



تولیات دامی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳

صفحه‌های ۱۷۸-۱۶۷

مقایسه روش‌های استخراج، تغلیظ و نگهداری آنزیم‌های هضم‌کننده الیاف گیاهی از محتویات شکمبه گوسفند

حسین منافی رایی^{۱*}، محمد چمنی^۲، سلمان افشار^۳

۱. استادیار گروه علوم دامی، مؤسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، تهران، ایران
۲. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳. کارشناس، گروه علوم دامی، مؤسسه آموزش عالی علمی- کاربردی جهاد کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۸/۰۹

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۳۱

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تولید آنزیم‌های هضم‌کننده الیاف در شکمبه و روش‌های مختلف استخراج و تغلیظ آن‌ها از محتویات شکمبه دام‌های کشتار شده انجام شد. به همین منظور، از دو روش هوموژن‌سازی و سونیکیشن برای آزادسازی آنزیم‌های متصل به مواد جامد محتویات شکمبه و از روش‌های رسوب دادن پروتئین‌ها با اتانل، تری‌کلرو استیک اسید و سولفات آمونیم، همچنین خشک کردن با برودت به منظور تغلیظ آنزیم‌های هضم‌کننده الیاف استفاده شد. به منظور بررسی اثر دما و مدت زمان نگهداری بر فعالیت آنزیم‌ها از روش‌های نگهداری در نیتروژن مایع، فریزر ۷۰- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده شد. میانگین فعالیت ویژه آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز به ترتیب ۷/۵ و ۱۶/۵ واحد به ازای هر میلی‌گرم پروتئین موجود در محلول بود. میزان آزادسازی و استخراج آنزیم از محتویات شکمبه در روش هوموژن‌سازی بیشتر از روش سونیکیشن بود. فعالیت و بازیافت آنزیم‌ها در روش‌های تغلیظ با برودت و رسوب دادن با سولفات آمونیم بیشتر بود. روش نیتروژن مایع برای نگهداری طولانی‌مدت و روش فریزر ۷۰- برای نگهداری میان‌مدت مناسب‌تر بود. نتایج این تحقیق نشان داد که محتویات شکمبه دام‌های کشتار شده منبع مناسبی از آنزیم‌های هضم‌کننده الیاف گیاهی است و می‌توان با به‌کارگیری روش‌های استخراج و تغلیظ مناسب از آن‌ها استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: استخراج، تغلیظ، زایلاناز، سلولاز، محتویات شکمبه.

مقدمه

شیرابه شکمبه نشخوارکنندگان حاوی آنزیم‌های هضم‌کننده الیاف گیاهی متنوعی است که میکروارگانسیم‌های موجود در آن تولید می‌کنند. آنزیم‌های هضم‌کننده الیاف گیاهی سلولاز و همی سلولاز که توسط دامنه وسیعی از باکتری‌ها و قارچ‌ها شامل هوازی، بی‌هوازی، مزوفیل، ترموفیل و اکستروفیل تولید می‌شوند اهمیت بیشتری دارند. قارچ‌ها و باکتری‌های هوازی به‌طور معمول آنزیم‌های سلولاز و همی سلولاز برون سلولی تولید می‌کنند، درحالی‌که باکتری‌های بی‌هوازی سلولازها را به شکل ترکیب پیچیده چندآنزیمی به هم پیوسته تولید می‌کنند (۶، ۷، ۳۸).

برای نخستین بار در سال ۱۹۸۳ ساختارهایی به نام سلولوزوم در باکتری‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی گیاهی شناسایی شد (۲۴). تحقیقات نشان داد آنزیم‌های تجزیه‌کننده این باکتری‌ها در ساختار سلولوزوم به یک بخش غیرکاتالیتیکی به نام اسکافولدین متصل است. اسکافولدین آنزیم‌های مختلف را مانند داربستی در کنار یکدیگر نگه می‌دارد و تجزیه سریع‌تر ترکیبات حاوی سلولز را میسر می‌سازد. همچنین، باکتری‌ها توسط این ساختارها خود را به الیاف گیاهی متصل می‌کنند (۱۴، ۲۰). این خصوصیت باعث می‌شود که بخشی از آنزیم‌های هضم‌کننده الیاف با فرایندهایی نظیر هوموژن سازی و سونیکیشن به مایع حاوی میکروارگانسیم‌ها آزاد شوند (۳). استحصال آنزیم‌های میکروبی از شیرابه شکمبه، نخستین بار در سال ۱۹۵۴ گزارش شد (۲۲). عصاره‌ای از محتویات شکمبه جدا شد که دارای خصوصیات آنزیم‌های هضم‌کننده الیاف بود (۱۴، ۱۵). شکمبه منبع منحصر به فردی برای آنزیم‌های مؤثر در تولید دام‌هاست (۳۱) و ضایعات شکمبه‌ای دام‌ها پس از کشتار منبع خوبی برای تهیه برخی مواد شیمیایی صنعتی، به‌ویژه آنزیم‌های سلولاز و آلفاآمیلاز است (۲۳).

سلولازها و زایلانازها در صنایع نساجی، صنایع تولید کاغذ و شوینده‌ها، صنایع غذایی، مدیریت ضایعات کشاورزی و صنایع خوراک دام به کار می‌روند. آنزیم‌های سلولاز، همی سلولاز و پکتیناز برای بهبود کیفیت تغذیه‌ای علوفه‌ها به کار می‌روند. بهبود قابلیت هضم خوراک و عملکرد حیوان با کاربرد آنزیم سلولاز به منظور فرآوری خوراک گزارش شده است (۵). به منظور جدا کردن آنزیم‌های متصل به اجزای الیافی شکمبه یا محیط فرمانتور از روش‌هایی نظیر هوموژن سازی، سونیکیشن و کاربرد مواد شیمیایی استفاده می‌شود. روش‌های مکانیکی برای این منظور بیش از سایر روش‌ها مطالعه شده و از نظر اقتصادی بهترین گزینه معرفی شده است (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۲۵).

به دلیل تنوع این آنزیم‌ها در محتوای شکمبه، همچنین قدرت آنزیمی مناسب آن‌ها، این منبع آنزیمی از قبل مورد توجه محققان قرار داشت، اما تاکنون تحقیقات کمی در زمینه بررسی روش‌های استخراج، تغلیظ و نگهداری این آنزیم‌ها صورت گرفته است (۲۳، ۳۱). هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی روش‌های استخراج، تغلیظ و نگهداری آنزیم‌های موجود در محتوای شکمبه دام‌های کشتار شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها از کشتارگاه‌های صنعتی گوشت اطراف تهران در سال ۱۳۹۰ تهیه شد. برای این منظور، در هر نوبت ۵۰۰ گرم از مخلوط محتویات شش رأس گوسفند تازه ذبح شده در ظروف دردار جمع‌آوری و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. برای جداسازی بخش جامد بقایای خوراک از مایع شکمبه، ابتدا محتویات از چند لایه پارچه نظیف عبور داده شد. سپس، به مدت پانزده دقیقه سانتریفیوژ (g × ۱۰۰۰۰) شد. مایع بالایی جدا شده (حاوی آنزیم‌های میکروبی) به منظور جدا کردن ناخالصی‌های احتمالی از کاغذ صافی

تولیدات دامی

حاوی آنزیم با مقدار معینی سولفات آمونیم برای به‌دست آوردن محلولی با درجهٔ اشباع ۹۰ درصد مخلوط شد. سپس، به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجهٔ سیلسیوس قرار گرفت. برای جداکردن رسوب از مایع بالایی در تمام روش‌ها، از سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه (۴۰۰۰ g) استفاده شد. برای محلول کردن رسوب به‌دست آمده از بافر سیترات فسفات ۰/۰۲ مولار با pH=۶/۵ استفاده شد. محلول به‌دست آمده برای تعیین میزان پروتئین و فعالیت آنزیمی استفاده شد. به منظور خارج ساختن نمک سولفات آمونیم وارد شده به محلول حاوی آنزیم‌ها از روش دیالیز با کیسهٔ سلولزی (حداکثر وزن مولکولی پروتئین‌های خروجی از منافذ ۱۲ کیلودالتون) استفاده شد (۲۶).

در روش تغلیظ با برودت در خلأ از دستگاه فریز درایر استفاده شد. نمونهٔ حاوی آنزیم به مدت دوازده ساعت در دستگاه قرار گرفت و پس از اطمینان از خشک شدن، با مقدار کمی از بافر سیترات فسفات ۰/۰۲ مولار با pH=۶/۵ مخلوط شد. محلول به‌دست آمده برای تعیین میزان پروتئین و فعالیت آنزیمی استفاده شد. در روش تغلیظ با گاز نیتروژن نمونهٔ حاوی آنزیم به منظور افزایش غلظت در معرض گاز نیتروژن قرار گرفت و پس از کاهش حجم مایع حاوی آنزیم (در اثر تبخیر) به میزان مطلوب، فعالیت آنزیمی و محتوای پروتئین آن سنجش شد.

به منظور خالص‌سازی اولیهٔ آنزیم‌ها با روش مرحله‌ای رسوب دادن با سولفات آمونیم، نمونهٔ حاوی آنزیم ابتدا با مقدار معینی نمک سولفات آمونیم به میزان ۲۰ درصد اشباع شد (۱۱۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر محلول حاوی آنزیم). نمونهٔ اشباع‌شده به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجهٔ سیلسیوس نگهداری و برای جداکردن رسوب از مایع رویی، به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ (g × ۴۰۰۰) شد. برای محلول کردن رسوب به‌دست آمده از بافر سیترات فسفات ۰/۰۲ مولار با pH معادل ۶/۵ استفاده شد.

واتمن شمارهٔ چهار عبور داده شد. pH نمونه‌ها در هر مرحله اندازه‌گیری شد. مایع صاف‌شده جهت استفادهٔ بعدی در فریزر ۷۰- درجهٔ سیلسیوس قرار گرفت.

به منظور آزادسازی آنزیم‌های متصل به ذرات مواد خوراکی موجود در شکمبه از روش‌های هوموژن‌سازی و سونیکیشن استفاده شد. به همین منظور، مقدار ۴۰ گرم مواد جامد مرطوب محتوای شکمبه با مقدار ۶۰ میلی‌لیتر مایع محتوای شکمبه با دستگاه مخلوط‌کن به مدت ۱، ۱/۵ و ۲ دقیقه مخلوط و پس از جداسازی مواد جامد از مایع به روش فوق، پروتئین و فعالیت آنزیمی مایع صاف شده، با استفاده از روش سنجش میزان کل پروتئین محلول (برادفورد) با مایع شکمبه مقایسه شد. در روش سونیکیشن، مقدار ۴۰ گرم مواد جامد مرطوب محتوای شکمبه با مقدار ۶۰ میلی‌لیتر مایع محتوای شکمبه در چهار دورهٔ زمانی ۳۰ ثانیه‌ای و با فاصلهٔ زمانی ۳۰ ثانیه، در حمام اولتراسونیک (wisclean با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز) قرار گرفت. مایع صاف شده از نمونه‌ها برای میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیمی با نمونهٔ شاهد و نمونهٔ به‌دست آمده از آزمایش هوموژن‌سازی مقایسه شد (۲۹).

به منظور تغلیظ آنزیم‌های موجود در محتوای شکمبه از روش‌های رسوب دادن با اتانل، تری‌کلرو استیک اسید، سولفات آمونیم و تغلیظ با برودت در خلأ و گاز نیتروژن به شرح زیر استفاده شد. در روش رسوب دادن با اتانل، نمونهٔ حاوی آنزیم با نه برابر حجم خود از اتانلی که قبلاً در دمای ۷۰- درجهٔ سیلسیوس سرد شده، به تدریج مخلوط شد و به مدت دو ساعت در فریزر ۷۰- درجهٔ سیلسیوس قرار گرفت. به منظور رسوب دادن آنزیم‌ها با تری‌کلرو استیک اسید (TCA) نمونهٔ حاوی آنزیم به نسبت مساوی با TCA دارای غلظت ۶۰ درصد مخلوط شد و به مدت پانزده دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سیلسیوس قرار گرفت (۱۸). در روش رسوب دادن با سولفات آمونیم، نمونهٔ

تولیدات دامی

در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. به منظور ترسیم خط استاندارد از زایلوز بین ۰/۱۹۰ تا ۰/۹۵۲ میکرومول بر میلی لیتر استفاده شد. یک واحد فعالیت آنزیم زایلاناز معادل مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزادسازی ۱ میکرومول زایلوز در یک دقیقه از سوبسترا تحت شرایط آزمایش است. برای سنجش فعالیت ویژه آنزیم زایلاناز، مقدار فعالیت آنزیم بر میزان پروتئین موجود در نمونه مورد آزمایش تقسیم شد.

برای بررسی مناسب ترین روش نگهداری آنزیم ها، روش های نگهداری در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس، فریزر ۷۰- درجه سلسیوس و نیتروژن مایع مقایسه شد.

داده های حاصل با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS (نسخه ۹/۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی برای مدل ۱، تجزیه و میانگین ها با استفاده از آزمون چنددامنه ای دانکن مقایسه شد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + a_{ij} \quad (1)$$

در این رابطه، Y_{ij} میزان آنزیم استحصال شده تکرار جام و تیمار i ام، μ میانگین تکرارها در هر آزمایش، T_i تیمار i ام و a_{ij} خطای آزمایشی است.

نتایج

میانگین فعالیت ویژه آنزیم های سلولاز و زایلاناز در نمونه های گرفته شده به ترتیب $7/5 \pm 1/5$ و $16 \pm 1/5$ واحد به ازای هر میلی گرم پروتئین بود و فعالیت این آنزیم ها به ترتیب $0/37 \pm 0/573$ و $0/09 \pm 1/025$ واحد بر میلی لیتر بود. pH نمونه های گرفته شده از کشتارگاه بین شش تا هشت و میزان محتوای پروتئین نمونه ها ۰/۷ تا ۱/۲ میلی گرم در میلی لیتر بود. بررسی نمونه های متعدد به دست آمده از کشتارگاه نشان داد که نسبت آنزیم های سلولاز و زایلاناز در محتویات شکمبه تقریباً ثابت است. بررسی میزان این دو آنزیم در نمونه های مورد بررسی همبستگی

محلول به دست آمده برای تعیین میزان پروتئین و فعالیت آنزیمی استفاده شد. مایع رویی به دست آمده دوباره با مقدار لازم از سولفات آمونیم (۹۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به میزان ۳۵ درصد اشباع شد. این مورد برای مقادیر ۵۰، ۶۵ و ۸۰ درصد نیز مطابق روش فوق (به ترتیب با ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) انجام شد.

از آلبومین سرم گاو برای تهیه محلول استاندارد به منظور اندازه گیری میزان پروتئین حقیقی استفاده شد (۸). محدوده غلظت استاندارد بین ۰/۰۱۹ تا ۰/۰۱۹ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

فعالیت آنزیم سلولاز را کربوکسی متیل سلولز به عنوان سوبسترا تعیین کرد (۱۶). مقدار گلوکز آزاد شده با روش دی نیترو سالیسیلیک اسید سنجش شد (۲۷). مخلوط لوله های آزمایش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی آنزیم به همراه ۵۰۰ میکرولیتر کربوکسی متیل سلولز حل شده در ۴۰۰ میکرولیتر بافر سترات فسفات (pH=۶/۵) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. به منظور ترسیم خط استاندارد، از گلوکز به عنوان استاندارد استفاده شد. محدوده غلظت گلوکز در استاندارد بین ۰/۱۵۸ تا ۰/۷۹۳ میکرومول بر میلی لیتر بود. یک واحد فعالیت آنزیم سلولاز معادل مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزادسازی ۱ میکرومول گلوکز در یک دقیقه از سوبسترا تحت شرایط آزمایش است. برای سنجش فعالیت ویژه آنزیم سلولاز، مقدار فعالیت آنزیم بر میزان پروتئین موجود در نمونه مورد آزمایش تقسیم شد.

فعالیت آنزیم زایلاناز با زایلان (۲۰ گرم در لیتر) به عنوان سوبسترا تعیین شد. مقدار زایلوز آزاد شده به روش دی نیترو سالیسیلیک اسید سنجش شد (۲۷). مخلوط لوله های آزمایش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی آنزیم به همراه ۵۰۰ میکرولیتر زایلان حل شده در ۴۰۰ میکرولیتر بافر استات سدیم (pH=۴/۸) به مدت ۳۰ دقیقه

تولیدات دامی

متصل به اجزای فیبری موجود در محتوای شکمبه را تأیید می کند. محققان دیگر نشان دادند که سونیکیشن و تیمارهای فیزیکی به آزادسازی آنزیم ها از مواد جامد شکمبه می انجامد (۲۹).

بررسی نتایج مدت زمان هوموژن سازی نشان داد که افزایش زمان مخلوط کردن به ۱/۵ و ۲ دقیقه، آزاد شدن پروتئین ها را افزایش ولی فعالیت ویژه آنزیم ها را کاهش داد (جدول ۲). افزایش زمان هوموژن سازی بیش از یک دقیقه باعث کاهش فعالیت ویژه آنزیم ها شد که نشان دهنده آن است که مقدار بیشتر پروتئین آزاد شده در زمان های طولانی تر آنزیم نبوده، بلکه به احتمال زیاد پروتئین های غیر آنزیمی گیاهی است که در اثر شکستن دیواره سلولی علوفه های موجود در محتوای شکمبه آزاد می شود. همچنین، طولانی تر شدن مدت زمان هوموژن سازی ممکن است به آثار نامطلوب بر فعالیت آنزیم ها بینجامد. بنابراین، مدت زمان یک دقیقه برای هوموژن سازی مناسب ترین زمان است.

بالایی را نشان داد (۹۷/۸). این همبستگی نشان دهنده آن است که تقریباً میزان فعالیت زایلاناز در نمونه ها حدود ۱/۸ برابر میزان فعالیت سلولاز آنهاست.

هر دو روش هوموژن سازی و سونیکیشن منجر به آزاد شدن پروتئین های بیشتری نسبت به شاهد، همچنین افزایش آنزیم ها در مایع شکمبه شد ($P < 0.05$). با این حال، برای آزادسازی آنزیم های متصل به ذرات موجود در محتویات شکمبه، روش هوموژن سازی عملکرد بالاتری نسبت به روش سونیکیشن داشت (جدول ۱). با توجه به ثابت ماندن فعالیت ویژه آنزیم سلولاز بین تیمارها و شاهد، میزان این آنزیم در مایع شکمبه در هر دو روش، متناسب با افزایش آزادسازی پروتئین ها افزایش یافته است. در مورد زایلاناز، افزایش فعالیت ویژه زایلاناز در روش هوموژن سازی، نشان می دهد که مقدار بیشتری از پروتئین های آزاد شده مربوط به آنزیم زایلاناز است. به طور کلی، روش هوموژن سازی به دلیل آزادسازی مقدار بیشتری از آنزیم ها مناسب تر از سونیکیشن است. این نتایج وجود ساختارهای حاوی آنزیم های هضم کننده الیاف

جدول ۱. اثر روش آزادسازی آنزیم های متصل به مواد جامد بر فعالیت آنزیمی

پروتئین برادفورد	فعالیت ویژه سلولاز ** (U/mg)	فعالیت سلولاز * (U/ml)	فعالیت ویژه زایلاناز (U/mg)	فعالیت زایلاناز (U/ml)	
۰/۵۶۱ ^c ± ۰/۰۲۹	۱۰/۲۲۲ ± ۰/۰۶۶۲	۰/۵۷۳ ^c ± ۰/۰۳۷	۱۸/۳۰۴ ^b ± ۱/۰۶۰۸	۱/۰۲۵ ^c ± ۰/۰۹۰	شاهد
۰/۹۹۹ ^a ± ۰/۰۱۵	۱۰/۲۲۶ ± ۱/۵۲۰	۱/۰۲۱ ^a ± ۰/۰۱۵۲	۲۱/۷۵۹ ^a ± ۱/۱۶۷	۲/۱۷۳ ^a ± ۰/۱۱۵	هوموژن سازی
۰/۶۶۸ ^b ± ۰/۰۲۳	۱۰/۲۰۸ ± ۰/۰۶۰۱	۰/۶۸۱ ^b ± ۰/۰۴۰	۱۹/۰۵۵ ^b ± ۰/۰۶۷۶	۱/۲۷۳ ^b ± ۰/۰۴۵	سونیکیشن

* فعالیت آنزیم، میزان فعالیت آنزیم به ازای هر میلی لیتر محلول آنزیمی است.
** فعالیت ویژه آنزیم از تقسیم فعالیت آنزیم بر میزان محتوای پروتئین محلول آنزیمی به دست می آید.
a, b, c تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است ($P < 0.05$).
شاهد: مشخصات مربوط به نمونه اولیه مایع شکمبه است.

تولیدات دامی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳

جدول ۲. اثر مدت هوموژن سازی بر آزادسازی آنزیم‌ها

فعالیت زیابلاناز (U/ml)	فعالیت ویژه زیابلاناز (U/mg)	فعالیت سلولاز (U/ml)*	فعالیت ویژه سلولاز (U/mg)**	پروتئین برادفورد (میلی گرم / میلی لیتر)	
1/0.29 ^c ± 0/1.44	18/21.0 ^a ± 1/13.4	0/6.09 ^c ± 0/0.80	10/7.92 ^a ± 0/2.20	0/5.65 ^c ± 0/0.12	شاهد
1/6.93 ^a ± 0/0.95	18/22.4 ^a ± 0/6.71	1/0.03 ^a ± 0/0.53	10/7.95 ^a ± 0/2.50	0/9.29 ^b ± 0/0.05	۱ دقیقه
1/4.81 ^b ± 0/1.19	13/6.27 ^b ± 0/7.10	0/7.69 ^b ± 0/0.66	7/0.76 ^b ± 0/4.24	1/0.87 ^a ± 0/0.53	۱/۵ دقیقه
1/5.54 ^{ab} ± 0/1.08	13/0.50 ^b ± 0/6.05	0/9.21 ^{ab} ± 0/0.60	7/7.34 ^b ± 0/3.60	1/1.91 ^a ± 0/0.21	۲ دقیقه

* فعالیت آنزیم، میزان فعالیت آنزیم به ازای هر میلی لیتر محلول آنزیمی است.
 ** فعالیت ویژه آنزیم از تقسیم فعالیت آنزیم بر میزان محتوای پروتئین محلول آنزیمی به دست می آید.
 a, b, c تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است (P < 0/05).
 شاهد: مشخصات مربوط به نمونه اولیه مایع شکمبه است.

جدول ۳. مقایسه روش های مختلف تغلیظ آنزیم‌ها با استفاده از اندازه گیری پروتئین و فعالیت آنزیمی

فعالیت ویژه زیابلاناز (U/mg)	فعالیت ویژه سلولاز (U/mg)*	پروتئین برادفورد (میلی گرم / میلی لیتر)	روش های تغلیظ
17/3.84 ^b ± 1/8.59	10/6.63 ^a ± 0/7.11	1/0.86 ^a ± 0/0.48	شاهد
0/8.67 ^c ± 0/0.8	1/7.55 ^c ± 0/4.01	0/5.12 ^c ± 0/0.12	رسوب دادن با TCA
16/5.95 ^b ± 0/4.28	11/9.51 ^a ± 0/6.17	0/8.77 ^b ± 0/0.41	رسوب دادن با سولفات آمونیم
14/9.92 ^c ± 0/7.54	9/1.40 ^b ± 0/3.42	1/1.22 ^a ± 0/0.153	رسوب دادن با اتانل
16/3.69 ^{bc} ± 0/7.09	10/4.70 ^a ± 0/5.28	1/0.93 ^a ± 0/0.2	خشک کردن با برودت
21/1.10 ^a ± 1/0.98	11/7.82 ^a ± 0/7.50	0/4.82 ^d ± 0/0.23	خشک کردن با گاز نیتروژن

* فعالیت ویژه آنزیم از تقسیم فعالیت آنزیم بر میزان محتوای پروتئین محلول آنزیمی به دست می آید.
 a, b, c تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است (P < 0/05).
 شاهد: مشخصات مربوط به نمونه اولیه مایع شکمبه است.

(شاهد) شد (P < 0/05). روش رسوب دادن با TCA منجر به کاهش شدید فعالیت آنزیم‌ها شد (P < 0/05) ولی روش رسوب دادن با سولفات آمونیم و تغلیظ با گاز نیتروژن اثر نامطلوبی بر فعالیت آنزیم‌ها نداشت. علت اثر نامطلوب TCA ممکن است ناشی از ویژگی های اسیدی آن باشد که باعث غیرفعال شدن و تغییر ساختمان آنزیم‌ها می شود. TCA در آزمایش های زیادی برای تغلیظ پروتئین و آنزیم‌ها استفاده می شود ولی درصد بازیافت آنزیم‌ها در این

میزان پروتئین های بازیافت شده در روش رسوب دادن با اتانل و تغلیظ با برودت در خلأ، با گروه شاهد تفاوت معناداری نداشت (جدول ۳) ولی در روش های رسوب دادن با TCA و اتانل، فعالیت ویژه سلولاز و زیابلاناز کاهش یافت (P < 0/05).
 روش تغلیظ با برودت تأثیر نامطلوبی بر فعالیت آنزیم‌ها نداشت ولی روش رسوب دادن با اتانول منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌ها نسبت به فعالیت اولیه مایع شکمبه

تولیدات دامی

مقایسه روش های استخراج، تغلیظ و نگهداری آنزیم های هضم کننده الیاف گیاهی از محتویات شکمبه گوسفند

محلول حاوی آنزیم با سولفات آمونیم استفاده شد. فعالیت ویژه سلولاز و زایلاناز در محلول سولفات آمونیم به ترتیب در درصدهای اشباع ۳۵-۵۰ و ۵۰-۶۵ بالاتر از سایر محلول ها بود ($P < 0/05$) (جدول ۴).

روش رسوب دادن مرحله ای با سولفات آمونیم به منظور خالص سازی اولیه محلول های حاوی آنزیم را محققان زیادی استفاده کرده اند (جدول ۵). این روش هنگامی بهترین نتیجه را می دهد که آنزیم های مورد نظر ویژگی های مشابهی در مقابل تغییرات یونی حاصل از سولفات آمونیم داشته باشند. به دلیل اینکه آنزیم های موجود در مایع شکمبه میکروارگانسیم های مختلفی تولید می کنند ممکن است ویژگی های متفاوتی در ارتباط با سولفات آمونیم داشته باشند. در این آزمایش، فعالیت آنزیم سلولاز در مرحله رسوب دهی با ۳۵ تا ۵۰ درصد و زایلاناز ۵۰ تا ۶۵ درصد اشباع با سولفات آمونیم حداکثر بود. مقایسه نتایج رسوب دهی با درصد اشباع مختلف با شاهد نشان می دهد که این روش برای آنزیم های سلولاز و زایلاناز به ترتیب حداکثر ۱/۴۵ و ۱/۶۵ برابر خالص سازی کرده است.

روش خیلی متغیر بوده است. علت متغیر بودن درصد بازیافت آنزیم ها، به طور کامل شناخته نشده است، ولی ممکن است به دلیل ویژگی های خاص پروتئین ها یا آنزیم های موجود در محلول تغلیظ شده باشد (۳۴).

روش رسوب دادن با اتانل به دلیل نیاز به مقادیر زیادی اتانل (نه برابر حجم مایع حاوی آنزیم)، برای تغلیظ محلول های حجیم که غلظت آنزیم در آن ها کم است، مناسب نیست. روش تغلیظ با برودت یکی از بهترین روش های تغلیظ است، اما به دلیل صرف زمان و هزینه زیاد برای مراحل اولیه تغلیظ مناسب نیست و بهتر است در مرحله آخر تغلیظ استفاده شود (۱۹). روش رسوب دادن با سولفات آمونیم با وجود بازیافت کمتر پروتئین، روش کم هزینه ای است و چون می توان از این روش خالص سازی اولیه آنزیم ها را انجام داد، روش رایجی است. نیاز به دیالیز پس از تغلیظ، یکی از اشکال های این روش است، زیرا نمک باقیمانده در رسوب باید از آن خارج شود. در غیر این صورت، ممکن است منجر به اشکالاتی در سنجش آنزیم ها شود. در این آزمایش، به منظور خالص سازی اولیه آنزیم ها، از روش رسوب دادن متوالی

جدول ۴. خالص سازی آنزیم های شکمبه به وسیله اشباع سازی با درصدهای مختلف سولفات آمونیم

درصد اشباع						
شاهد	۰-۲۰	۲۰-۳۵	۳۵-۵۰	۵۰-۶۵	۶۵-۸۰	
پروتئین (میلی گرم/ میلی لیتر)	۰/۹۳۱۳	۰/۲۱۲۰	۰/۱۰۲۷	۰/۰۷۲۶	۰/۰۴۳۳	
فعالیت ویژه سلولاز (U/mg)	۱۰/۲۵۶±۰/۴۵۵	۳/۱۰۰±۰/۳۴۳	۴/۵۱۶±۰/۳۸۱	۱۴/۸۲۱±۰/۲۲۵	۱۳/۱۷۵±۰/۷۷۲	۶/۶۹۶±۱/۱۲۶
فعالیت ویژه زایلاناز (U/mg)	۱۸/۰۵±۰/۶۱۱	۶/۱۲۶±۰/۳۲۷	۵/۵۱۹±۰/۶۶۶	۱۰/۴۹۳±۱/۰۹۸	۲۹/۷۶۵±۳/۱۷۳	۲۰/۹۸±۲/۵۵۴

a, b, c, d تفاوت ارقام در هر ستون یا حروف نامشابه معنادار است ($P < 0/05$).
شاهد: مشخصات مربوط به نمونه اولیه مایع شکمبه است.

تولیدات دامی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳

جدول ۵. خالص سازی اولیه آنزیم های سلولاز، زایلاناز به وسیله رسوب دادن با سولفات آمونیم

نوع آنزیم	خالص سازی (برابر)	درصد بازیافت	نوع خالص سازی	مؤلف
سلولاز	۱/۲	۱۳/۶۴	سولفات آمونیم ۶۵-۵۰٪	پژوهش حاضر
سلولاز	۲	۵۸	سولفات آمونیم ۶۵-۳۰٪	(۹)
سلولاز	۱/۹	۶۷/۸	سولفات آمونیم	(۱۷)
سلولاز	۱/۲	۴۲/۸	سولفات آمونیم ۶۰-۴۰٪	(۱۰)
سلولاز	۱/۳۵	۵/۰۹	سولفات آمونیم	(۳۳)
زایلاناز	۱/۶۵	۱۷	سولفات آمونیم ۶۵-۵۰٪	پژوهش حاضر
زایلاناز	۲/۲۱	۶۰/۴۵	سولفات آمونیم ۶۰٪	(۱)
زایلاناز	۱/۵۳	۲۷/۴	سولفات آمونیم ۲۰٪	(۲۸)
زایلاناز	۲	۸۷	سولفات آمونیم ۸۰٪	(۳۷)
زایلاناز	۱/۸	۵۰/۳	سولفات آمونیم ۷۰-۴۰٪	(۳۶)
زایلاناز	۱/۹	۷۲/۲	سولفات آمونیم ۸۰-۳۰٪	(۲۱)

سیلیسیوس منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌ها از هفته دوم نگهداری به بعد شد ($P < 0/05$) (جدول ۶). نگهداری محلول حاوی آنزیم در دمای ۷۰- و ۱۹۶- درجه سیلیسیوس (نیترژن مایع)، اثری بر فعالیت آن نداشت. ولی نگهداری طولانی مدت (هفته ۲۱) در دمای ۷۰- درجه سیلیسیوس منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌ها شد.

نگهداری ترکیبات بیولوژیک به ویژه ترکیبات حاوی آنزیم‌ها به مدت طولانی، همیشه یکی از دغدغه‌های محققان بوده است، زیرا آنزیم‌ها ترکیبات پروتئینی هستند که در شرایط نامساعد قدرت بیولوژیک خود را از دست می‌دهند. در رابطه با مایع شکمبه که حاوی آنزیم‌های پروتئاز، همچنین طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها نیز هست این مسئله حادثتر است و به تخریب سریع‌تر آنزیم‌ها منجر می‌شود. براساس نتایج تحقیق حاضر، مناسب‌ترین دما برای نگهداری مایع شکمبه برای طولانی مدت، ۱۹۶- درجه سیلیسیوس (نیترژن مایع) است.

درصد بازیافت این آنزیم‌ها به ترتیب ۱۳/۶۴ و ۱۷ بود که مناسب نیست. احتمالاً به دلیل رسوب‌گیری در مراحل مختلف ممکن است در هر مرحله مقداری از آنزیم‌ها از دسترس خارج شده باشد. از طرف دیگر، این آنزیم‌ها در محیط شکمبه با میکروارگانیسم‌های مختلفی تولید می‌شوند که تا حدودی ویژگی‌های فیزیوشیمیایی متفاوتی دارند. به همین دلیل در تمامی درصدهای مختلف اشباع با سولفات آمونیم، مقداری فعالیت آنزیمی مشاهده شد که این درصد بازیافت آنزیم‌ها را در درصد اشباع مورد نظر کاهش دهد (۳۲). تمامی محققانی که نتایج تحقیق آن‌ها در جدول ۵ ارائه شده است، روی یک میکروارگانیسم و محیط کشت آن تحقیق کرده‌اند. بنابراین، از شرایط یکنواخت و آنزیم‌هایی از نظر ساختار فیزیکی - شیمیایی مشابه برخوردار بودند. میزان خالص سازی در این تحقیق با نتایج این محققان تقریباً مشابه است. به هر حال درصد بازیافت در نتایج این محققان بالاتر بود.

نگهداری محلول حاوی آنزیم‌ها در دمای ۲۰- درجه

تولیدات دامی

مقایسه روش های استخراج، تغلیظ و نگهداری آنزیم های هضم کننده الیاف گیاهی از محتویات شکمبه گوسفند

جدول ۶. فعالیت ویژه سلولاز در شرایط مختلف نگهداری شیره شکمبه

مدت زمان نگهداری								روش نگهداری
هفته بیست و یکم	هفته ششم	هفته چهارم	هفته سوم	هفته دوم	هفته اول			
10/117 ^a ± 0/666	10/117 ^a ± 0/666	10/117 ^a ± 0/666	10/117 ^a ± 0/666	10/117 ^a ± 0/666	10/117 ^a ± 0/666	10/117 ^a ± 0/666	شاهد	
9/780 ^a ± 0/478	9/703 ^a ± 0/406	10/117 ^a ± 0/782	10/528 ^a ± 0/333	9/519 ^a ± 0/515	10/926 ^a ± 0/550	10/926 ^a ± 0/550	نیتروزن مایع	
6/743 ^b ± 0/176	9/746 ^a ± 0/934	10/115 ^a ± 0/364	10/420 ^a ± 0/505	9/952 ^a ± 0/625	10/605 ^b ± 0/430	10/605 ^b ± 0/430	۷۰-درجه سیلیسیوس	
-	-	8/940 ^b ± 0/425	8/600 ^b ± 0/554	9/106 ^b ± 0/246	9/611 ^b ± 0/456	9/611 ^b ± 0/456	۲۰-درجه سیلیسیوس	

b,a: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است (P < 0/05).
شاهد: مشخصات مربوط به نمونه اولیه مایع شکمبه است.

تولیدات دامی

دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳

4. Bayer EA, Morag E and Lamed R (1994) The cellulosome – a treasure-trove for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 12: 379-386.
5. Bedford MR and Partridge GG (2001) (Eds) *Enzymes in Farm Animal Nutrition* CAB International, Wallingford, UK, 406 pp.
6. Beguin P and Lemaire M (1996) The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialised in cellulose degradation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 201-236.
7. Bhat MK and Bhat S (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 15: 583-620.
8. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
9. Byrne H, Christou NV, Verma DP and Maclachlan GA (1975) Purification and characterization of two cellulases from auxin-treated pea epicotyls. *Biological Chemistry*, 250(3): 1012-1018.
10. Chen PJ, Wei TC, Chang YT and Lin LP (2004) Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45: 111-118
11. Chi WK, Ku CH and Chang CC (1994) Two-step cell disruption for the extraction of membrane-associated recombinant protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 721(1): 365-373.
12. Choi H, Laleye L and Fetal A (1997) Release of amino peptidase from *Lactobacillus casei* sp

نگهداری نمونه‌های حاوی آنزیم در نیتروژن مایع، منجر به کاهش فعالیت آنزیم سلولاز در این نمونه‌ها نشده است. ولی در نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۷۰- درجه سیلیسیوس، نمونه‌ها تا هفته ششم فعالیت خود را حفظ کرده‌اند، ولی در درازمدت، نگهداری نمونه‌ها در این دما منجر به کاهش فعالیت آن‌ها شد. نگهداری نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سیلیسیوس فقط به مدت یک هفته مناسب است و از هفته دوم، فعالیت آنزیمی نمونه‌ها رو به کاهش می‌گذارد. نتایج تحقیقات دیگر نیز نگهداری آنزیم‌ها در دمای ۲۰- و ۷۰- را توصیه کرده‌اند (۱۹، ۳۰).

نتایج این آزمایش نشان داد که روش‌های هوموژن‌سازی و رسوب دادن با سولفات آمونیم به ترتیب برای استخراج و تغلیظ آنزیم محتویات شکمبه دام‌های کشتار شده مناسب است. همچنین، نگهداری نمونه‌ها حاوی آنزیم در نیتروژن مایع، ۷۰- و ۲۰- درجه سیلیسیوس به ترتیب برای زمان‌های طولانی، متوسط و کوتاه مناسب است.

منابع

1. Abd El-Nasser NH, Mahdy EM, Shousha WG and El Sayed GH (2010) Purification and Partial Characterization of Extracellular Cellulase Free Xylanase from *Streptomyces rochei*. *Applied Science Research*. 6(9): 1373-1378.
2. Bayer EA, Morag E, Wilchek M, Lamed R, Yaron S and Shoham Y (1995) Cellulosome domains for novel biotechnological application. In: Petersen, S.B., Svensson, B. and Pedersen, S. (Eds) *Carbohydrate Bioengineering. Progress in Biotechnology*, Vol. 10. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. Pp. 251-260.
3. Bayer EA, Lamed R and Himmel ME (2007) The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 237-245.

تولیدات دائمی

- casei by cell disruption in microfluidizer. *Biotechnology Techniques*. 11(7): 451-453.
13. Cumming R and Icton H G (2001) Cell disintegration and extraction techniques. In: *Protein purification techniques: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford. Pp. 83-110.
14. Doi RH, Kosugi A, Murashima K, Tamaru Y and Han SO (2003) Cellulosomes from Mesophilic Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 185(20): 5907-5914.
15. Festenstein GN (1957) Cellulolytic enzymes from sheep-rumen liquor microorganisms. *Biochemical Journal*, 69 (4): 562-567.
16. Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 59, No. 2, pp. 257-268.
17. Hurst PL, Nielsen J, Sullivan PA and Shepherd MG (1977) Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 165: 33-41.
18. Hwang BJ and Chu G (1996) Trichloroacetic acid precipitation by ultracentrifugation to concentrate dilute protein in viscous solution. *Biotechniques*. 20: 982-984.
19. Illanes A (2008) Enzyme production. In: ILLANES, Andrés. Ed. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. United Kingdom; Springer. Pp. 60-89.
20. Jiang ZQ, Deng W, Li XT, Ai ZL, Li LT and Kusakabe I (2005) Characterization of a novel, ultra-large xylanolytic complex (xylanosome) from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 923-929.
21. Kang MK, Maeng P and Rhee YH (1996) Purification and characterization of two xylanases from *Alkaliphilic Cephalosporium sp. strain rym-202*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9): 3480-3482.
22. Kitts WD and Underkofler LA (1954) Digestion by rumen microorganisms. hydrolytic products of cellulose and the cellulolytic enzymes. *Agricultural Food Chemistry*, 2: 639-645
23. Koppolu A and Davis Clements L (2004) Ruminant waste stream as a source of industrial chemicals. *Resource Recovery and Conservation*, 41(3): 215-226.
24. Lamed R, Setter E and Bayer EA (1983) Characterization of a cellulose binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *Biochemical Journal*, 156: 828-836.
25. Leser EW and Asenjo JA (1994) Protein recovery, separation and purification. Selection of optimal techniques using an expert system. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89(1): 99-109.
26. Lei J, Lin H and Fountoulakis M (2004) Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *Journal of Chromatography A*. 1023: 317-320.
27. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
28. Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, Aono R and Horikoshi K (1993) Purification and Some Properties of an Alkaline Xylanase from *Alkaliphilic Bacillus sp. Strain 41M-1*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7): 2311-2316.
29. Noziere P and Michalet-Doreau B (1994) Effect of extraction method on activities of polysaccharide-depolymerase enzymes in the microbial population from the solid phase in the

- rumen. *Reproduction Nutrition Development*, 34: 281-288.
30. Scopes RK (1994) *Protein Purification, Principles and Practice*, 3rd ed. Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer-Verlag, N.Y.
31. Selinger LB, Forsberg CW and Cheng KJ (1996) The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*. 2: 263-284.
32. Shawn D (1996) *Protein Purification Protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology*, P. Cutler, Ed. Humana Press. 59: 101-117.
33. Sibtain A, Bashir A, Saleem H, Saadia M and Jamil A (2009) Production and purification of cellulose degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Pakistan Journal of Botany*, 41(3): 1411-1419.
34. Sivaraman T, Kumar TK, Jayaraman G and Yu C (1997) The mechanism of 2, 2, 2-trichloroacetic acid-induced protein precipitation. *Journal of Protein Chemistry*, 16: 291-297.
35. Stanley RW and Kesler EM (1958) Preparation and some basic properties of cell-free cellulolytic extracts of rumen fluid. *Journal of Dairy Science*. 42: 127-136.
36. Wateewuthajarn K and Pinphanichakarn P (2000) Purification and characterization of xylanases from *Streptomyces sp.* PC22. *Science Research of Chulalongkorn University*. 25(2): 245-258
37. Widjaja A, Lestari E, Tanjung A, Widiawan, Alfian and H. Ogino. 2009. Optimized production of xylanase from fungal strains and its purification strategies. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation*, 4(3): 219-232.
38. Wood TM (1992a) Microbial enzymes involved in the degradation of the cellulose component of plant cell walls. In: Rowett Research Institute Annual Report, 10-24.