تی‌تست استفاده شد. سطح اطمینان ۹۵ درصد از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد ($p<0/05$).

**یافته‌ها:** در صفحات سدیم دودسیل سولفات، نمونه‌های استاندارد بر طبق مارکر پروتئینی توانستند باندهای ۱۴، ۱۸، ۲۲ و ۷۰ کیلو دالتونی برای پروتئین‌های آلفا لاکتالبومین، بتالاکتوگلوبولین، کازئین و آلبومین ایجاد کنند. میانگین پروتئین شیر گاومیش برابر با ۴/۷۱±۱/۷۹ میلی‌گرم در لیتر و برای پروتئین شیر گاو ۹۱/۱۹±۳/۱ میلی‌گرم در لیتر است که میزان پروتئین تام در شیر گاومیش به‌طور معنی‌دار بیشتر از گاو است ($p<0/05$). علاوه بر این مشخص گردید که شیر گاو نسبت به شیر گاومیش میزان بتالاکتوگلوبولین و کازئین کمتری دارد، درحالی‌که میزان آلفالاکتالبومین شیر گاو از شیر گاومیش بالاتر بود. باندهای حاصل از الکتروفورز کازئین و آلفا لاکتالبومین بر روی ژل نشان می‌دهد تنوع ژنتیکی در بین زیرواحدهای کازئین و آلفالاکتالبومین در شیر گاو و گاومیش وجود دارد.

**نتیجه‌گیری:** در ارتباط با مقایسه پروفایل پروتئینی در حیوانات گزارشات مختلفی وجود دارد که نشان می‌دهد در گونه‌های مختلف حیوانات، پروفایل پروتئینی شیر متفاوت است. تاکنون به مقایسه پروفایل پروتئینی شیر گاو و گاومیش پرداخته نشده که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است. به‌طور کلی مطالعه حاضر نشان می‌دهد شیر گاو و گاومیش از نظر پروفایل پروتئین‌های موجود در شیر متفاوت هستند و با توجه به بالاتر بودن میزان پروتئین تام و به‌ویژه میزان کازئین و بتالاکتوگلوبولین در شیر گاومیش در مقایسه با شیر گاو، به‌نظر می‌رسد ارزش غذایی شیر گاومیش در مقایسه با شیر گاو بیشتر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ارزش غذایی، اسید آمینه، بیوتکنولوژی، دام، فراورده لبنی

## مقدمه

شیر کامل‌ترین غذایی است که می‌تواند مورد استفاده انسان قرار گیرد. به‌همین منظور یکی از فعالیت‌های اساسی دامداری در دنیا پرورش دام‌های شیری است (Besler *et al.*, 2001). شیر یک مایع پیچیده فیزیولوژیکی و بیولوژیکی است که حاوی آب، پروتئین، لاکتوز، چربی، ویتامین‌ها و مواد معدنی به‌عنوان اجزای اصلی آن است. غلظت لاکتوز، پروتئین‌ها، لیپیدها و نمک‌های معدنی شیر به‌ترتیب ۵، ۳.۲، ۴ و ۰/۷ درصد است. شیر یک مایع زیستی است که در پستانداران برای تغذیه نوزادانشان و تأمین مواد مغذی مهم برای رشد و نمو تکامل یافته است. پروتئین‌های شیر (یعنی لاکتوفرین و لاکتوپراکسیداز) به‌دلیل داشتن اثر ضد میکروبی

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15 ]

[ DOI: 10.61186/rap.15.2.131 ]

و تعدیل کننده ایمنی شناخته شده است (Balamurugan *et al*., 2020، Kausar *et al*., 2017). این ماده غذایی از یک ترکیب پیچیده تشکیل شده که شامل چربی، پروتئین، قند لاکتوز، عناصر معدنی، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها و آب می‌باشد. بیش از نیمی از جمعیت جهان در نواحی خاور دور و نزدیک و برخی قسمت‌های اروپا شیر و فراورده‌های شیر گاومیش را مصرف می‌کنند. بازده بالای گاومیش شیری در تولید شیر در کنار سایر خواص منحصر به‌فرد آن باعث شده که شیر گاومیش در کشورهای در حال توسعه بسیار مورد توجه قرار گیرد. در ایران گاومیش یکی از دام‌های بومی بوده و پرورش آن از ۲۵۰۰ سال پیش از میلاد در ایران وجود داشته است (D'auria *et al*., 2005; Costa *et al*., 2014). پروتئین شیر در دوران پس از زایمان نیازهای تغذیه‌ای نوزاد را تأمین می‌کند. پروتئین‌های اصلی شیر کازئین و آب پنیر هستند. کازئین به‌شکل میسل وجود دارد و ۸۰ درصد پروتئین‌های شیر شامل آلفا اس یک کازئین، آلفا اس دو کازئین، بتا کازئین و کاپا کازئین هستند. پروتئین‌های آب پنیر حدود ۲۰ درصد پروتئین‌های شیر هستند که دارای چهار جزء اصلی شامل بتالاکتوگلوبولین، آلفالاکتالبومین، آلبومین سرم گاوی و ایمونوگلوبولین هستند. پروتئین‌هایی مانند لاکتوفرین، پروتئوز پپتون، کالمودولین، پرولاکتین و پروتئین‌های اتصال دهنده فولات نیز در شیر یافت می‌شوند و به‌عنوان پروتئین‌های فرعی در نظر گرفته می‌شوند (Cozma *et al*., 2011, Yang *et al*., 2013). پروتئین‌های شیر اثرات مثبتی بر ساختارهای مختلف بدن مانند سیستم ایمنی، عصبی، گوارشی و سیستم قلبی عروقی دارند. علاوه بر این، پروتئین‌های شیر به‌عنوان هسته طیف گسترده‌ای از پپتیدهای فعال بیولوژیکی با فعالیت‌های تغذیه‌ای و ایمنی برتر در نظر گرفته می‌شوند. تعدادی از پپتیدهای فعال زیستی برای درمان چندین بیماری مانند اسهال، فشار خون بالا، ترومبوز، بیماری‌های بهداشتی دندان، سوء جذب مواد معدنی و بیماری‌های مرتبط با کمبود ایمنی استفاده می‌شوند. آب پنیر یک مکمل غذایی معروف است که به تنظیم سیستم ایمنی بدن، افزایش قدرت عضلانی و جلوگیری از تعدادی از بیماری‌های استخوانی و قلبی کمک می‌کند (Tay & Gam, 2011; Dixit *et al*., 2016; Yasmin *et al*., 2020). بنابراین دستیابی به اطلاعات کاملی در باره خواص فیزیکوشیمیایی شیر گونه‌های مختلف و ارزش تغذیه‌ای آن برای تکنولوژی شیر مایع ضروری به‌نظر می‌رسد (Hanula-Kövér, 2006). پروتئین‌های شیر به‌طور مداوم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند و اطلاعات مربوط به این سیستم بسیار مهم و پیچیده در سال‌های اخیر به‌طور فزاینده‌ای افزایش یافته است که عمدتاً به‌دلیل پیشرفت‌های تکنولوژی بوده است (Purna et al., 2005; Chitra *et al*., 2013). علاوه بر این، به‌دلیل افزایش آگاهی در مورد پروتئین‌های فعال زیستی موجود در شیر، وسعت کار تحقیقاتی بر روی تجزیه و تحلیل پروتئین‌های موجود در شیر به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است (Yoo *et al*., 2019). شیر گونه‌های مختلف ممکن است از نظر کیفیت و کمیت پروتئین متفاوت باشد (Gervilla *et al*., 2000). با توجه به موارد مذکور مطالعه حاضر با هدف اندازه‌گیری مقادیر پروتئین تام نمونه‌های شیر گاو و گاومیش در شرایط آب و هوایی استان خوزستان همراه با بررسی و تعیین الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های سرم شیر گاومیش جهت مقایسه الگو و مقادیر پروتئینی شیر گاو صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های شیر، از ۳۰ گاو به‌ظاهر سالم نژاد هلشتاین و ۳۰ گاومیش به‌ظاهر سالم نژاد خوزستانی از روستاهای اطراف شهرستان شوشتر و گاوداری‌های شهرستان مسجدسلیمان جمع‌آوری گردید و پس از آن برای انجام آزمایشات به آزمایشگاه انتقال داده شد و در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد در ظروف آزمایشگاهی درب‌دار نگهداری شد.

### اندازه‌گیری پروتئین تام

روش اندازه‌گیری پروتئین در این مطالعه روش کجلدال بوده است. در مرحله اول ابتدا حدود یک گرم از نمونه را وزن کرده و در بالن کجلدال ریخته و حدود ۰/۳ گرم کاتالیزور سلنیوم را به بالن اضافه کرده و مخلوط شد، سپس حدود ۲۵ سی‌سی اسید سولفوریک ۹۸ درصد به بالن اضافه شد. پس از مخلوط کردن آرام محتویات درون بالن، آن را روی اجاق هضم کجلدال قرار داده و برای مدت یک ساعت به آرامی حرارت می‌دهیم و در طی این مدت چند بار محتویات بالن را مخلوط می‌کنیم. بعد از یک ساعت حرارت را افزایش داده و به‌مدت ۴-۳ ساعت تا هضم کامل آن‌را ادامه می‌دهیم. هضم کامل زمانی است که محلول کاملاً بیرنگ و یا کمی مایل به سبز باشد.

پس از خنک شدن به آرامی ۳۰۰ سی‌سی آب مقطر در چندین مرحله به بالن اضافه کرده و خوب مخلوط نموده و اجازه می‌دهیم خنک شود. در مرحله بعد یک ارلن مایر ۴۰۰ سی‌سی برداشته و ۶۰ سی‌سی محلول اسید بوریک ۴ درصد دارای معرف متیل رد در آن ریخته و در زیر لوله‌های دستگاه تقطیر کجلدال قرارمی‌دهیم به‌طوری که سر لوله در زیر سطح اسید بوریک باشد. تعدادی گلوله شیشه‌ای در بالن کجلدال می‌ریزیم. آن‌گاه مقدار۱۰۰ سی‌سی سود ۴۰ درصد را به آرامی به بالن اضافه کرده و خیلی سریع آن‌را به چوب پنبه لوله‌های دریافت دستگاه تقطیر وصل کرده و محتویات بالن را خوب مخلوط کرده و شیر آب دستگاه را باز کرده و اجاق را روشن می‌نماییم. محتویات ارلن را با تیترازول اسید سولفوریک یک‌دهم نرمال تیتر می‌کنیم، اولین رنگ صورتی نشانه پایان تیتراسیون می‌باشد. در نهایت مقدار پروتئین به‌دست می‌آید (Lynch & Barbano, 1999).

### جداسازی سرم شیر

جهت جداسازی سرم شیر ابتدا دمای شیر تام به ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و نمونه شیر تام به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ گرم سانتریفوژ گردید. پس از اتمام مدت زمان سانتریفوژ لایه چربی که روی نمونه شیر تشکیل شده بود با استفاده از پی‌پت پاستور برداشته شد و شیر بدون چربی به داخل لوله دیگر انتقال و دمای آن به‌وسیله‌ی بن‌ماری به ۲۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. به‌منظور انعقاد کازئین pH شیر بدون چربی با اضافه کردن تدریجی (قطره قطره) اسید کلریدریک یک مولار به ۶/

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15 ]
[ DOI: 10.61186/rap.15.2.131 ]

۴ (PH ایزوالکتریک کازئین) رسانده شد. پس از انعقاد کازئین نمونه به‌مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید تا کازئین در ته لوله رسوب کند و سرم شیر جدا گردد. پس از اتمام مدت زمان سانتریفیوژ سرم شیر با استفاده از پی‌پت پاستور برداشته و به داخل لوله دیگر انتقال داده شد. در نهایت جهت حذف باقی‌مانده‌های کازئین سرم شیر از کاغذ واتمن شماره ۱ عبور داده شده و تحت عملیات تغلیظ قرار گرفت (Huppertz *et al*., 2006).

**الکتروفورز به‌روش صفحات سدیم دودسیل سولفات**

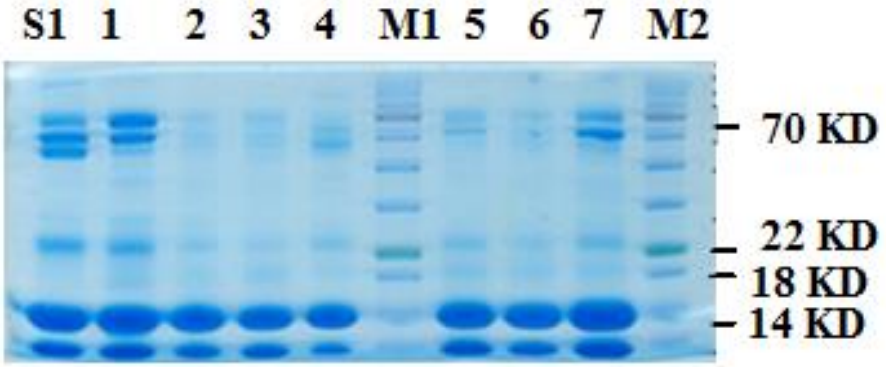
محلول ژل مورد استفاده از اجزای آن با توجه به درصد مورد نظر تهیه شد. اجزای ژل در غلظت ۱۲ درصد عبارتند از: ۳ میلی‌لیتر بافر ژل پایین، ۴/۹ میلی‌لیتر محلول اکریل‌آمید بیس، ۴/۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر محلول آمونیوم پر سولفات و ۵۰ میکرولیتر تمد. ابتدا اجزای ژل به‌غیر از تمد در یک ظرف مناسب مخلوط شده و سپس تمد به آن‌ها اضافه گردید. پس از هم‌زدن به‌سرعت در فضای مابین صفحات شیشه‌ای تا ارتفاع مناسب ریخته شد. به‌طوری‌که حدود ۳-۲ سانتی‌متر فضا برای اضافه نمودن ژل بالا باقی بماند. سپس ژل با الکل ایزو پروپانول پوشانده شد. انعقاد ژل پایین حدود ۴۵-۱۵ دقیقه به‌طول انجامید. محلول ژل بالا با اجزای ژل بالا با غلظت ۵ درصد ساخته شد. اجزای ژل بالا در غلظت ۵ درصد عبارتند از: ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر ژل بالا و ۸۱۰ میکرولیتر محلول اکریل‌آمید بیس و ۲/۹ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر آمونیوم پر سولفات و ۱۵ میکرولیتر تترا متیل اتیلن دی‌آمین (تمد)[1]. پس از خالی کردن ایزوپروپانول محلول ژل بالا روی ژل پایین ریخته و سپس شانه در ژل بالا فرو برده شد. به‌طوری‌که دندانه‌های شانه حدود ۱/۵ سانتی‌متر از سطح ژل پایین فاصله داشتند. انعقاد ژل بالا حدود ۱۵ دقیقه به‌طول انجامید. بافر نمونه به نمونه پروتئین اضافه گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ظرف حاوی آب جوش قرار داده شد. سپس با سرنگ همیلتون یا سمپلر مناسب ۱۰/۲۵ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌ها ریخته شد. ولتاژ و مدت‌زمان مورد استفاده به‌منظور جداسازی باندهای پروتئینی در سرم شیر به‌ترتیب ۱۲۰ ولت و ۶۰ دقیقه بود. پس از گذشت این مدت زمان، ژل برای مدت زمان ۲۴ ساعت به ظرف حاوی رنگ جهت رنگ‌آمیزی انتقال داده شد. رنگ‌آمیزی با استفاده از کوماسی‌بلو انجام گرفت. پس از اینکه ژل به‌مدت ۲۴ ساعت در ظرف حاوی رنگ قرار گرفت ژل کاملاً با آب مقطر شسته شد و سپس محلول رنگ‌بر به آن اضافه گردید. پس از تیره شدن محلول رنگ‌بر، با محلول تازه تعویض شد این عمل چند بار تکرار گردید تا ژل شفاف شد و باندهای پروتئینی به‌وضوح دیده شدند. بعد از الکتروفورز، ژل‌ها در ظرف حاوی محلول نگهدارنده قرار داده شد و به‌وسیله دستگاه دانسیتومتر (DensityMeter, Mettler Toledo, Germany) بررسی و در نهایت منحنی‌های به‌دست آمده از نمونه‌های مختلف مقایسه گردیدند.

**آنالیز آماری**

نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، ویرایش ۱۹ آنالیز شدند. برای مقایسه میانگین توتال پروتئین در گاو و گاومیش، از آنالیز آماری تی‌تست استفاده شد. سطح اطمینان ۹۵ درصد از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد ($p<0/05$).

## نتایج و بحث

شکل ۱، شیب پروتئینی شیر گاو و گاومیش را نشان می‌دهد. نمونه‌های استاندارد بر طبق مارکر پروتئینی توانستند باندهای ۱۴، ۱۸، ۲۲ و ۷۰ کیلودالتونی برای پروتئین‌های آلفا لاکتالبومین، بتالاکتوگلوبولین، کازئین و آلبومین ایجاد کنند.

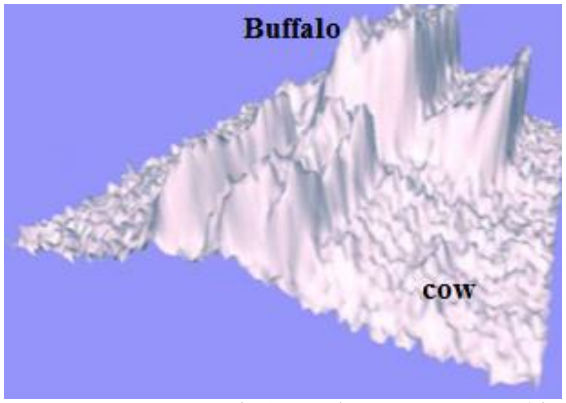



شکل ۱- الکتروفورز محصول SDS (S1: استاندارد، C1 تا C7: نمونه‌های مثبت مربوط به گاومیش، M1 و M2: مارکرها)
Figure 1. The electrophoresis of SDS page product (S1: standard, C1 to C7: positive samples, M1 & M2: Markers).

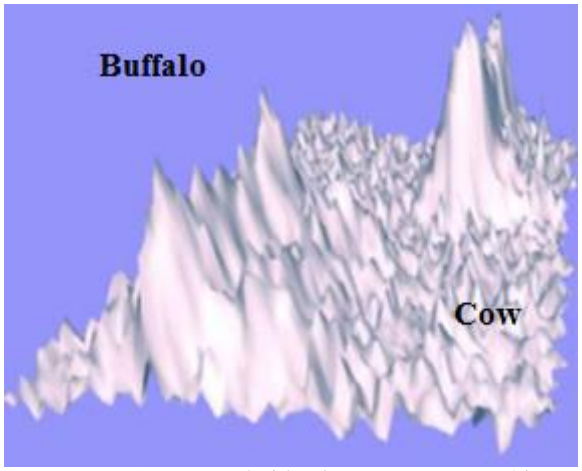
در بررسی میزان کازئین و بتالاکتوگلوبولین مشخص گردید که کازئین و بتالاکتوگلوبولین در شیر گاومیش بیشتر از شیر گاو است. در بررسی کازئین مشخص گردید که کازئین در چندین باند تشکیل شده که ممکن است چهار بخش کازئین و تنوع ژنتیکی خود را نشان دهد (شکل ۲). علاوه بر آن، در شیر گاومیش دو باند از آلفا لاکتالبومین بر روی ژل ظاهر شدند (شکل ۴).

[1] Tetramethylethylenediamine-TEMED

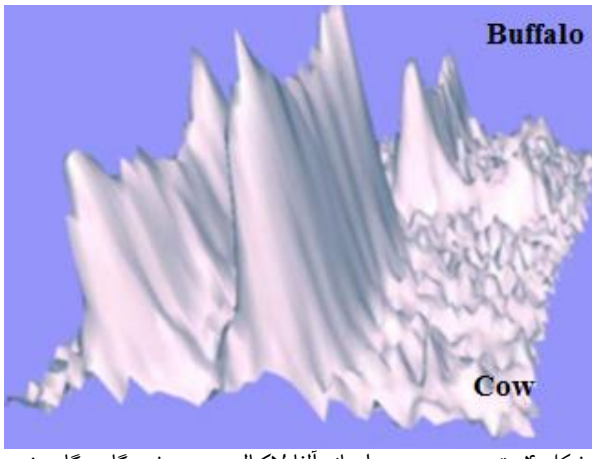
[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15 ]
[ DOI: 10.61186/rap.15.2.131 ]




شکل ۲- تصویر سه بعدی از گروه‌های کازئین در شیر گاو و گاومیش
Figure 2. The topography of casein level in milk of cow and buffalo




شکل ۳- تصویر سه بعدی از بتالاکتالبومین شیر گاو و گاومیش
Figure 3. The topography of Beta-lactoglobulin level in milk of cow and buffalo




شکل ۴- تصویر سه بعدی از باند آلفا لاکتالبومین در شیر گاو و گاومیش
Figure 4. The topography of Alfa-lactalbumin level in milk of cow and buffalo

جدول ۱- مقادیر توتال پروتئین در شیر گاومیش و گاو (میلی‌گرم بر لیتر)
Table 1. Total protein values in buffalo and cow milk (mg/lit)

| Animal<br>حیوان | Minimum<br>مینیمم | Maximum<br>ماگزیمم | Mean<br>میانگین | p-value<br>عدد پی |
|---|---|---|---|---|
| Buffalo<br>گاومیش | 0.36 | 7.74 | 4.71±1.79 | 0.048 |
| Cow<br>گاو | 0.44 | 6.24 | 3.91±1.19 | |

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15 ]
[ DOI: 10.61186/rap.15.2.131 ]

چنانچه قابل ملاحظه است به‌ترتیب میانگین پروتئین شیر گاومیش برابر با ۱/۷۹±۴/۷۱ میلی‌گرم در لیتر و برای پروتئین شیر گاو ۱/۱۹±۳/۹۱ میلی‌گرم در لیتر است (جدول ۱). نتایج نشان می‌دهد که بین میانگین پروتئین شیر گاومیش و شیر گاو تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<0.05$).

شیر کامل‌ترین غذایی است که می‌تواند مورد استفاده انسان قرار گیرد. به‌همین منظور یکی از فعالیت‌های اساسی دامداری در دنیا پرورش دام‌های شیری است. این ماده غذایی از یک ترکیب پیچیده تشکیل شده که شامل چربی، پروتئین، قند لاکتوز، عناصر معدنی، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها و آب می‌باشد (Karoui, 2003). بازده تولید زیاد گاومیش شیری، عملکرد بالای شیر با چربی و مواد جامد بالا موجب شده است که این حیوان برای کشورهای در حال توسعه بسیار ارزشمند باشد. بنابراین دستیابی به اطلاعات کاملی در باره خواص فیزیکی و شیمیایی شیر گاومیش و ارزش تغذیه‌ای آن برای تکنولوژی شیر مایع ضروری به‌نظر می‌رسد (Tomotake *et al*., 2006). پروتئین‌های شیر گاو همانند دیگر ترکیبات آن، مورد مطالعه بیشتری در مقایسه با سایر گونه‌های شیری قرار گرفته است. پروتیئن‌های محلول در سرم شیر طبقه‌بندی می‌شوند که هریک نیز به‌نوبه خود متشکل از گروه‌های کوچکتری هستند. طبق نتایج پژوهش‌ها پروتئین‌های شیر اکثر پستانداران، مشابه شیر گاو است، حال آن‌که هر گروه پروتئینی از نظر ژنتیکی ویژگی‌هایی دارد که خاص گونه مربوطه می‌باشد (Karim, 2009). در مطالعه حاضر، میزان پروتئین شیر گاومیش بالاتر از میزان شیر گاو به‌دست آمد (۴/۷۱ در مقابل ۳/۹۱ درصد). توغدری و همکاران در سال ۲۰۲۲ نیز میزان درصد پروتئین شیر را در گاو هلشتاین به‌طور متوسط ۳/۶۵ درصد گزارش کردند (Toghdory *et al*., 2022) که مشابه با نتایج مطالعه ما می‌باشد. تاکنون، هیچ گونه‌ای که پروتئین‌های شیر آن شباهتی به سایر گونه‌ها داشته باشد، یافت نشده است و ترکیب شیر از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است به‌عنوان مثال شیر گاومیش در مقایسه با شیر گاو ۵۸ درصد کلسیم و ۴۰ درصد پروتئین بیشتری نسبت به شیر گاو دارد. در حالی‌که میزان کلسترول آن ۴۳ درصد کمتر از شیر گاو است. علاوه بر این، شیر گاو منبع خوبی از اسیدهای آمینه ضروری است که بسیار نزدیک به اسید آمینه مورد نیاز بدن انسان است (Urgu *et al*., 2019). شیر بز در مقایسه با شیر سایر حیوانات قابلیت هضم بیشتری دارد. علاوه بر این، پروتئین شیر بز، فعالیت ضد میکروبی دارد که نقش فعالی در حفظ زیستی در برابر عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند. ترکیبات موجود در شیر شتر نیز مشابه با ترکیبات موجود در شیر گاو است و اختلافات کمی با آن دارد به‌عنوان مثال میزان لاکتوز آن کمتر و مواد معدنی همچون آهن، پتاسیم، منیزیم، سدیم، روی و مس در شیر شتر بیشتر است. شیر گوسفند در مقایسه با شیر سایر گونه‌ها با سیستم گوارش انسان سازگارتر است (Ménard *et al*., 2010; Nikkhah, 2012). در مطالعات مختلفی به بررسی تفاوت پروتئین‌های شیر گونه‌های مختلف پرداخته شده است. توموتاکه و همکاران در سال ۲۰۰۶ تفاوت پروتئین شیر بز ژاپنی–سانن و گاو هلشتاین را مورد مطالعه قرار داد (Tomotake *et al*., 2006). نتایج نشان داد که آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین باندهای اصلی در شیر بز ژاپنی–سانن و گاو هلشتاین بودند. شیر بز و شتر حاوی مقادیر قابل اندازه‌گیری بتالاکتوگلوبولین نیستند (Park *et al*., 2007; Ozrenk & Inci, 2008). در نتیجه، پروتئین اصلی آب پنیر در شیر بز و شتر آلفالاکتالبومین است (Qian *et al*., 2017). این ویژگی‌ها در مقایسه با شیر گاو موجب کاهش واکنش آلرژیک به شیر و افزایش قابلیت هضم آن می‌گردد (Liu *et al*., 2011). تفاوت در مشخصات ترکیبی و تغذیه‌ای شیر به‌طور مستقیم با تکامل، اکولوژی جانوری، تغذیه، ژنتیک و محیطزیست مرتبط است (Maurice-Van Eijndhoven *et al*., 2011). به‌طوری‌که کریمی ازندریانی و همکاران در سال ۲۰۲۲ نشان دادند که افزودن استات سدیم به‌عنوان یک افزودنی غذایی می‌تواند سبب تغییرات معنی‌دار برخی ترکیبات شیر گردد (Karimi Azandariani *et al*., 2022). نتایج حاصل از مطالعات مختلف نشان می‌دهد شیر گاومیش از نظر مواد مغذی در مقایسه با شیر گاو غنی‌تر است. شیر گاومیش به‌طور میانگین حاوی ۱۶/۳درصد کلسیم و ۱۰/۱ درصد فسفر است که این اعداد در شیر گاو به‌ترتیب ۰/۱۲۷ و۰/۰۹۲ درصد است. شیر گاومیش ۴۳ درصد کلسترول کمتر و۴۰ درصد پروتئین بیشتر از شیر گاو دارد (Barta, 2007). در مطالعه حاضر مشخص شد که در شیر گاو در مقایسه با شیر گاومیش میزان کازئین کمتر است. همچنین بتالاکتوگلوبولین شیر گاومیش از شیر گاو تا حدودی بالاتر است.

## نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی مطالعه حاضر نشان می‌دهد شیر گاو و شیر گاومیش از نظر پروفایل پروتئین‌های موجود در شیر متفاوت هستند و با توجه به بالاتر بودن میزان پروتئین تام و به‌ویژه میزان کازئین و بتالاکتوگلوبولین در شیر گاومیش در مقایسه با شیر گاو به‌نظر می‌رسد ارزش غذایی شیر گاومیش در مقایسه با شیر گاو بیشتر باشد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمامی افرادی که در انجام این پژوهش همکاری کردند، تقدیر و تشکر می‌نمایند.

## References

Balamurugan, T. C., Prakash, K. P., Visha, P., Perumal, P., & Pradheep, N. (2020). Comparative electrophoretic studies on serum proteins of Murrah buffaloes at various stages of reproduction. *J Entomol Zool Stud*, 8(1), 1022-1024.

Barta, J. (2007). (Ed.). Fruit processing technologies. Budapest:Mezőgazda Kiadó, 396.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15 ]

[ DOI: 10.61186/rap.15.2.131 ]

Besler, M., Steinhart, H., & Paschke, A. (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756(1-2), 207-228. https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00110-4

Chitra, D. T., Manomani, E., & Ravikumar, R. (2013). Isolation and purification of proteins from cow and buffalo milk. *Int J Engg Res Indu Appls*, 6, 45-55.

Cozma, A., Andrei, S., Miere, D., Filip, L., & Loghin, F. (2011). Proteins profile in milk from three species of ruminants. *Notulae Scientia Biologicae*, 3(1), 26-29. http://dx.doi.org/10.15835/nsb315608

Costa, W. K. A. D., Souza, E. L. D., Beltrao-Filho, E. M., Vasconcelos, G. K. V., Santi-Gadelha, T., de Almeida Gadelha, C. A., ... & Magnani, M. (2014). Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the Alpine and Saanen breeds in northeastern Brazil and related antibacterial activities. *PLoS One*, 9(3), e93361.

D'auria, E., Agostoni, C., Giovannini, M., Riva, E., Zetterström, R., Fortin, R., Franco Greppi, G., Bonizzi, L., & Roncada, P. (2005). Proteomic evaluation of milk from different mammalian species as a substitute for breast milk. *Acta Paediatrica*, *94*(12), 1708-1713. https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2005.tb01842.x

Dixit, S., Pandey, V., Swain, D. K., Nigam, R., Sharma, A., Sharma, D., Saxena, A., & Singh, P. (2016). Seminal plasma and sperm membrane proteins of buffalo and cattle bulls. *Buffalo Bulletin*, *35*(3), 437-443.

Purna, S. G., Prow, L. A., & Metzger, L. E. (2005). Utilization of front-face fluorescence spectroscopy for analysis of process cheese functionality. *Journal of dairy science*, *88*(2), 470-477. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72708-9

Gervilla, R., Ferragut, V., & Guamis, B. (2000). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of Dairy Science*, *83*(4), 674-682. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74928-9

Hanula-Kövér, G. (2006). Monitoring the protein composition and immunoreactivity of milks of different origins. M.Sc. thesis, Faculty of Food Science, Corvinus University of Budapest, Budapest, Hungary.

Huppertz, T., Hennebel, J. B., Considine, T., Kelly, A. L., & Fox, P. F. (2006). A method for the large-scale isolation of β-casein. *Food chemistry*, 99(1), 45-50. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.025

Karim, G. (2009). Hygiene and Technology of milk.

Karimi Azandariani, S., Ganjkhanlou, M., Rezayazdi, K., Zali, A., & Zhandi, M. (2022). The Effect of Sodium Acetate and Conjugated Linoleic Acid on Feed Intake, Body Weight, Blood Metabolites, Milk Production and Composition and Liver Health Indicators in Fresh Cows. *Research on Animal Production*, *13*(38), 69-79.

Karoui, R., Laguet, A., & Dufour, É. (2003). Fluorescence spectroscopy: A tool for the investigation of cheese melting-Correlation with rheological characteristics. *Le Lait*, *83*(3), 251-264. https://doi.org/10.1051/lait:2003014

Kausar, R., Hameed, A., Qureshi, Z. I., & Muhammd, G. (2017). Comparative Protein Profiling of Milk of Nili-Ravi Buffaloes, Sahiwal and Cross Bred Cows by SDS-PAGE. *Pakistan Veterinary Journal*, *37*(1).

Liu, C., Teng, Z., Lu, Q. Y., Zhao, R. Y., Yang, X. Q., Tang, C. H., & Liao, J. M. (2011). Aggregation kinetics and ζ-potential of soy protein during fractionation. *Food Research International*, *44*(5), 1392-1400. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.054

Lynch, J. M., & Barbano, D. M. (1999). Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. *Journal of AOAC international*, *82*(6), 1389-1398. https://doi.org/10.1093/jaoac/82.6.1389

Maurice-Van Eijndhoven, M. H. T., Hiemstra, S. J., & Calus, M. P. L. (2011). Milk fat composition of 4 cattle breeds in the Netherlands. *Journal of Dairy Science*, *94*(2), 1021-1025. https://doi.org/10.3168/jds.2009-3018

Ménard, O., Ahmad, S., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Gaucheron, F., & Lopez, C. (2010). Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chemistry*, *120*(2), 544-551. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.053

Nikkhah, A. (2012). Equidae milk promises substitutes for cow and human breast milk. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, *36*(5), 470-475. https://doi.org/10.3906/vet-1105-10

Ozrenk, E., & Inci, S. S. (2008). The effect of seasonal variation on the composition of cow milk in Van Province. *Pakistan Journal of nutrition*, *7*(1), 161-164.

Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small ruminant research*, *68*(1-2), 88-113. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013

Qian, F., Sun, J., Cao, D., Tuo, Y., Jiang, S., & Mu, G. (2017). Experimental and modelling study of the denaturation of milk protein by heat treatment. *Korean journal for food science of animal resources*, *37*(1), 44. https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.44

Tay, E. P., & Gam, L. H. (2011). Proteomics of human and the domestic bovine and caprine milk. *J. Mol. Biol. Biotechnol*, *19*, 45-53.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15 ]

[ DOI: 10.61186/rap.15.2.131 ]

Toghdory, A., Ghoorchi, T., & Hossein Abadi, M. (2022). Effects of Saccharomyces Cerevisiae on Milk Production and Composition, Nutrient Digestibility and Blood Parameters in Dairy Cows. *Research On Animal Production*, *13*(38), 80-88.

Tomotake, H., Okuyama, R., Katagiri, M., Fuzita, M., Yamato, M., & Ota, F. (2006). Comparison between Holstein cow's milk and Japanese-Saanen goat's milk in fatty acid composition, lipid digestibility and protein profile. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *70*(11), 2771-2774.https://doi.org/10.1271/bbb.60267

Urgu, M., Türk, A., Ünlütürk, S., Kaymak-Ertekin, F., & Koca, N. (2019). Milk fat substitution by microparticulated protein in reduced-fat cheese emulsion: The effects on stability, microstructure, rheological and sensory properties. *Food science of animal resources*, *39*(1), 23. https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e60

Yang, T. X., Li, H., Wang, F., Liu, X. L., & Li, Q. Y. (2013). Effect of cattle breeds on milk composition and technological characteristics in China. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *26*(6), 896. https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12677

Yasmin, I., Iqbal, R., Liaqat, A., Khan, W. A., Nadeem, M., Iqbal, A., Chughtai, M.F.J., Rehman, S.J.U., Tehseen, S., Mehmood, T., & Khaliq, A. (2020). Characterization and comparative evaluation of milk protein variants from pakistani dairy breeds. *Food science of animal resources*, *40*(5), 689. https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e44

Yoo, J., Song, M., Park, W., Oh, S., Ham, J. S., Jeong, S. G., & Kim, Y. (2019). A comparison of quality characteristics in dairy products made from Jersey and Holstein milk. *Food science of animal resources*, *39*(2), 255. https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e20

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15 ]

[ DOI: 10.61186/rap.15.2.131 ]