نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۶ شماره ۴/ سال۱۳۹۵

مقایسه فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز در مایع شکمبه گوسفند نر فیستوله دار با برههای پرواری کشتار شده

فرانک دوستی[۱] و تقی قورچی[۲*]

تاریخ دریافت: ۹٤/۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱٦

[۱] دانشجوی دکتری گروه تغذیه دام و طیور دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[۲] استاد گروه تغذیه دام و طیور دانشکده علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[*]مسئول مکاتبه: Email: ghoorchi@gau.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: میکروب‌های شکمبه بواسطه آنزیم‌هایشان نقش مهمی در فرایند هضم ایفا می‌کنند. **هدف**: این مطالعه به‌منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های شکمبه کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز (بر اساس نانومول در دقیقه) انجام گرفت که از بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه شامل بخش وابسته به ذرات، خارج سلولی و درون سلولی نمونه‌برداری شد. **روش کار**: بدین منظور از مایع شکمبه۱۲ رأس برههای پرواری کشتار شده و گوسفندهای زنده فیستول شده نر در٤ گروه و ۳ تکرار استفاده گردید. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- گوسفندهای زنده فیستول شده تغذیه شده با کاه و کنسانتره در سطح نگهداری ۲- برههای پروار کشتار شده، تغذیه شده با کاه و کنسانتره، ۳- برههای پروار کشتار شده، تغذیه شده با کاه و کنسانتره و چرا از مرتع، ٤- برههای پروار کشتار شده، تغذیه شده با یونجه و کنسانتره، بودند. **نتایج**: نتایج نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های وابسته به ذرات و فعالیت کل آنزیم میکروکریستالین سلولاز (نانومول در دقیقه) در گوسفند زنده فیستول شده نسبت به سایر گروه‌ها بود. میزان فعالیت میکروکریستالین سلولاز در بخش وابسته به ذرات، خارج سلولی، درون سلولی و کل شیرابه شکمبه نسبت به فعالیت در آنزیم کربوکسی متیل سلولازدر بخش‌های مربوطه بیشتر بود. میزان فعالیت کل آنزیم میکروکریستالین سلولاز و کربوکسی متیل سلولاز در حیوان کشتار شده که با یونجه و کنسانتره (پروار) تغذیه شده، کمترین بود. pH مایع شکمبه گوسفند کشتار شده که با کاه و کنسانتره (پروار) کمتر از گروه‌های دیگر بود. **نتیجه‌گیری نهایی**: در مجموع، نتایج آزمایش نشان داد فعالیت کل آنزیم میکروکریستالین سلولاز گوسفند زنده فیستول شده بیشتر ولی فعالیت کل آنزیم کربوکسی متیل سلولاز در مایع شکمبه گوسفند کشتار شده که با کاه، چرا و کنسانتره (پروار) بیشترین بود.

واژگان کلیدی: کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، آنزیم، کشتار، فیستول شده، گوسفند

مقدمه

اگرچه قسمت عمده خوراک نشخوارکنندگان را دیواره سلول گیاهی تشکیل می‌دهد، ولیکن این حیوانات توانایی تولید آنزیم‌های لازم برای تجزیه سلولز و همی‌سلولز، که جز اصلی این خوراک‌های الیافی هستند، را ندارند. به‌همین دلیل حیوانات نشخوارکننده برای دستیابی و استفاده از ترکیبات دیواره سلولی، متکی به میکروارگانیسم‌های (باکتری‌ها، پروتوزوآ و قارچ‌ها) مستقر در شکمبه خود هستند. این میکروب‌ها از طریق آنزیم‌هایشان نقش مهمی در فرآیند هضم بازی می‌کنند.

هضم کامل خوراک‌هایی مثل علوفه خشک و دانه‌ها به صدها آنزیم نیاز دارد (پاتاک و همکاران ۱۹۹۶).
آنزیم‌های باکتریائی شکمبه دو دسته آنزیم‌های خارجی[1] و آنزیم‌های داخلی[2] هستند. بسیاری از آنزیم-های هیدرولیزکننده کربوهیدرات‌ها مترشحه از میکروارگانیسم‌ها به‌صورت خارج سلولی عمل می‌کنند. ترشح این آنزیم‌ها به محیط و تأثیر آن‌ها بر کربوهیدرات‌ها سبب آزاد شدن برخی از منوساکاریدها در مایع شکمبه–نگاری می‌گردد و در نتیجه مواد مغذی برای رشد میکروارگانیسم‌ها، به‌خصوص میکروارگانیسم‌هایی که قادر به ترشح این آنزیم‌های خارج سلولی نیستند را فراهم می‌سازد (دهوریتی ۱۹۹۸).
آنزیم‌های تجزیه‌کننده فیبر شامل فعالیت کل سلولاز (تجزیه کاغذ صافی)، کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز، می‌باشد. فعالیت این آنزیم‌ها در سه بخش مجزا از محتویات شکمبه شامل ذرات ریز (میکروب‌های متصل به بخش ذرات شکمبه)، بخش درون سلولی (سلول‌هایی که به‌صورت آزادانه در بخش مایع از مایع شکمبه معلق هستند) و بخش خارج سلولی (آنزیم‌های موجود در بخش مایع) اندازه‌گیری می‌شوند. در بین این سه بخش بیشترین فعالیت هیدرولایتیکی آنزیم‌ها مربوط به بخش میکروب‌های متصل به ذرات ریز، پس از آن آنزیم‌های درون سلولی و در نهایت آنزیم‌های خارج سلولی بود (آگاروال و همکاران۲۰۰۰، آگاروال ۲۰۰٤). اندوگلوکاناز (کربوکسی متیل سلولاز) توسط باکتری‌های سلولتیک اصلی شکمبه که تصور می‌شود تجزیه سلولز را آغاز می‌کنند، تولید می‌شود. این آنزیم‌ها در ابتدا با سلولهای باکتریایی مرتبط هستند (مک گیون و همکاران ۱۹۹۰). سیلوا و همکاران (۱۹۸۷) نیز گزارش کردند که کربوکسی متیل سلولاز می‌تواند به‌عنوان شاخص جمعیت کل کلونی شده روی ذرات خوراک استفاده شود و نیز می‌تواند برای ارزیابی تفاوت محیط شکمبه که بر تجزیه‌پذیری فیبر تأثیر می-گذارد به‌کار رود؛ بنابراین اندازه‌گیری فعالیت کربوکسی متیل سلولاز باکتری‌های چسبیده به ذرات خوراک در شکمبه احتمالاً روش مناسبی برای تخمین میزان تجمع نسبی باکتری‌های سلولتیک بر روی ذرات علوفه نیز محسوب می‌شود.
در مطالعه‌ای که توسط محرری و داس (۲۰۰۱) انجام شد، فعالیت آنزیم سلولاز در مایع شکمبه گروه شاهد ۷۳۸/۵ (میلی‌گرم گلوکز.mL^{-1}. h^{-1}) در بخش مایع شکمبه عاری از میکروب ۳۰ درصد بیش از فعالیت آن در مایع شکمبه عاری از پروتوزوآ بود. تیمار حاوی ایزواسید به‌عنوان یک فاکتور تحریکی مهم برای باکتری‌های سلولتیک مشخص و باعث افزایش ۳۸ درصدی فعالیت آن‌ها شد. همچنین مشاهده شد که حداکثر فعالیت سلولازی مربوط به جیره پروتئینی و کمترین فعالیت مربوط به تیمار اوره بود؛ بنابراین اعلام کردند که نیتروژن به‌تنهایی برای تحریک فعالیت سلولتیک در باکتری‌ها کافی نیست و این نوع از باکتری‌ها نیاز به نیتروژن در شکل پروتئینی دارند.
عزیزی و همکاران (۱۳۹۳) به‌منظور بررسی اثر افزودن منابع مختلف انرژی (شامل ذرت، جو و ملاس) به جیره حاوی کود مرغی فرآوری شده با حرارت (به‌عنوان مکمل نیتروژنی) بر فعالیت برخی آنزیم‌های هیدرولیتیک شکمبه شامل کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز در بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه (شامل بخش جامد، خارج سلولی و درون سلولی) از ۱۵ رأس گوسفند نر نژاد مغانی فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز در بخش‌های جامد، خارج سلولی، درون سلولی و کل (مجموع هر سه بخش) شیرابه گوسفندان تغذیه شده با جیره حاوی ملاس در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر بود. فعالیت آنزیم میکروکریستالین سلولاز در جیره‌های آزمایشی مشابه بود.

[1] -Exoenzymes
[2] Endoenzymes

اربابی (۱۳۹۲) نشان داد که فعالیت آنزیم‌های هضمی میکروارگانیسم‌های شکمبه تحت تأثیر مصرف نسبت-های مختلف کنسانتره به علوفه در جیره مورد سنجش قرار گرفت. یافته‌های این آزمایش را به‌طور خلاصه می‌توان این‌طور بیان نمود که افزایش نسبت کنسانتره در جیره میزان فعالیت آنزیم سلولاز، کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز را کاهش داد و این امر احتمالاً به‌دلیل افزایش میزان مواد سهل التخمیر در این جیره‌ها بوده است.

منافی‌راثی و همکاران (۱۳۹۳) تولید آنزیم‌های هضم کننده الیاف در شکمبه و روش‌های مختلف استخراج و تغلیظ آن‌ها از محتویات شکمبه دام‌های کشتارشده را مورد بررسی قرار دادند. میانگین فعالیت ویژه آنزیم-های سلولاز و زایلاناز به‌ترتیب ۷/۵ و ۱۶/۵ واحد به ازای هر میلی‌گرم پروتئین موجود در محلول بود.

آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز، درصنایع غذایی، مدیریت ضایعات کشاورزی و صنایع خوراک دام به‌کار می-روند. آنزیم‌های سلولاز، همی‌سلولاز و پکتیناز برای بهبود تغذیه‌ای علوفه‌ها استفاده می‌شود. به‌دلیل تنوع این آنزیم‌ها در محتویات شکمبه و قدرت آنزیمی آن‌ها، مورد توجه محققان قرار داشت (منافی راثی و همکاران ۱۳۹۳)، اما مطالعات کمی در خصوص آنزیم‌های موجود در محتویات شکمبه دام کشتار شده انجام گرفته است.

هدف از این مطالعه بررسی فعالیت آنزیم‌های سلولاز (میکروکریستالین سلولاز و کربوکسی متیل سلولاز) موجود در مایع شکمبه‌ای دام‌های کشتار شده در کشتارگاه و مقایسه آنها با گوسفندهای فیستول‌گذاری با استفاده از جیره‌های متفاوت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

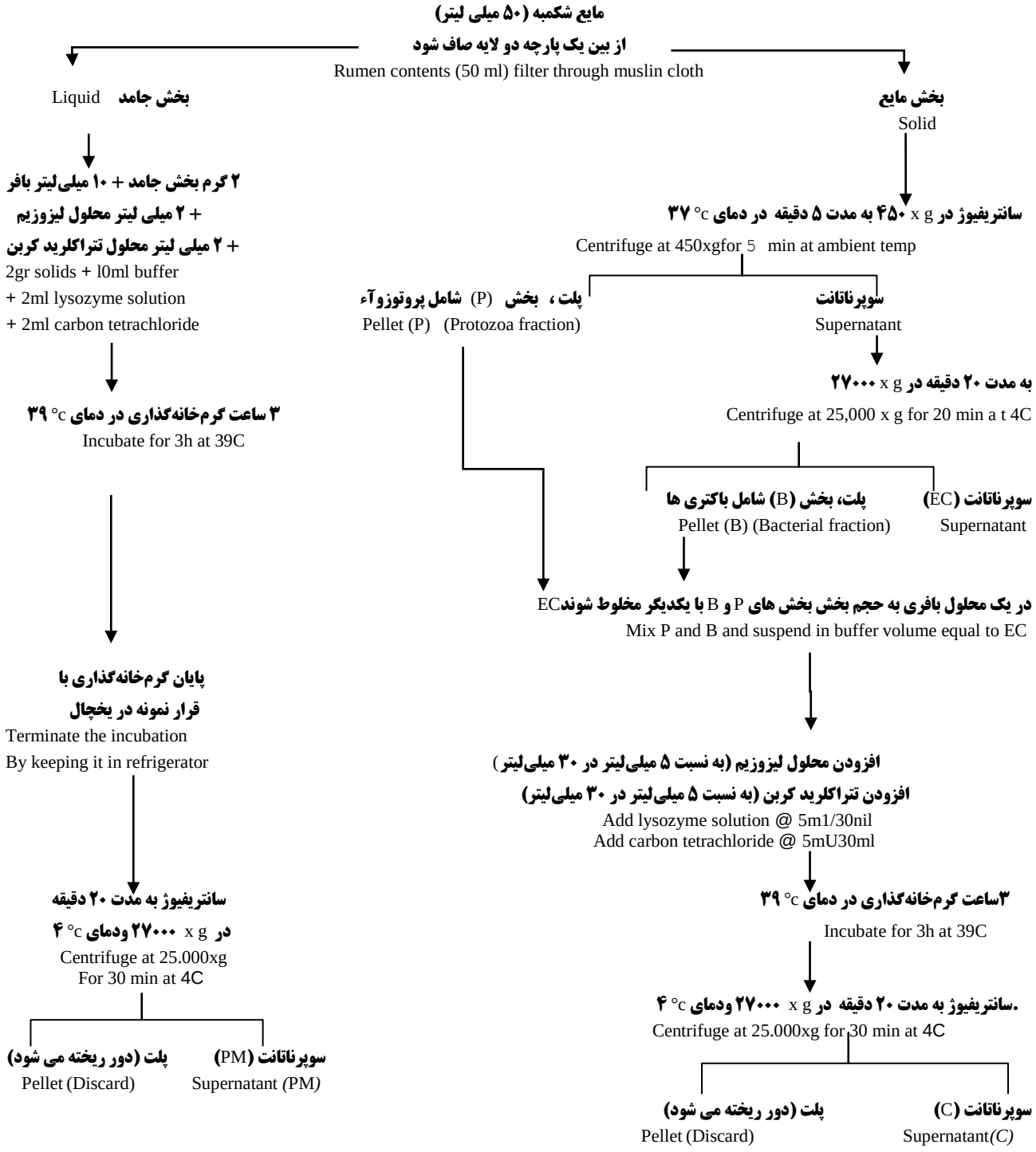
آنزیم‌های مورد بررسی در سه بخش مجزا از مایع شکمبه شامل آنزیم‌های درون سلولی (باکتری‌ها، قارچ‌ها و پروتوزوآ)، خارج سلولی (میکروب‌های شناور و آزاد در مایع شکمبه) و آنزیم‌های ترشح شده از میکروب‌های متصل به ذرات استخراج و فعالیت کل آن-ها اندازه‌گیری شد (آگاروال و همکاران ۲۰۰۰).

جمع‌آوری مایع شکمبه

به‌منظور تخمین فعالیت آنزیمی، نمونه‌های مایع شکمبه از چهار گروه گوسفند دالاق گرفته شد. گروه اول گوسفند زنده فیستول شده که با کاه و کنسانتره در سطح نگهداری تغذیه می‌شد. گروه دوم بره‌های پروار کشتار شده، تغذیه شده با کاه و کنسانتره، گروه سوم بره‌های پروار کشتار شده، تغذیه شده با کاه و کنسانتره و چرا از مرتع، گروه چهارم بره‌های پروار کشتار شده، تغذیه شده با یونجه و کنسانتره، نمونه نهایی برای تفکیک آنزیم‌های موجود در بخش‌های مایع شکمبه (شامل درون سلولی، خارج سلولی و مرتبط با ذرات) در یک فلاکس گرم فورا به آزمایشگاه منتقل گردید.

استخراج آنزیم‌ها

استخراج آنزیم‌ها از هر سه بخش مایع شکمبه با استفاده از تتراکلرید کربن، سونیکاسیون و آنزیم لیزوزیم (شرکت سیگما،CAS Number-3-88-12650) صورت گرفت. عمل لیزوزیم با سونیکاسیون در حمام یخ انجام شد (به‌مدت ٦ دقیقه، با سرعت ضربان یا پالس ۳۰ ضربه در ثانیه و فشار ۰/۵). نقش لیزوزیم تخریب دیواره سلولی میکروب‌ها و آزاد شدن آنزیم‌هاست، سونیکاسیون و تتراکلرید کربن نقش کمکی در این فرایند دارند. نکته قابل توجه این است که نمونه مایع شکمبه قبل از استفاده از لیزوزیم نباید فریز شده باشد زیرا باعث کاهش فعالیت آنزیمی می‌شود. طرح کلی استخراج آنزیم‌ها در شکل ۱ آورده شده است.



شکل۱-بخش‌بندی مایع شکمبه و استخراج آنزیم‌های هیدرولیتیک

Fig. 1- Fractionation of rumen contents and extraction of hydrolytic enzymes

در این طرح حروف بیانگر آنزیم‌های بخش سلولی (میکروب‌های معلق در مایع شکمبه)، EC: بخش خارج سلولی (مایع شکمبه)و PM: ذرات خوراک (میکروب‌های چسبیده به مواد خوراکی در شکمبه) می‌باشند.

فعالیت کربوکسی متیل سلولاز (اندو ۱و ۴ بتا گلوکوزیداز، EC 3.3.1.4)

معرف‌ها

۱) بافر فسفات ۰/۱ نرمال با pH= ٦/٨

۲) کربوکسی متیل سلولز ۱ درصد: برای تهیه آن کافی است ۱ گرم کربوکسی متیل سلولز (شرکت سیگما،CAS Number-32-4-9004) با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شود. محلول توسط همزن برقی (با مگنت) کامل همگن شده و در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۳) معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS): ۱۰ گرم از پلت سدیم هیدروکسید در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید. ۱۰ گرم DNS و ۲ گرم فنل به آن اضافه شده و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد. سدیم سولفیت ۰/۰۵ درصد نیز قبل از استفاده به آن افزوده گردید. یادآور می‌شود این محلول در شیشه‌های رنگی نگهداری شد و بدون افزودن سدیم سولفیت در دمای اتاق تا یک ماه قابل نگهداری و استفاده شد.

٤) محلول نمک راشل ٤٠ درصد: ٤٠ گرم نمک راشل (سدیم-پتاسیم تارتارات) با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

۵) محلول استاندارد ۰/۱ درصد گلوکز: ۱۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد.

روش‌کار

۱) لوله تست: ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات، ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول کربوکسی متیل سلولز در یک لوله آزمایشی ریخته و آن کامل مخلوط گردید. گرم‌خانه‌گذاری (Incubation) به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس با افزودن ۳ میلی‌لیتر معرف DNS واکنش متوقف شد. حمام آب جوش به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و بلافاصله بعد از خروج از حمام محلول نمک راشل اضافه شد.

(a) لوله شاهد: ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه در یک لوله به خوبی مخلوط گردد. ۳ میلی‌لیتر معرف DNS و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر محلول کربوکسی متیل سلولزاضافه شد (هدف از افزودن معرف DNS قبل از سوبسترا، جلوگیری از واکنش آنزیم‌های مایع شکمبه با سوبسترا است). حمام آب جوش به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و بلافاصله بعداز خروج از حمام محلول نمک راشل اضافه شد.

(b) لوله بلانک: ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳ میلی‌لیتر معرف DNS

(c) استاندارد: برای ترسیم منحنی استاندارد گلوکز، لوله‌هایی با دو تکرار طبق جدول زیر تهیه شد:

جدول۱- نحوه استاندارد سازی برای قرائت گلوکز

Table1-The standard method for glucose measurement

شماره لوله Number tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
آب مقطر (ml) Distilled water (ml)	2	1.75	1.50	1.25	1.0	0.75	0.50	0.25	0
محلول استاندارد گلوکز (ml) Glucose Standard solution (ml)	0	0.25	0.50	0.75	1.0	1.25	1.50	1.75	2
غلظت گلوکز (µg) Glucose (gµ)	0	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000
معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید*(DNS) (ml) Dinitro salicylic acid represents * (DNS) (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3	3

۲) لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شد.
۳) به هر لوله ۱ میلی‌لیتر محلول نمک راشل افزوده شد و لوله‌ها در دمای اتاق خنک شد.
٤) جذب نوری نمونه‌ها در مقابل بلانک در ٥٧٥ نانومتر قرائت شد. نمونه‌ها با آب مقطر تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر رقیق گردید،
٥) منحنی پیمایش (کالیبراسیون) استانداردهای گلوکز ترسیم شد.

محاسبات

اختلاف جذب نوری نمونه‌های مورد آزمایش از شاهد محاسبه شد:

تغییرات A= نمونه- شاهد

پس برای تعیین مقدار میکروگرم گلوکز آزاد شده طی گرم‌خانه‌گذاری، تغییرات A طبق منحنی غلظت گلوکز هر نمونه تعیین می‌گردد:

فعالیت آنزیم(نانومول گلوکز/میلی لیتر/دقیقه)=(نانوگرم گلوکز)/T×S×180

در T: زمان بن ماری (۱ ساعت)، S: مقدار نمونه (۰/٥ میلی‌لیتر) و ۱۸۰: وزن مولکولی گلوکز

شکل ۲-۲: بخش پلت و مایع شناور (آنزیم های استخراج شده)

فعالیت میکروکریستالین سلولاز (اگزو ۱و ۴ بتا گلوکوزیداز، EC 3.2.1.91)

میکروکریستالین سلولز همان آویسل است و وقتی‌که به عنوان سوبسترا قرار می‌گیرد فعالیت سه آنزیم اگزوگلوکاناز، اندوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز را نشان می‌دهد که در بین آن‌ها اگزوگلوکاناز بیشترین مقدار را شامل می‌شود. روش محاسبه آنزیم‌های تجزیه‌کننده آویسل بجز چند تفاوت زیر شبیه آنزیم کربوکسی متیل سلولاز است:

۱) آویسل ۱ درصد: ۱ گرم آویسل (شرکت آلدریچ،CAS Number 9004-34-6) در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار حل گردد و به‌منظور حل شدن کامل سوبسترا، این محلول حداکثر به‌مدت ٤٨ ساعت در یخچال و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.
۲) مخلوط مورد آزمایش: شامل ۱ میلی‌لیتر محلول آویسل (قبل از پیپت محلول کاملا هم زده شود) و ۱ میلی‌لیتر مایع شکمبه است.
۳) نمونه‌ها در دمای ۳۹ درجه به مدت ۱ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند (طی این مدت نمونه‌ها باید دائم به هم زده شد).
٤) فعالیت آنزیمی نمونه‌ها بر حسب نانومول در دقیقه در میلی‌لیتر قندهای آزاد شده (گلوکز) و به کمک منحنی استاندارد تعیین گردید.

برای استاندارد سازی گلوکز از معادله زیر استفاده شد.

$Y=2.6287X-0.009$

مقدار فعالیت آنزیم بر حسب میلی گرم=Y

اختلاف عدد تست و کنترل قرائت شده از =X اسپکتوفتومتر

$R^2=0.9917$

در قالب طرح کامل تصادفی و با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS تجزیه واریانس شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی از آزمون دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد. مقایسه تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد به کمک مقایسات مستقل (گروهی) انجام شد.

نتایج و بحث

فعالیت آنزیم‌های سلولاز

فعالیت آنزیم‌های میکروکریستالین سلولاز در مایع شکمبه گوسفند کشتار شده و فیستول‌گذاری شده (نانومول در دقیقه) مختلف شکمبه در جدول ۳ ارائه شده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در بخش وابسته به ذرات در گوسفند زنده فیستول شده مشاهده گردید. همچنین طبق جدول۲ بیشترین فعالیت کل

آنزیمهای میکروکریستالین سلولاز در شکمبه گوسفند فیستول‌گذاری شده (نانومول در دقیقه) مشاهده شد. مشخص شده است که تعداد بیشتر میکروب‌های وابسته به بخش وابسته به ذرات سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک شده و عمدتاً در هضم فیبر دخیل هستند (راگوانسی و همکاران ۲۰۰۷). میرمحمدی (۱۳۹۲) میزان کل فعالیت آنزیم میکروکریستالین سلولاز دام تغذیه شده با کود مرغی در گستره ۱۴۳-۱۶۳، وابسته به ذرات ۳۹-۶۰، خارج سلولی ۴۲-۵۵، داخل سلولی ۶۱-۹۴ (نانومول در دقیقه) گزارش نمود. گستره میزان فعالیت کل به‌دست آمده از آنزیم‌های مورد بررسی در این آزمایش بیشتر و متفاوت با میزان فعالیت آنزیم‌های میکروکریستالین سلولاز گزارش شده توسط میرمحمدی (۱۳۹۲) می‌باشد. این تفاوت و گستره بخاطر خوراک متفاوت با خوراک استفاده شده در طبق تحقیق میرمحمدی (۱۳۹۲) در این آزمایش نیز بین دامهای کشتار شده اختلاف جیره و محل نگهداری و مدیریت متفاوت و در دام زنده و کشتار شده وجود داشت. و در برههای پرواری است که فعالیت کل در آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، آلفا آمیلاز و فعالیت تجزیه کاغذ صافی را به ترتیب در دامنه ۵۲۴-۲۸۲، ۲۰۳-۱۴۳، ۱۶۰۲-۱۲۴۲ و ۳۲۴-۲۱۹ نانومول گلوکز آزاد شده در هر دقیقه گزارش نمودند. همان‌گونه که ملاحظه شد، میزان فعالیت آنزیم‌های میکروبی در بخش وابسته به ذرات شیرابه شکمبه در مورد همه آنزیم‌های بررسی شده به مراتب بیشتر از دو بخش دیگر یعنی بخش خارج سلولی و بخش درون سلولی بود. وجود حداکثر فعالیت آنزیمی در بخش وابسته به ذرات شیرابه شکمبه نشان دهنده کلونیزه شدن ذرات خوراک توسط میکروب‌هاست. میزان فعالیت آنزیمی کمتر در بخش سلولی شیرابه بدین سبب است که میکروب‌های سلولولایتیک به ذرات خوراکی متصل شده‌اند، و جمعیت میکروب‌های آزاد در بخش مایع بسیار کمتر است (آگاروال و همکاران ۲۰۰۰؛ راگوانسی و همکاران ۲۰۰۷). حداقل غلظت آنزیم‌های تجزیه کننده الیاف در بخش خارج سلولی شیرابه شکمبه قابل انتظار بود، زیرا این آنزیم‌ها به پوشش سلولی متصلند و تنها مقدار کمی از آنها به‌دلیل تخریب یا تجزیه مکانیکی میکروب‌های تجزیه کننده الیاف به بخش مایع سلولی آزاد می‌شود (آگاروال و همکاران ۲۰۰۰). که این حداقل غلظت آنزیم‌های تجزیه کننده الیاف در بخش خارج سلولی شیرابه شکمبه مطابق با میرمحمدی (۱۳۹۲) بود. اختلاف معنی‌داری بین دام زنده فیستول شده و حیوانات کشتارگاهی مشاهده شد. شاید بتوان این را به دو موضوع ربط داد اول تغذیه حیوان زنده فیستول شده در سطح نگهداری بوده و از کاه بیشتری استفاده شده است در صورتیکه حیوانات کشتارشده از جیره پرواری و کنسانتره استفاده کردند که کاه بیشتر باعث افزایش آنزیم‌های میکروکریستال سلولاز خواهد شد و دوم بنظر می‌رسد فعالیت آنزیم در حیوان بیشتر می‌باشد.

منافی راثی و همکاران (۱۳۹۳) میانگین فعالیت ویژه آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز در نمونه‌های گرفته شده از دام‌های کشتار شده را به‌ترتیب ۷/۵ و ۱۶ واحد به ازای هر میلی‌گرم پروتئین و فعالیت این آنزیم‌ها به‌ترتیب ۰/۵۷۳ و ۱/۰۲۵ واحد بر لیتر گزارش کردند. و در این آزمایش با بررسی نمونه‌های متعدد به‌دست آمده از کشتارگاه نشان دادند که نسبت آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز در محتویات شکمبه تقریبا ثابت است. بررسی میزان این دو آنزیم در نمونه‌های مورد بررسی همبستگی بالایی را نشان داد (۹۷/۸). این همبستگی نشان دهنده آن است که تقزیبا میزان فعالیت زایلاناز دو برابر حدود ۱/۸ برابر میزان فعالیت سلولاز است (منافی راثی و همکاران۱۳۹۳).

میزان فعالیت میکروکریستالین سلولاز در بخش جامد، خارج سلولی، درون سلولی و کل شیرابه شکمبه نسبت به بخش‌های مربوطه در آنزیم کربوکسی متیل سلولاز بیشتر بود. که مخالف نتایج میرمحمدی (۱۳۹۲)

می‌باشد. آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز بر روی بخش میانی زنجیر سلولز اثر نموده و از طریق هیدرولیز آنرا پاره می‌نماید و تولید دو زنجیر کوتاهتر می‌کند. اما میکروکریستالین سلولاز به قسمت انتهایی آزاد زنجیره حمله نموده و طی مراحل متوالی سلوبیوز را تولید می‌نماید (دانش‌مسگران و همکاران ۱۳۸۷). بنابراین، افزایش فعالیت کربوکسی متیل سلولاز نسبت به میکروکریستالین سلولاز احتمالاً به‌خاطر وجود سوبسترای بیشتر برای آن باشد و مطابق با یافته‌های سایر محققین است (راگوانسی و همکاران ۲۰۰۷). کربوکسی متیل سلولاز در تجزیه سلولزهای بی‌نظم و میکروکریستالین سلولاز در تجزیه سلولزهای بانظم درگیر است (راقووانسی و همکاران ۲۰۰۷ و اربابی ۱۳۹۲). در نتایج اربابی (۱۳۹۲) به‌دنبال افزایش مقدار مواد متراکم در جیره کاهش معنی‌داری در فعالیت کل آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز و فعالیت کاغذ صافی مشاهده شد.

فعالیت آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز در مایع شکمبه گوسفند کشتار شده و فیستول‌گذاری شده (نانومول در دقیقه) مختلف شکمبه در جدول ۳ ارائه شده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در بخش خارج سلولی و در گوسفند کشتار شده که با کاه، کنسانتره و چرا تغذیه می‌شد، مشاهده گردید.

جدول۲- فعالیت آنزیم‌های میکروکریستالین سلولاز(نانومول در دقیقه) در مایع شکمبه گوسفند کشتار شده و فیستول‌گذاری شده

Table 2- Microcrystalline cellulose enzyme activity (nmol min) in rumen fluid of fistulated and slaughtered sheep

Animal حیوان	Feed خوراک	وابسته به ذرات Particulate material	خارج سلولی Extra-cellular fraction	داخل سلولی Cellular fraction	کل فعالیت Total
گروه ۱(فیستول شده) Group 1 (fistulated)	کاه + کنسانتره (نگهداری) Straw + concentrate (maintenance)	267.59^{a}	84.98^{b}	183.67^{a}	536.23^{a}
گروه ۲ (کشتارشده) Group 2 (slaughtered)	کاه+ کنسانتره (پروار) Straw + concentrate (fattening)	155.89^{ab}	172.05^{a}	165.90^{a}	493.84^{a}
گروه ۳ (کشتارشده) Group 3 (slaughtered)	کاه + کنسانتره+ چرا Straw + concentrate + grazing	135.98^{ab}	108.42^{b}	248.31^{a}	492.72^{a}
گروه ٤ (کشتارشده) Group 4 (slaughtered)	یونجه+ کنسانتره(پروار) Hay + concentrate (fattening)	55.71^{c}	90.49^{b}	164.88^{a}	311.08^{b}
SEM		43.92	18.80	27.30	53.96
1		0.016	0.009	0.122	0.028
2		0.005	0.008	0.768	0.106

میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵)

احتمال اثرات تیمار(۱) و مقایسات گروهی(۲) بین حیوان زنده و حیوانات کشتارشده

Within a column, means without a common letters (a,b and c) differ (P<0.05).

Probability for the treatment effect (1) and contrast between live and slaughtered animals (2).

میزان فعالیت کل آنزیم میکروکریستالین سلولاز و کربوکسی متیل سلولاز در حیوان کشتار شده که با یونجه و کنسانتره (پروار) تغذیه شده، کمترین بود. آگاروال و همکاران (۲۰۰۰) پیشنهاد کردند که برای برآورد فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده فیبر به‌جای تنها مایع صاف شده شکمبه باید کل محتوای شکمبه مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعات جووانی و همکاران (۱۹۹۸) پیشنهاد گردید که احتمالا در جیره‌های پر کنسانتره وجود مقادیر زیاد کربوهیدرات‌های محلول در مایع شکمبه مانع چسبیدن باکتری‌های سلولتیک به ذرات خوراک می‌شود و از سویی جوانه زدن زئوسپورهای قارچ های بی‌هوازی شکمبه روی بافت به تاخیر می‌افتد. به‌نظر می‌رسد این خود می‌تواند یکی از دلایل کاهش فعالیت آنزیم سلولاز در جیره‌های حاوی مواد متراکم بالاتر باشد (اربابی ۱۳۹۲). تغییرات میکروبی شکمبه و الگوی آنزیمی با تغییر نسبت علوفه به کنسانتره در جیره توسط آگاروال و همکاران (۲۰۰٤) گزارش شده است. این محققین گزارش کردند که میزان فعالیت کربوکسی متیل سلولاز و زایلاناز با افزایش میزان علوفه در جیره افزایش می‌یابد. دلیل این مطلب در این بخش بحث شود.

در پژوهش اربابی (۱۳۹۲) گستره فعالیت کل آنزیم میکروکریستالین سلولاز از ۲٦/٤۸-۵۹/۱٤ و کربوکسی متیل سلولاز از ۳۲۳-٥٤۹ در سطوح مختلف کنسانتره به علوفه مشاهده شد.

جدول۳- فعالیت آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز(نانومول در دقیقه) در مایع شکمبه گوسفند کشتار شده و فیستول‌گذاری شده

Table 3- Carboxymethylcellulase enzyme activity (nmol min) in rumen fluid of fistulated and slaughtered sheep

Animal حیوان	Feed خوراک	وابسته به ذرات Particulate material	خارج سلولی Extra-cellular fraction	داخل سلولی Cellular fraction	کل فعالیت Total
گروه ۱(فیستول شده) Group 1 (fistulated)	کاه + کنسانتره (نگهداری) Straw + concentrate (maintenance)	59.23^{a}	76.87^{b}	79.89^{b}	215.97^{b}
گروه ۲ (کشتارشده) Group 2 (slaughtered)	کاه+ کنسانتره (پروار) Straw + concentrate (fattening)	58.96^{a}	105.04^{ab}	48.80^{b}	212.82^{b}
گروه ۳ (کشتارشده) Group 3 (slaughtered)	کاه + کنسانتره+ چرا Straw + concentrate + grazing	58.07^{a}	137.21^{a}	244.25^{a}	439.52^{a}
گروه ٤ (کشتارشده) Group 4 (slaughtered)	یونجه+ کنسانتره(پروار) Hay + concentrate (fattening)	17.38^{b}	56.50^{b}	111.72^{b}	185.63^{b}
SEM		11.07	19.70	33.09	52.33
1		0.027	0.038	0.001	0.005
2		0.267	0.324	0.159	0.323

میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵)

احتمال اثرات تیمار(۱) و مقایسات گروهی(۲) بین حیوان زنده و حیوانات کشتارشده

Within a column, means without a common letters (a,b and c) differ (P<0.05).
Probability for the treatment effect (1) and contrast between live and slaughtered animals (2).

pH مایع شکمبه

pH مایع شکمبه گوسفند کشتار شده و فیستول‌گذاری شده در جدول٤ ارائه شده است. pH مایع شکمبه گوسفند کشتار شده که با کاه و کنسانتره (پروار) کمتر از گروه‌های دیگر بود. اربابی (۱۳۹۲) نشان داد با افزایش نسبت کنسانتره از ۲۵ به ۵۰ درصد سبب

کاهش pH شد (P<۰/۰۵). زمانی‌که نشخوارکنندگان با مقادیر بیش از حد کربوهیدرات‌های سریع التخمیر (غیرفیبری) تغذیه شوند، pH شکمبه به سطوح پایین‌تر از مقادیر فیزیولوژیکی افت می‌کند (کراتس و اوتزل ۲۰۰۶). منافی‌راثی و همکاران (۱۳۹۳) pH نمونه‌های کشتارشده از کشتارگاه بین شش و هشت گزارش کرد. به‌طورکلی نشخوارکنندگان قادرند pH شکمبه را با تنظیم مقدار خوراک مصرفی، تولید بافر از طریق بزاق، تطابق‌پذیری میکروارگانیسم‌ها و جذب اسیدهای چرب فرار در محدودهٔ فیزیولوژیکی تنظیم نمایند. با وجود این چنانچه مقدار کربوهیدرات قابل تخمیر مصرفی، باعث تولید مقدار اسید بیشتر از آنچه در داخل شکمبه متابولیسم می‌گردد، شود، تنظیم pH شکمبه با شکست مواجه شده وکاهش شدیدی درمیزان pH مشاهده خواهد شد (کراتس و اوتزل ۲۰۰۶).

کاهش pH اثر نامطلوبی بر باکتری‌های سلولتیک می‌گذارد. به‌طورکلی حیوانات نشخوارکننده نیازمند باکتری‌های سلولتیک جهت هضم فیبر می‌باشند، اما در pHپایین، رشد آن‌ها بر روی سلوبیوز محدود می‌شود. بیشتر تحقیقاتی که تاکنون در مورد اسیدوز انجام شده است، بر فاکتورهای جیره‌ای شامل توزیع اندازه ذرات جیره، قابلیت تخمیر جیره و عوامل میکروبی تاکید داشتند (ناگاراجا و تیت جمییر ۲۰۰۷ وانمارک ۲۰۰۸). آلن (۱۹۹۷) تخمین زد که تقریباً ۵۳ درصد پروتون‌های تولیدی در طی تخمیر بی‌هوازی در زمان جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه منتقل می‌شوند که نشان می‌دهد متابولیسم جذب احتمالاً اثر شدیدی بر تنظیم pH شکمبه دارد.

جدول۴- pH در مایع شکمبه گوسفند کشتار شده و فیستول‌گذاری شده

Table 4- Ruminal pH of slaughtered and fistulated sheep

Animal حیوان	Feed خوراک	pH
گروه ۱(فیستول شده) Group 1 (fistulated)	کاه + کنسانتره (نگهداری) Straw + concentrate (maintenance)	6.36±0.13[a]
گروه ۲ (کشتارشده) Group 2 (slaughtered)	کاه+ کنسانتره (پروار) Straw + concentrate (fattening)	5.61±0.12[b]
گروه ۳ (کشتارشده) Group 3 (slaughtered)	کاه + کنسانتره+ چرا Straw + concentrate + grazing	6.37±0.19[a]
گروه ٤ (کشتارشده) Group 4 (slaughtered)	یونجه+ کنسانتره(پروار) Hay + concentrate (fattening)	6.38±0.06[a]

میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵)

Means within same column with different letters differ significantly (P<0.05).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج آزمایش نشان داد که دام‌های کشتار شده که یونجه و کنسانتره مصرف می‌کردند، کل فعالیت آنزیم میکروکریستالین سلولاز و کربوکسی متیل سلولاز کمترین مقدار را دارا بودند و نشان دهنده این است که وجود کاه در جیره باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها خواهد شد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جهت تامین اعتبارات مالی بینهایت تشکر و سپاسگزاری به‌عمل می‌آید. از جناب آقای مهندس داوود میرمحمدی جهت کمک در اندازه‌گیری آنزیم قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

اربابی س،۱۳۹۲. تاثیر نسبت های علوفه به کنسانتره بر پایه دانه باقلا بر تخمیر، فعالیت آنزیم سلولاز و جمعیت باکتریایی شکمبه گوسفند. رساله دکتری تغذیه دام دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان.۲٤۱ صفحه.

دانش مسگران م، طهماسبی ع و.وکیلی س ع، ۱۳۸۷. هضم و سوخت‌ساز در نشخوارکنندگان. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ص: ۲٦۱.

عزیزی ا، میرمحمدی د، رضائی ج، کیانی ع و.فضائلی ح،۱۳۹۳.اثر منبع انرژی بر فعالیت برخی آنزیم‌های هیدرولیتیک بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه و ابقای نیتروژن در گوسفند تغذیه شده با جیره حاوی کود مرغی فرآوری شده . مجله پژوهش در نشخوارکنندگان،شماره دوم، صفحه‌های ۱-۱٦.

منافی راثیح، چمنی م و افشار س،۱۳۹۳. مقایسه روش های استخراج، تغلیظ و نگهداری آنزیم‌های هضم کننده الیاف گیاهی از محتویات شکمبه گوسفند. تولیدات دامی، شماره دوم، صفحه‌های ۱٦۷-۱۷۸.

میرمحمدی د،۱۳۹۲. بررسی اثر شکل فیزیکی خوراک در جیره های با و بدون کود بستر جوجه های گوشتی بر عملکرد برههای پروار. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس.۱۲۰ صفحه.

Agarwal N, 2000. Estimation of FibreDegrading Enzyme. In Feed Microbiology ed. Chaudhary LC, Agarwal N, Kamra DN, Agarwal DK. pp. 283–290. Izatnagar, India: CAS Animal Nutrition, IVRI.

Agarwal N, Agarwa I, Kamra DN and Chaudhary LC, 2000. Diurnal variations in the activities of hydrolytic enzymes in different fractions of rumen contents of Murrah buffalo. Journal of Applied Animal Research 18:73-80.

Allen MS, 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. Journal of Dairy Science 80:1447–1462.

Dehority BA, 1998. Microbial interaction in the rumen. Revista de la Faculted de Agronomia. LUZ. 15:69–86.

Enemark JMD, 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis. A rev. The Veterinary Journal 176:32– 43.

Krause M and KandOtzel GR, 2006. Understanding and preventing subacuteruminal acidosis in dairy herds: A review. Animal Feed Science and Technology 126: 215-236.

Jouany JP, Michalet-Doreau B, and Doreau M, 1998. Manipulationof the rumen ecosystem to support high-performance beef cattle. In: J. K. Ha and K. K. Paik (ed.) Symposium Series 2.Proc. 8th World Conf. on Anim. Prod. Shinkwang Publishingand Printing Co., Seoul, Korea. Pp109–130.

McAllister TA, Hristov AN, Beauchemin KA, Rode LM and Cheng KJ, 2001. Enzymes in ruminant diets, in: Bedford MR., Partridge GG (Eds.), Enzymes in Farm Animal Nutrition, CABI Publishing. pp. 273–278.

McGavin M, Lam J and Forsberg CW, 1990. Regulation and distribution of *Fibrobacter succinogenes* sub sp. *Succinogenes* S85 *endoglucanases*. Applied and Environmental Microbiology 56:1235.

Moharrery A and Das TK, 2001. Correlation between microbial enzyme activities in the rumen fluid of sheep under different treatments. Reproduction Nutrition Development 41, 513-529.

Nagaraja TG, and Titgemeyer EC, 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. Journal of Dairy Science 90:17–38.

Pathak NN, Kamra DN and Jakhmola RC, 1996. Analytical Techniques in Animal Nutrition Research,International Book Distributing Co., India. p. 201.

Raghuvansi SKS, Prasad R, Mishra AS, Chaturvedi OH, Tripathi MK, Misra AK, Saraswat BL and Jakhmola RC, 2007. Effect of inclusion of tree leaves in feed on nutrient utilization and rumen fermentation in sheep. Bioresource Technology 98: 511-517.

Silva AT, Wallace RJ and Orskov ER, 1987. Use of particle-bound microbial activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. British Journal of Nutrition 57:407-415.

Comparison of activity of carboxymethyl-cellulase and microcrystalline-cellulase in rumen fluid of fistulated male and slaughtered fattening lambs with different ration

F Dousti[1] and T Ghoorchi[*2]

Received: June 09, 2015 Accepted: May 05, 2016

[1]PhD Student, Department of Animal and Poultry Nutrition, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Professor, Department of Animal and Poultry Nutrition, Faculty of Animal Science, Gorgan University of Agricultural and Natural Resources, Gorgan, Iran
[*]Corresponding author: Email ghoorchi@gau.ac.ir

Abstract

BACKGRUOND: Ruminal microbes through their enzymes play roles in digestive processes. **OBJECTIVE:** This research was sampled to investigate the activity of carboxymethyl-cellulase and microcrystalline-cellulase (Nonomol/min) ruminal hydrolytic enzymes from different fractions of particulate material, extra cellular or cellular. **METHODS:** Twelve fistulated male sheep and slaughtered lambs were used in four group and three replicates. The experimental diets included group1: Fistulated sheep on concentrate and straw (maintance), group2: Fattening of slaughtered lambs on concentrate and straw, group3: Fattening of slaughtered lambs on concentrate, straw and grazing and group4: Fattening of slaughtered lambs on concentrate and alfalfa. **RESULTS:** Results showed that for microcrystalline-cellulasein particulate material and total (sum of all of three fractions) were higher in fistulated sheep compared with other groups. Moreover, microcrystalline-cellulaseinparticulate material, cellular, extra celluar and total activity was higher than carboxymethyl-cellulase. Total activity of microcrystalline-cellulase and carboxymethyl-cellulasewas the lowest in fattening of slaughtered lambs on concentrate and alfalfa. Reducing ruminal pH in slaughtered fattening lambs fed with concentrate and straw was seen. **CONCLUSIONS:** Overall, results of this study showed that microcrystalline-cellulaseactivities in fistulated lambs was higher than other groups, but containing diet with concentrate, straw, garzing increased the carboxymethyl-cellulaseactivity of rumen hydrolytic enzymes in slaughtered fattening lambs.

Keywords: Rumen, Carboxymethyl-cellulase, Microcrystalline-cellulase, Enzymes; Slaughtered Lambs, Fistulated sheep