تولیدات دامی
دوره ۱۶ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۱۷۸-۱۶۷

مقایسهٔ روش‌های استخراج، تغلیظ و نگهداری آنزیم‌های هضم‌کنندهٔ الیاف گیاهی از محتویات شکمبهٔ گوسفند

حسین منافی راثی[1*]، محمد چمنی[2]، سلمان افشار[3]

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

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۳/۰۲/۳۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۸/۰۹

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تولید آنزیم‌های هضم‌کنندهٔ الیاف در شکمبه و روش‌های مختلف استخراج و تغلیظ آن‌ها از محتویات شکمبهٔ دام‌های کشتارشده 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 هضم‌کنندهٔ 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- درجهٔ سانتی‌گراد استفاده شد. میانگین فعالیت ویژهٔ 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 شکمبهٔ دام‌های کشتارشده منبع مناسبی از آنزیم‌های هضم‌کنندهٔ الیاف گیاهی است و می‌توان با به‌کارگیری روش‌های استخراج و تغلیظ مناسب از آن‌ها استفاده کرد.

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

* نویسنده مسئول
Email: manafihosein@yahoo.com

مقدمه

شیرابهٔ شکمبهٔ نشخوارکنندگان حاوی آنزیم‌های هضم‌کنندهٔ الیاف گیاهی متنوعی است که میکروارگانیسم‌های موجود در آن تولید می‌کنند. آنزیم‌های هضم‌کنندهٔ الیاف گیاهی سلولاز و همی‌سلولاز که توسط دامنهٔ وسیعی از باکتری‌ها و قارچ‌ها شامل هوازی، بی‌هوازی، مزوفیل، ترموفیل و اکسترموفیل تولید می‌شوند اهمیت بیشتری دارند. قارچ‌ها و باکتری‌های هوازی به‌طور معمول آنزیم‌های سلولاز و همی‌سلولاز برون‌سلولی تولید می‌کنند، درحالی‌که باکتری‌های بی‌هوازی سلولازها را به شکل ترکیب پیچیدهٔ چندآنزیمی به‌هم پیوسته تولید می‌کنند (۶، ۷، ۳۸).

برای نخستین بار در سال ۱۹۸۳ ساختارهایی به نام سلولوزوم در باکتری‌های تجزیه‌کنندهٔ دیوارهٔ سلولی گیاهی شناسایی شد (۲۴). تحقیقات نشان داد آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ 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 تجزیهٔ 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 هضم‌کنندهٔ الیاف با فرایندهایی نظیر هوموژن سازی و سونیکیشن به مایع حاوی میکروارگانیسم‌ها آزاد شوند (۳، ۴). استحصال آنزیم‌های میکروبی از شیرابهٔ شکمبه، نخستین بار در سال ۱۹۵۴ گزارش شد (۲۲). عصاره‌ای از محتویات شکمبه جدا شد که دارای خصوصیات آنزیم‌های هضم‌کنندهٔ 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 تهیهٔ 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، همی‌سلولاز و پکتیناز برای بهبود کیفیت تغذیه‌ای علوفه‌ها به‌کار 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 زمینهٔ 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 شکمبهٔ 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 پارچهٔ تنظیف عبور داده شد. سپس، به مدت پانزده دقیقه سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ × g) شد. مایع بالایی جدا شده (حاوی آنزیم‌های میکروبی) به منظور جدا کردن ناخالصی‌های احتمالی از کاغذ صافی

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

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 (wiseclean با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز) قرارگرفت. 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 قرارگرفت. 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 قرارگرفت (۱۸). در روش رسوب دادن با سولفات آمونیم، نمونهٔ 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 قرارگرفت. 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 قرارگرفت 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 قرارگرفت 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.

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

از آلبومین سرم گاو برای تهیهٔ محلول استاندارد به منظور اندازه‌گیری میزان پروتئین حقیقی استفاده شد (۸). محدودهٔ غلظت استاندارد بین ۰/۰۰۱۹ تا ۰/۰۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

فعالیت آنزیم سلولاز را کربوکسی متیل‌سلولز به عنوان سوبسترا تعیین کرد (۱۶). مقدار گلوکز آزادشده با روش دی‌نیتروسالسیلیک اسید سنجش شد (۲۷). مخلوط لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی آنزیم به همراه ۵۰۰ میکرولیتر کربوکسی‌متیل سلولز حل شده در ۴۰۰ میکرولیتر بافر سیترات فسفات (pH=۶/۵) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجهٔ سیلسیوس قرارگرفت. به منظور ترسیم خط استاندارد، از گلوکز به عنوان استاندارد استفاده شد. محدودهٔ غلظت گلوکز در استاندارد بین ۰/۱۵۸ تا ۰/۷۹۳ میکرومول بر میلی‌لیتر 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 ویژهٔ آنزیم سلولاز، مقدار فعالیت آنزیم بر میزان پروتئین موجود در نمونهٔ مورد آزمایش تقسیم شد.

فعالیت آنزیم زایلاناز با زایلان (۲۰ گرم در لیتر) به عنوان سوبسترا تعیین شد. مقدار زایلوز آزادشده به روش دی‌نیتروسالسیلیک اسید سنجش شد (۲۷). مخلوط لوله‌های 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 در دمای ۵۰ درجهٔ سیلسیوس قرارگرفت. به منظور ترسیم خط استاندارد از زایلوز بین ۰/۱۹۰ تا ۰/۹۵۲ میکرومول بر میلی‌لیتر 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 ویژهٔ آنزیم زایلاناز، مقدار فعالیت آنزیم بر میزان پروتئین موجود در نمونهٔ مورد آزمایش تقسیم شد.

برای بررسی مناسب‌ترین روش نگهداری آنزیم‌ها، روش‌های نگهداری در فریزر ۲۰- درجهٔ سلسیوس، فریزر ۷۰- درجهٔ سلسیوس و نیتروژن مایع مقایسه شد.

داده‌های حاصل با استفاده از رویهٔ GLM نرم‌افزار SAS (نسخهٔ ۹/۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی برای مدل ۱، تجزیه و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + a_{ij} \qquad (۱)$$

در این رابطه، Y_{ij} میزان آنزیم استحصال شدهٔ تکرار jام و تیمار iام، μ میانگین تکرارها در هر آزمایش، T_i تیمار iام و a_{ij} خطای آزمایشی است.

نتایج

میانگین فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز در نمونه‌های گرفته شده به ترتیب ۲/۵ ± ۷/۵ و ۱/۵ ± ۱۶ واحد به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بود و فعالیت این آنزیم‌ها به ترتیب ۰/۰۳۷ ± ۰/۵۷۳ و ۰/۰۹ ± ۱/۰۲۵ واحد بر میلی‌لیتر بود. pH نمونه‌های گرفته شده از کشتارگاه بین شش تا هشت و میزان محتوای پروتئین نمونه‌ها ۰/۷ تا ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. بررسی نمونه‌های متعدد به‌دست آمده از کشتارگاه نشان داد که نسبت آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز در محتویات شکمبه تقریباً ثابت است. بررسی میزان این دو آنزیم در نمونه‌های مورد بررسی همبستگی

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

هر دو روش هوموژن‌سازی و سونیکیشن منجر به آزاد شدن پروتئین‌های بیشتری نسبت به شاهد، همچنین افزایش آنزیم‌ها در مایع شکمبه شد ($P < ۰/۰۵$). با این حال، برای آزادسازی آنزیم‌های متصل به ذرات موجود در محتویات شکمبه، روش هوموژن سازی عملکرد بالاتری نسبت به روش سونیکیشن داشت (جدول ۱). با توجه به ثابت‌ماندن فعالیت ویژهٔ آنزیم سلولاز بین تیمارها و شاهد، میزان این آنزیم در مایع شکمبه در هر دو روش، متناسب با افزایش آزادسازی پروتئین‌ها افزایش یافته است. در مورد زایلاناز، افزایش فعالیت ویژهٔ زایلاناز در روش هوموژن‌سازی، نشان می‌دهد که مقدار بیشتری از پروتئین‌های آزادشده مربوط به آنزیم زایلاناز است. به‌طورکلی، روش هوموژن سازی به دلیل آزادسازی مقدار بیشتری از آنزیم‌ها مناسب‌تر از سونیکیشن است. این نتایج وجود ساختارهای حاوی آنزیم‌های هضم‌کنندهٔ الیاف متصل به اجزای فیبری موجود در محتوای شکمبه را تأیید می‌کند. محققان دیگر نشان دادند که سونیکیشن و تیمارهای فیزیکی به آزادسازی آنزیم‌ها از مواد جامد شکمبه می‌انجامد (۲۹).

بررسی نتایج مدت زمان هوموژن سازی نشان داد که افزایش زمان مخلوط کردن به ۱/۵ و ۲ دقیقه، آزاد شدن پروتئین‌ها را افزایش ولی فعالیت ویژهٔ آنزیم‌ها را کاهش داد (جدول ۲). افزایش زمان هوموژن سازی بیش از یک دقیقه باعث کاهش فعالیت ویژهٔ آنزیم‌ها شد که نشان‌دهندهٔ آن است که مقدار بیشتر پروتئین آزادشده در زمان‌های طولانی‌تر آنزیم نبوده، بلکه به احتمال زیاد پروتئین‌های غیرآنزیمی گیاهی است که در اثر شکستن دیوارهٔ سلولی علوفه‌های موجود در محتوای شکمبه آزاد می‌شود. همچنین، طولانی‌تر شدن مدت زمان هوموژن‌سازی ممکن است به آثار نامطلوب بر فعالیت آنزیم‌ها بینجامد. بنابراین، مدت زمان یک دقیقه برای هوموژن‌سازی مناسب‌ترین زمان است.

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

	پروتئین برادفورد (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	فعالیت ویژهٔ سلولاز (U/mg)**	فعالیت سلولاز (U/ml)*	فعالیت ویژهٔ زایلاناز (U/mg)	فعالیت زایلاناز (U/ml)
شاهد	۰/۵۶۱^{c} ± ۰/۰۲۹	۱۰/۲۲۲ ± ۰/۶۶۲	۰/۵۷۳^{c} ± ۰/۰۳۷	۱۸/ ۳۰۴^{b} ± ۱/۶۰۸	۱/۰۲۵^{c} ± ۰/۰۹۰
هوموژن‌سازی	۰/۹۹۹^{a} ± ۰/۰۱۵	۱۰/۲۲۶ ± ۱/۵۲۰	۱/۰۲۱^{a} ± ۰/۱۵۲	۲۱/۷۵۹^{a} ± ۱/۱۶۷	۲/۱۷۳^{a} ± ۰/۱۱۵
سونیکیشن	۰/۶۶۸^{b} ± ۰/۰۲۳	۱۰/۲۰۸ ± ۰/۶۰۱	۰/۶۸۱^{b} ± ۰/۰۴۰	۱۹/۰۵۵^{b} ± ۰/۶۷۶	۱/۲۷۳^{b} ± ۰/۰۴۵

* فعالیت آنزیم، میزان فعالیت آنزیم به ازای هر میلی‌لیتر محلول آنزیمی است.

** فعالیت ویژهٔ آنزیم از تقسیم فعالیت آنزیم بر میزان محتوای پروتئین محلول آنزیمی به‌دست می‌آید.

a,b, c تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است ($P < ۰/۰۵$).

شاهد: مشخصات مربوط به نمونهٔ اولیهٔ مایع شکمبه است.

جدول ۲. اثر مدت هوموژن‌سازی بر آزادسازی آنزیم‌ها

	پروتئین برادفورد (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	فعالیت ویژهٔ سلولاز (U/mg)**	فعالیت سلولاز (U/ml)*	فعالیت ویژهٔ زایلاناز (U/mg)	فعالیت زایلاناز (U/ml)
شاهد	۰/۵۶۵^{c} ± ۰/۰۱۲	۱۰/ ۷۹۲^{a} ± ۰/۲۲۰	۰/ ۶۰۹^{c} ± ۰/۰۸۰	۱۸/۲۱۰^{a} ± ۱/۱۳۴	۱/۰۲۹^{c} ± ۰/۱۴۴
۱ دقیقه	۰/۹۲۹^{b} ± ۰/۰۰۵	۱۰/۷۹۵^{a} ± ۰/۲۵۰	۱/۰۰۳^{a} ± ۰/۰۵۳	۱۸/۲۲۴^{a} ± ۰/۶۷۱	۱/۶۹۳^{a} ± ۰/۰۹۵
۱/۵ دقیقه	۱/۰۸۷^{a} ± ۰/۰۵۳	۷/۰۷۶^{b} ± ۰/۴۲۴	۰/۷۶۹^{b} ± ۰/۰۶۶	۱۳/۶۲۷^{b} ± ۰/۷۱۰	۱/۴۸۱^{b} ± ۰/۱۱۹
۲ دقیقه	۱/۱۹۱^{a} ± ۰/۰۲۱	۷/۷۳۴^{b} ± ۰/۳۶۰	۰/۹۲۱^{ab} ± ۰/۰۶۰	۱۳/۰۵۰^{b} ± ۰/۶۰۵	۱/۵۵۴^{ab} ± ۰/۱۰۸

* فعالیت آنزیم، میزان فعالیت آنزیم به ازای هر میلی‌لیتر محلول آنزیمی است.

** فعالیت ویژهٔ آنزیم از تقسیم فعالیت آنزیم بر میزان محتوای پروتئین محلول آنزیمی به‌دست می‌آید.

a, b, c تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است (P <۰/۰۵).

شاهد: مشخصات مربوط به نمونهٔ اولیهٔ مایع شکمبه است.

جدول ۳. مقایسهٔ روش‌های مختلف تغلیظ آنزیم‌ها با استفاده از اندازه‌گیری پروتئین و فعالیت آنزیمی

روش‌های تغلیظ	پروتئین برادفورد (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	فعالیت ویژهٔ سلولاز (U/mg) *	فعالیت ویژهٔ زایلاناز (U/mg)
شاهد	۱/۰۸۶^{a} ± ۰/۰۴۸	۱۰/۶۶۲^{a} ± ۰/۷۱۱	۱۷/۳۸۴^{b} ± ۱/۸۵۹
رسوب دادن با TCA	۰/۵۱۲^{c} ± ۰/۰۱۲	۱/۷۵۵^{c} ± ۰/۴۰۱	۰/۸۶۷^{e} ± ۰/۰۸
رسوب دادن با سولفات آمونیم	۰/۸۷۷^{b} ± ۰/۰۴۱	۱۱/۹۵۱^{a} ± ۰/۶۱۷	۱۶/۵۹۵^{b} ± ۰/۴۲۸
رسوب دادن با اتانل	۱/۱۲۲^{a} ± ۰/۰۱۵۳	۹/۱۴۰^{b} ± ۰/۳۴۲	۱۴/۹۹۲^{c} ± ۰/۷۵۴
خشک کردن با برودت	۱/۰۹۳^{a} ± ۰/۰۲	۱۰/۴۷۰^{a} ± ۰/۵۲۸	۱۶/۳۶۹^{bc} ± ۰/۷۰۹
خشک کردن با گاز نیتروژن	۰/۴۸۲^{d} ± ۰/۰۲۳	۱۱/۷۸۲^{a} ± ۰/۷۵۰	۲۱/۱۱۰^{a} ± ۱/۰۹۸

* فعالیت ویژهٔ آنزیم از تقسیم فعالیت آنزیم بر میزان محتوای پروتئین محلول آنزیمی به‌دست می‌آید.

a, b, c تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است (P <۰/۰۵).

شاهد: مشخصات مربوط به نمونهٔ اولیهٔ مایع شکمبه است.

میزان پروتئین‌های بازیافت شده در روش رسوب دادن با اتانل و تغلیظ با برودت در خلأ، با گروه شاهد تفاوت معناداری نداشت (جدول ۳) ولی در روش‌های رسوب دادن با TCA و اتانل، فعالیت ویژهٔ سلولاز و زایلاناز کاهش یافت (P < ۰/۰۵).

روش تغلیظ با برودت تأثیر نامطلوبی بر فعالیت آنزیم‌ها نداشت ولی روش رسوب دادن با اتانول منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌ها نسبت به فعالیت اولیهٔ مایع شکمبه (شاهد) شد (P <۰/۰۵). روش رسوب دادن با TCA منجر به کاهش شدید فعالیت آنزیم‌ها شد (P <۰/۰۵) 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 ویژگی‌های اسیدی آن باشد که باعث غیرفعال شدن و تغییر ساختمان آنزیم‌ها می شود. TCA در آزمایش‌های زیادی برای تغلیظ پروتئین و آنزیم‌ها استفاده می‌شود ولی درصد بازیافت آنزیم‌ها در این

روش خیلی متغیر بوده است. علت متغیر بودن درصد بازیافت آنزیم‌ها، به‌طور کامل شناخته نشده است، ولی ممکن است به دلیل ویژگی‌های خاص پروتئین‌ها یا آنزیم‌های 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 محلول‌های حجیم که غلظت آنزیم در آن‌ها کم است، مناسب نیست. روش تغلیظ با برودت یکی از بهترین روش‌های تغلیظ است، اما به دلیل صرف زمان و هزینهٔ زیاد برای مراحل اولیهٔ تغلیظ مناسب نیست و بهتر است در مرحلهٔ آخر تغلیظ استفاده شود (۱۹). روش رسوب دادن با سولفات آمونیم با وجود بازیافت کمتر پروتئین، روش کم‌هزینه‌ای است و چون می‌توان از این روش خالص‌سازی اولیهٔ آنزیم‌ها را انجام داد، روش رایجی است. نیاز به دیالیز پس از تغلیظ، یکی از اشکال‌های این روش است، زیرا نمک باقیمانده در رسوب باید از آن خارج شود. در غیر این صورت، ممکن است منجر به اشکالاتی در سنجش آنزیم‌ها شود. در این آزمایش، به منظور خالص‌سازی اولیهٔ آنزیم‌ها، از روش رسوب دادن متوالی محلول حاوی آنزیم با سولفات آمونیم استفاده شد. فعالیت ویژهٔ سلولاز و زایلاناز در محلول سولفات آمونیم به ترتیب در درصدهای اشباع ۳۵-۵۰ و ۵۰-۶۵ بالاتر از سایر محلول‌ها بود ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۴).

روش رسوب دادن مرحله‌ای با سولفات آمونیم به منظور خالص‌سازی اولیهٔ محلول‌های حاوی آنزیم را محققان زیادی استفاده کرده اند (جدول ۵). این روش هنگامی بهترین نتیجه را می‌دهد که آنزیم‌های مورد نظر ویژگی‌های مشابهی در مقابل تغییرات یونی حاصل از سولفات آمونیم داشته باشند. به دلیل اینکه آنزیم‌های موجود در مایع شکمبه میکروارگانیسم‌های مختلفی تولید می‌کنند ممکن است ویژگی‌های متفاوتی در ارتباط با سولفات آمونیم داشته باشند. در این آزمایش، فعالیت آنزیم سلولاز در مرحلهٔ رسوب‌دهی با ۳۵ تا ۵۰ درصد و زایلاناز ۵۰ تا ۶۵ درصد اشباع با سولفات آمونیم حداکثر بود. مقایسهٔ نتایج رسوب‌دهی با درصد اشباع مختلف با شاهد نشان می‌دهد که این روش برای آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز به ترتیب حداکثر ۱/۴۵ و ۱/۶۵ برابر خالص‌سازی کرده است.

جدول ۴. خالص‌سازی آنزیم‌های شکمبه به وسیلهٔ اشباع‌سازی با درصدهای مختلف سولفات آمونیم

	درصد اشباع					
	شاهد	۰-۲۰	۲۰-۳۵	۳۵-۵۰	۵۰-۶۵	۶۵-۸۰
پروتئین (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	۰/۹۳۱۳	۰/۳۴۲۵	۰/۲۱۲۰	۰/۱۰۲۷	۰/۰۷۲۶	۰/۰۴۳۳
فعالیت ویژهٔ سلولاز (U/mg)	۱۰/۲۵۶^{c}±۰/۴۵۵	۳/۱۰۰^{e}±۰/۳۴۳	۴/۵۱۶^{e}±۰/۳۸۱	۱۴/۸۲۱^{a}±۰/۲۲۵	۱۳/۱۷۵^{b}±۰/۷۷۲	۶/۶۹۶^{d}±۱/۱۲۶
فعالیت ویژهٔ زایلاناز (U/mg)	۱۸/۰۵^{c}±۰/۶۱۱	۶/۱۲۶^{e}±۰/۳۲۷	۵/۵۱۹^{e}±۰/۶۶۶	۱۰/۴۹۳^{d}±۱/۰۹۸	۲۹/۷۶۵^{a}±۳/۱۷۳	۲۰/۹۸^{b}±۲/۵۵۴

a, b, c, d تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است ($P < ۰/۰۵$).

شاهد: مشخصات مربوط به نمونهٔ اولیهٔ مایع شکمبه است.

جدول ۵. خالص‌سازی اولیهٔ آنزیم‌های سلولاز، زایلاناز به وسیلهٔ رسوب دادن با سولفات آمونیم

نوع آنزیم	خالص‌سازی (برابر)	درصد بازیافت	نوع خالص‌سازی	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 آمونیم۲۰٪	(۲۸)
زایلاناز	۲	۸۷	سولفات آمونیم۸۰٪	(۳۷)
زایلاناز	۱/۸	۵۰/۳	سولفات آمونیم۷۰-۴۰٪	(۳۶)
زایلاناز	۱/۹	۷۲/۲	سولفات آمونیم۸۰-۳۰٪	(۲۱)

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 فیزیکوشیمیایی 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 خالص‌سازی 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- درجهٔ سیلسیوس منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌ها از هفتهٔ دوم نگهداری به بعد شد ($P < ۰/۰۵$) (جدول ۶). نگهداری محلول حاوی آنزیم در دمای ۷۰- و ۱۹۶- درجهٔ سیلسیوس (نیتروژن مایع)، اثری بر فعالیت آن نداشت. ولی نگهداری طولانی‌مدت (هفتهٔ ۲۱) در دمای ۷۰- درجهٔ سیلسیوس 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 حادتر است و به تخریب سریع‌تر آنزیم‌ها منجر می‌شود. براساس نتایج تحقیق حاضر، مناسب‌ترین دما برای نگهداری مایع شکمبه برای طولانی‌مدت، ۱۹۶- درجهٔ سیلسیوس (نیتروژن مایع) است.

جدول ۶. فعالیت ویژهٔ سلولاز در شرایط مختلف نگهداری شیرابهٔ شکمبه

روش نگهداری	مدت زمان نگهداری					
	هفتهٔ اول	هفتهٔ دوم	هفتهٔ سوم	هفتهٔ چهارم	هفتهٔ ششم	هفتهٔ بیست‌ویکم
شاهد	۱۰/۱۱۷^{a} ± ۰/۶۶۶	۱۰/۱۱۷ ^{a} ± ۰/۶۶۶	۱۰/۱۱۷^{a} ± ۰/۶۶۶	۱۰/۱۱۷^{a} ± ۰/۶۶۶	۱۰/۱۱۷^{a} ± ۰/۶۶۶	۱۰/۱۱۷^{a} ± ۰/۶۶۶
نیتروژن مایع	۱۰/۹۲۶^{a} ± ۰/۵۵۰	۹/۵۱۹^{a} ± ۰/۵۱۵	۱۰/۵۲۸^{a} ± ۰/۳۲۳	۱۰/۱۷۲^{a} ± ۰/۲۸۲	۹/۷۰۳^{a} ± ۰/۴۰۶	۹/۷۸۰^{a} ± ۰/۴۷۸
۷۰- درجهٔ سیلسیوس	۱۰/۶۰۵^{a} ± ۰/۴۳۰	۹/۹۵۲^{a} ± ۰/۶۲۵	۱۰/۴۲۰^{a} ± ۰/۵۰۵	۱۰/۸۱۵^{a} ± ۰/۳۶۴	۹/۷۴۶^{a} ± ۰/۹۳۴	۶/۷۴۳^{b} ± ۰/۱۷۶
۲۰- درجهٔ سیلسیوس	۹/۶۱۱^{a} ± ۰/۴۵۶	۹/۱۰۶^{b} ± ۰/۲۴۶	۸/۶۰۰^{b} ± ۰/۵۵۴	۸/۹۴۰^{b} ± ۰/۴۳۵	-	-

b،a تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنادار است (P <۰/۰۵).

شاهد: مشخصات مربوط به نمونهٔ اولیهٔ مایع شکمبه است.

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- درجهٔ سیلسیوس، نمونه‌ها تا هفتهٔ 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- درجهٔ سیلسیوس فقط به مدت یک هفته مناسب است و از هفتهٔ 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 شکمبهٔ دام‌های کشتار شده مناسب است. همچنین، نگهداری نمونه‌ها حاوی آنزیم در نیتروژن مایع، ۷۰- و ۲۰- درجهٔ سیلسیوس 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.

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 Academai 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*

casei by cell disruption in microfluidizer. Biotechnology Techniques. 11(7): 451-453.

13. Cumming R and Iceton 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 *Alkalophilic Cephalosporium sp. strain rym-202*. Applied and Enviromental Microbiology, 62(9): 3480-3482.

22. Kitts WD and Underkofler LA (1954) Digestion by rumen microorganisms. hydrolytic products of cellulose and the cellulolytie enzymes. Agricultural Food Chemistry, 2: 639-645

23. Koppolu A and Davis Clements L (2004) Ruminal 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 Enviromental 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.