



بررسی فعالیت آنزیم‌های سلولاز در مایع شکمبه بزغاله‌های پروراری کشتار شده

صفورا شهروان^۱ و تقی قورچی^۲

۱- دانشجوی دکتری تغذیه دام، دانشکده علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استاد دانشکده علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسوول: ghoorchit@yahoo.com)
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۲۱ صفحه: ۹ تا ۱۷

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی فعالیت آنزیم‌های شکمبه‌ای کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز (نانومول در دقیقه) از بخش‌های مختلف شیرابه شکمبه شامل بخش وابسته به ذرات، خارج سلولی و درون سلولی بود. برای این منظور از مایع شکمبه ۱۵ رأس بزغاله‌های پروراری نجدی کشتار شده در سن ۶ ماهگی با میانگین وزن ۲۸ کیلوگرم در ۳ تیمار و ۵ تکرار نمونه برداری شد. تیمارهای آزمایشی شامل سطوح صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد تفاله زیتون جایگزین دانه جو بود. نتایج نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیمی برای هر دو آنزیم در بخش وابسته به ذرات مربوط به بزغاله‌های تغذیه شده با جیره ۲۰ درصد تفاله زیتون بود ($P < 0/05$). همچنین بیشترین فعالیت کل آنزیم‌های میکروکریستالین سلولاز و کربوکسی متیل سلولاز در شکمبه بزغاله‌های تغذیه شده با جیره ۲۰ درصد تفاله زیتون (نانومول در دقیقه) نسبت به تیمارهای دیگر مشاهده شد ($P < 0/0001$). میزان فعالیت کربوکسی متیل سلولاز در بخش جامد، خارج سلولی، درون سلولی و کل شیرابه شکمبه نسبت به فعالیت آنزیم میکروکریستالین سلولاز در بخش‌های مربوطه بیشتر بود. pH مایع شکمبه بزغاله‌های با افزایش سطوح تفاله زیتون در جیره کاهش معنی داری یافت ($P < 0/0001$). کمترین pH در بزغاله‌های تغذیه شده با ۲۰ درصد تفاله زیتون نسبت به سایر تیمارها دیده شد. در مجموع، نتایج آزمایش نشان داد با افزایش سطح تفاله زیتون در جیره، فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک در هر سه بخش محتویات شکمبه افزایش یافت. فعالیت آنزیم‌ها در بخش وابسته به ذرات شیرابه شکمبه در تمام تیمارها بیشترین و بخش خارج سلولی کمترین بود ($P < 0/05$).

واژه‌های کلیدی: کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز، آنزیم، بزغاله‌های کشتار شده، تفاله زیتون

مقدمه

میکروکریستالین سلولاز به قسمت انتهایی آزاد زنجیره حمله نموده و طی مراحل متوالی سلویوز تولید می‌نماید (۱۲). سیلوا و همکاران (۳۵) نیز گزارش کردند که کربوکسی متیل سلولاز می‌تواند به‌عنوان شاخصی از جمعیت کل کلونی شده روی ذرات خوراک استفاده شود و نیز می‌تواند برای ارزیابی تفاوت محیط شکمبه که بر تجزیه‌پذیری لیاف تأثیر می‌گذارد به کار رود؛ بنابراین اندازه‌گیری فعالیت کربوکسی متیل سلولاز باکتری‌های چسبیده به ذرات خوراک در شکمبه احتمالاً روش مناسبی برای تخمین میزان تجمع نسبی باکتری‌های سلولولیتیک روی ذرات علوفه نیز محسوب شود. تفاله زیتون حاوی ۰/۵ تا ۱ درصد تانن است. نشخوارکنندگانی که به‌طور مداوم با جیره‌های غنی از تانن تغذیه می‌شوند، معمولاً دارای جمعیت میکروبی توسعه یافته‌ای در شکمبه هستند که این جمعیت میکروبی قادر به تحمل سطوح بالای تانن است (۳۹). پژوهشگران (۳۱) نشان دادند که تانن‌ها فعالیت آنزیم‌های باکتری‌های تجزیه‌کننده پروتئین و سلولز را تغییر می‌دهند، اما توجه به این مسأله مهم است که لزوماً اتصال تانن‌ها به آنزیم‌ها مانع فعالیت آن‌ها نمی‌شود (۲۲). وینا و همکاران (۴۳) مشاهده کردند که فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و زایلاناز در بزهای تغذیه شده با ساپونین نسبت به شاهد اختلاف معنی داری وجود نداشت اما در گوسفند فعالیت این دو آنزیم کاهش ۵۰ درصدی در تیمارهای با سطوح بالاتر ساپونین نسبت به شاهد داشت. وانگ و وانگ (۴۲) دریافتند که استفاده از عصاره‌های گیاهی در جیره بزها باعث بالا بردن فعالیت آنزیم‌های هضم‌کننده سلولولیتیک به‌خصوص میکروکریستالین و کربوکسی متیل سلولاز شد. با تحقیقی که

قسمت عمده خوراک نشخوارکنندگان را دیواره سلول گیاهی تشکیل می‌دهد و این حیوانات برای دستیابی و استفاده از ترکیبات دیواره سلولی، متکی به میکروارگانیسم‌های (باکتری‌ها، پروتوزوا و قارچ‌ها) ساکن در شکمبه خود هستند. میکروب‌ها از طریق آنزیم‌هایشان نقش مهمی در فرآیند هضم دارند (۴۰). استحصال آنزیم‌های میکروبی از شیرابه شکمبه، نخستین بار در سال ۱۹۵۴ گزارش شد (۱۸). عصاره‌ای از محتویات شکمبه جدا شد که دارای خصوصیات آنزیم‌های هضم کننده لیاف بود (۱۱۶). آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیاف شامل فعالیت کل سلولاز، کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز، می‌باشد. فعالیت این آنزیم‌ها در سه بخش مجزا از محتویات شکمبه شامل ذرات ریز^۱ (میکروب‌های متصل به بخش ذرات شکمبه)، بخش درون سلولی^۲ (سلول‌هایی که به‌صورت آزادانه در بخش مایع از مایع شکمبه معلق هستند) و بخش خارج سلولی^۳ (آنزیم‌های موجود در بخش مایع) اندازه‌گیری می‌شوند. در بین این سه بخش بیشترین فعالیت هیدرولیتیکی آنزیم‌ها مربوط به بخش میکروب‌های متصل به ذرات ریز، پس از آن آنزیم‌های درون سلولی و در نهایت آنزیم‌های خارج سلولی بود (۲). اندوگلوکاناز (کربوکسی متیل سلولاز) توسط باکتری‌های سلولولیتیک اصلی شکمبه که تصور می‌شود تجزیه سلولز را آغاز می‌کنند، تولید می‌شود. این آنزیم‌ها با باکتری‌های سلولولیتیک در ارتباط هستند (۱۳). آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز بر روی بخش میانی زنجیر سلولز اثر نموده و از طریق هیدرولیز آنرا قطع کرده و تولید دوزنجیره کوتاه‌تر می‌کند. اما

درون سلولی (باکتری‌ها، قارچ‌ها و پروتوزوآ)، خارج سلولی (میکروب‌های شناور و آزاد در مایع شکمبه) و آنزیم‌های ترشح‌شده از میکروب‌های متصل به ذرات استخراج و فعالیت آن‌ها اندازه‌گیری شد.

جمع‌آوری مایع شکمبه

به‌منظور تخمین فعالیت آنزیمی، نمونه‌های مایع شکمبه از سه گروه بزغاله کشتار شده با سن 6 ماه گرفته شد. گروه اول بزغاله‌های تغذیه‌شده با جیره‌ای بدون تفاله زیتون (گروه شاهد، وزن کشتار 27/10 کیلوگرم)، گروه دوم بزغاله‌های تغذیه‌شده با جیره‌ای حاوی 10 درصد تفاله زیتون (وزن کشتار 30/22 کیلوگرم) و گروه سوم بزغاله‌های تغذیه‌شده با جیره‌ای حاوی 20 درصد تفاله زیتون (وزن کشتار 26/74 کیلوگرم). نمونه نهایی برای تفکیک آنزیم‌های موجود در بخش‌های مایع شکمبه (شامل درون‌سلولی، خارج سلولی و مرتبط با ذرات) در یک فلاکس گرم فوراً به آزمایشگاه منتقل شد.

استخراج آنزیم‌ها

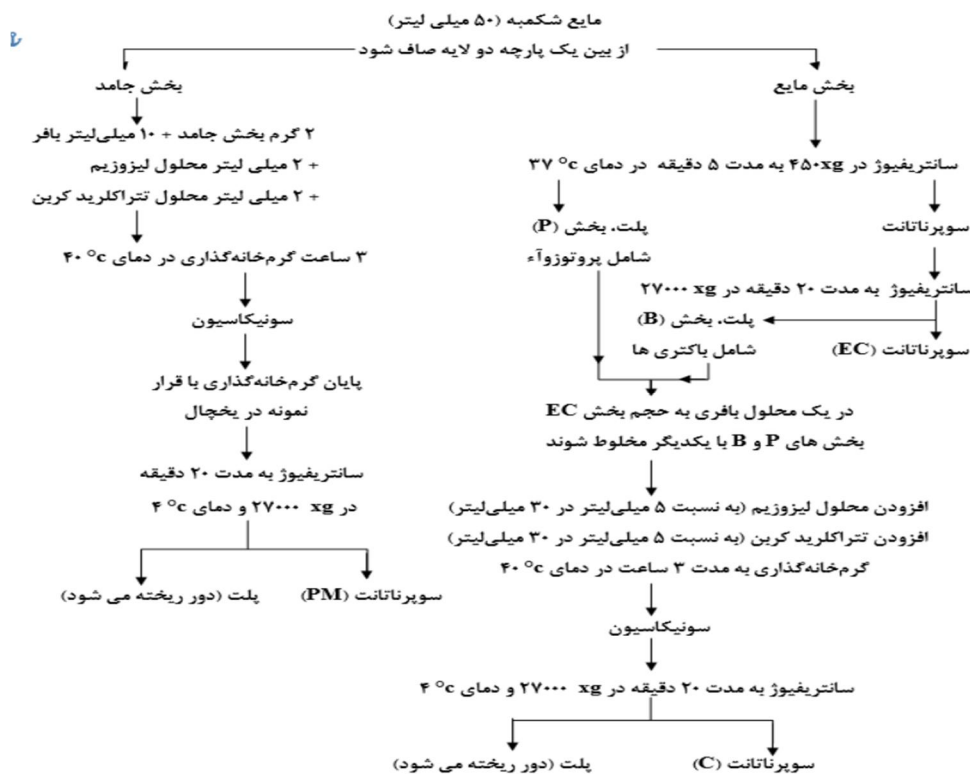
استخراج آنزیم‌ها از هر سه بخش مایع شکمبه با استفاده از تتراکلرید کربن، سونیکاسیون و آنزیم لیزوزیم (شرکت سیگما، CAS Number 12650-88-3) صورت گرفت. عمل لیزوزیم با سونیکاسیون در حمام یخ انجام شد (به‌مدت 6 دقیقه، با سرعت ضربان یا پالس 30 ضربه در ثانیه و فشار 0/5). طرح کلی استخراج آنزیم‌ها در شکل 1 آورده شده است (2).

وانگ و همکاران (41) بر روی بزهای در حال رشد انجام دادند مشاهده کردند که با افزایش سطوح سبوس برنج در جیره، فعالیت آنزیم‌های میکروکریستالین سلولاز و سلولاز کاهش یافت در حالیکه فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز افزایش داشت. آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز، در صنایع نساجی، صنایع تولید کاغذ و شوینده‌ها، صنایع غذایی، مدیریت ضایعات کشاورزی و صنایع خوراک دام به کار می‌روند. و به‌دلیل تنوع این آنزیم‌ها در محتویات شکمبه و قدرت آنزیمی آن‌ها، مورد توجه محققان قرار داشت (12). بز به عنوان یکی از منابع تامین کننده غذای انسان از ابتدای تمدن بشری مورد توجه قرار گرفته و انتشار و پراکندگی آن‌ها در سراسر دنیا دیده می‌شود (8، 17).

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر سطوح مختلف تفاله زیتون بر فعالیت آنزیم‌های سلولاز (آندوسلولاز و اگزوسلولاز) موجود در مایع شکمبه بزهای کشتار شده در کشتارگاه می‌باشد. در این زمینه تحقیقات خیلی کمی صورت گرفته است، به‌همین دلیل مطالعه مایع ناشناخته در شکمبه بزغاله‌های کشتار شده ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

روش اصلی در این آزمایش روند شرح داده‌شده توسط آگاروال و همکاران (2) است. در این روش آنزیم‌های مورد بررسی در سه بخش مجزا از مایع شکمبه شامل آنزیم‌های



شکل 1- بخش‌بندی مایع شکمبه و استخراج آنزیم‌های هیدرولیتیک، برگرفته از آگاروال (2) PM: میکروب‌های چسبیده به مواد خوراکی در شکمبه، EC: بخش خارج سلولی (مایع شکمبه)، C: بخش درون‌سلولی (میکروب‌های معلق در مایع شکمبه).

Figure 1. Fractionation of rumen contents and extraction of hydrolytic enzymes, Agarwal (2) PM: Particulate Material, EC: Extracellular, C: Cellul

فعالیت کربوکسی متیل سلولاز (اندو 1 و 4 بتا گلوکوزیداز، EC 3.3.1.4)

معرف‌ها

- 1) بافر فسفات 0/1 نرمال با pH= 6/8
- 2) کربوکسی متیل سلولاز 1 درصد
- 3) معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS)
- 4) محلول نمک راشل 40 درصد
- 5) محلول استاندارد 0/1 درصد گلوکز: 100 میلی گرم در 100 میلی لیتر آب مقطر حل شد.

روش کار

1) لوله (a) شاهد: 1 میلی لیتر بافر فسفات، 0/5 میلی لیتر نمونه و 0/5 میلی لیتر محلول کربوکسی متیل سلولاز در یک لوله آزمایشی ریخته و آن را کامل مخلوط کردیم. گرمخانه گذاری به مدت 1 ساعت در دمای 39 درجه سانتی گراد انجام شد. سپس با افزودن 3 میلی لیتر معرف DNS واکنش متوقف شد.

(a) لوله شاهد: 1 میلی لیتر بافر فسفات و 0/5 میلی لیتر نمونه در یک لوله به خوبی مخلوط گردد. 3 میلی لیتر معرف DNS² و سپس 0/5 میلی لیتر محلول کربوکسی متیل سلولاز اضافه شد (هدف از افزودن معرف DNS قبل از سوپسترا، جلوگیری از واکنش آنزیم‌های مایع شکمبه با سوپسترا است).

(b) لوله بلانک: 2 میلی لیتر آب مقطر و 3 میلی لیتر معرف DNS

(c) استاندارد: برای ترسیم منحنی استاندارد گلوکز، لوله‌هایی با دو تکرار طبق جدول 1 تهیه شد.

2) لوله‌ها به مدت 10 دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند.

3) به هر لوله 1 میلی لیتر محلول نمک راشل افزوده شد و لوله‌ها در دمای اتاق خنک شدند.

4) جذب نوری نمونه‌ها در مقابل بلانک در 575 نانومتر قرائت شد. نمونه‌ها با آب مقطر تا حجم 10 میلی لیتر رقیق شد.

5) منحنی پیمایش (کالیبراسیون) استانداردهای گلوکز ترسیم شد.

جدول 1- نحوه استانداردسازی برای قرائت گلوکز

شماره لوله	1	2	3	4	5	6	7	8	9
آب مقطر (ml)	2	1/75	1/50	1/25	1	0/75	0/50	0/25	0
محلول استاندارد گلوکز (ml)	0	0/25	0/50	0/75	1	1/25	1/50	1/75	2
غلظت گلوکز (g/l)	0	250	500	750	1000	1250	1500	1750	2000
معرف DNS (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3	3

نتایج و بحث

فعالیت آنزیم‌های سلولاز

فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک (کربوکسی متیل سلولاز، میکرو کریستالین سلولاز) در مایع شکمبه بخش‌های مختلف شکمبه بزغاله‌های مورد آزمایش (نانومول در دقیقه) به ترتیب در جداول 3 و 4 ارائه شده است. بیشترین میزان فعالیت آنزیمی برای هر دو آنزیم در بخش وابسته به ذرات در بزغاله‌های تغذیه شده با جیره 20 درصد تفاله زیتون مشاهده

محاسبات

اختلاف جذب نوری نمونه‌های مورد آزمایش از شاهد محاسبه شد:

تغییرات A = نمونه - شاهد

پس برای تعیین مقدار میکروگرم گلوکز آزاد شده طی گرمخانه گذاری، تغییرات A طبق منحنی غلظت گلوکز هر نمونه تعیین می شود:

$180 \times S \times T / (نانوگرم گلوکز) =$ فعالیت آنزیم (نانومول گلوکز / میلی لیتر / دقیقه)

در T: زمان گرمخانه گذاری (1 ساعت)، S: مقدار نمونه (0/5 میلی لیتر) و 180: وزن مولکولی گلوکز

فعالیت میکرو کریستالین سلولاز (اگزو 1 و 4 بتا گلوکوزیداز، EC 3.2.1.91)

میکرو کریستالین سلولاز همان آویسل است. روش محاسبه آنزیم‌های تجزیه کننده آویسل به جز چند تفاوت زیر شبیه آنزیم کربوکسی متیل سلولاز است:

1) آویسل 1 درصد

2) مخلوط مورد آزمایش: شامل 1 میلی لیتر محلول آویسل و 1 میلی لیتر مایع شکمبه است.

3) نمونه‌ها در دمای 39 درجه به مدت 1 ساعت گرمخانه گذاری شدند.

4) فعالیت آنزیمی نمونه‌ها برحسب نانومول در دقیقه در میلی لیتر قندهای آزاد شده (گلوکز) و به کمک منحنی استاندارد تعیین شد.

برای استاندارد سازی گلوکز از معادله زیر استفاده شد.

$$Y = 2.6287X - 0.009$$

Y: مقدار فعالیت آنزیم برحسب میلی گرم

X: اختلاف عدد تست و کنترل قرائت شده از اسپکتوفتومتر

$$R^2 = 0.9917$$

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS تجزیه واریانس شد. برای مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی از آزمون دانکن در سطح احتمال 95 درصد استفاده شد.

1- Incubation

2- DinitroSaliCylic Acid

کمترین بود ($P < 0/05$). فعالیت آنزیم‌های شکمبه منعکس‌کننده میکروبیایی می‌باشد که در هضم ذرات خوراکی دخیل هستند (32). تفاوت بین تیمارهای آزمایشی در مورد فعالیت آنزیم می‌تواند در نتیجه تغییر در جمعیت میکروبی با توجه به جیره ارائه شده به حیوانات و در نتیجه تغییر در پروفایل آنزیم‌ها باشد (2). دوستی و همکاران (7) جیره‌های مشابه را در بزغاله‌های پرواری استفاده و مشاهده کردند که فعالیت آنزیم میکروکریستالین سلولاز در بزغاله‌های پرواری زنده تغذیه‌شده با 10 درصد تفاله زیتون در بخش‌های کل، داخل سلولی، خارج سلولی و وابسته به ذرات به ترتیب 406/99، 134/72، 51/64 و 220/63 بود و در بزغاله‌های کشتار شده و تغذیه‌شده با 20 درصد تفاله زیتون به ترتیب 508/62، 165/71، 78/29 و 264/62 بود.

جدول 2- اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی مورد استفاده در بزغاله‌های پرواری (درصد از ماده خشک جیره)
 Table 2. Ingredients and chemical composition of the experimental diets used for fattening goat kids (% of diet dry matter)

جیره‌های آزمایشی (تفاله زیتون)			ترکیب مواد خوراکی
20 درصد	10 درصد	صفر درصد	
25	25	25	علوفه بونجه
30	40	50	دانه جو
20	10	0	تفاله زیتون
5/61	5/90	7/45	دانه ذرت
10/93	10/66	9/05	سبوس گندم
6	6	6	کنجاله سویا
0/50	0/50	0/50	جوش شیرین
0/50	0/50	0/50	نمک
0/50	0/50	0/50	مکمل ویتامینی و معدنی
1	1	1	کربنات کلسیم
(بر اساس NRC 1985) (28)			
90/09	89/30	89/14	ماده خشک
2/60	2/60	2/60	انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری در کیلوگرم ماده خشک)
14	14	14	پروتئین خام
4/11	3/33	2/54	عصاره اتری (Ether Extract)
5/70	5/57	5/38	خاکستر (Ash)
40/88	35/99	30/38	الیاف شوینده خنثی (NDF)
26/74	22/28	17/68	الیاف شوینده اسیدی (ADF)
35/32	41/11	47/50	کربوهیدرات غیرالیافی (NFC)
0/85	0/81	0/76	کلسیم
0/34	0/37	0/38	فسفر
75	75	75	کنسانتره
25	25	25	علوفه

همچنین فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز در پژوهش دوستی و همکاران (7) که روی بزغاله‌های پرواری انجام دادند در بزغاله‌های پرواری زنده تغذیه‌شده با 10 درصد تفاله زیتون در بخش‌های کل، داخل سلولی، خارج سلولی و وابسته به ذرات به ترتیب 148/83، 533/47، 323/28 و 626/99 بود و در بزغاله‌های پرواری زنده تغذیه‌شده با 20 درصد تفاله زیتون به ترتیب 2314/39، 738/02، 738/82 و 837/56 بود. در تحقیق ما فعالیت این آنزیم در بزغاله‌های کشتار شده و تغذیه‌شده با 10 درصد تفاله زیتون در همان بخش‌ها به ترتیب 474/18، 155/35، 77/57 و 241/25 بود و در بزغاله‌های کشتار شده و تغذیه‌شده با 20 درصد تفاله زیتون به ترتیب 574/18، 176/55، 96/75 و 305/08 بود. با مقایسه نتایج این دو تحقیق می‌توان به این نتیجه رسید که فعالیت هر دو آنزیم در هر چهار بخش در بزغاله‌های زنده نسبت به بزغاله‌های کشتار شده بیشتر است اما در هر دو آزمایش فعالیت آنزیم‌های میکروکریستالین سلولاز و کربوکسی متیل

سلولاز در بخش‌های جامد، خارج سلولی، درون سلولی و فعالیت کل آنزیم‌ها (شامل سه بخش) در بزغاله‌های تغذیه شده با جیره 20 درصد تفاله زیتون نسبت به دیگر تیمارها افزایش داشت که این نتایج با نتایج ما همخوانی دارد. قورچی و دوستی (13) گزارش کردند میزان کل فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستال سلولاز (به ترتیب از راست به چپ) در دام کشتار شده با فیستولایی در گستره 440 تا 185، 537 تا 311، وابسته به ذرات 60 تا 17، 268 تا 55، خارج سلولی 138 تا 56، 173 تا 84، داخل سلولی 245 تا 48، 249 تا 164 (نانومول در دقیقه) بوده است. گستره میزان فعالیت سه بخش آنزیم‌های به دست آمده از آنزیم‌های مورد بررسی در آزمایش ما بیشتر و متفاوت با میزان فعالیت آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز گزارش شده توسط قورچی و دوستی (13) است. این تفاوت می‌تواند ناشی از نوع خوراک، محل نگهداری و مدیریت متفاوت باشد. به عبارت دیگر نوع جیره تغذیه‌شده حیوانات،

بخش‌های مربوطه در آنزیم میکروکریستالین سلولاز بیشتر بود. این نتایج با نتایج دوستی و همکاران (7) و میرمحمدی (26) موافق اما با نتایج فورچی و دوستی (13) مخالف است. همچنین تاریخا و همکاران (38) بیشترین فعالیت کربوکسی متیل سلولاز و سلولاز کاغذ صافی جدا شده از شکمه بز گزارش کردند. اما جیریایی و همکاران (15) تفاوتی برای آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز در بین تیمارهای آزمایش مشاهده نکردند. آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز بر روی بخش میانی زنجیر سلولز اثر نموده و با 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 می‌کند (12). کربوکسی متیل سلولاز در تجزیه سلولزهای بی‌نظم و میکروکریستالین سلولاز در تجزیه سلولزهای بانظم درگیر است (3,32). بنابراین، افزایش فعالیت کربوکسی متیل سلولاز نسبت به میکروکریستالین سلولاز احتمالاً به‌خاطر وجود سوبسترای بیشتر برای آن باشد. سیلوا و همکاران (35) گزارش کردند که کربوکسی متیل سلولاز به‌عنوان شاخص کل جمعیت کلونیزاسیون ذرات خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرد و می‌تواند برای ارزیابی تغییرات محیط شکمبه‌ای که بر تجزیه الیاف در شکمبه تاثیر می‌گذارند، استفاده شود.

در این پژوهش نسبت به سایر پژوهش‌ها دامنه فعالیت آنزیم‌ها بیشتر بود. ترکیب شیمیایی تفاله زیتون مورد استفاده در این تحقیق با پروتئین 11/66، NDF 49/70 و کل ترکیبات فنلی 3/73 بود (7). افزودن منابع متفاوت انرژی‌زا می‌تواند بر قابلیت تجزیه‌پذیری فیبر تاثیر داشته باشد (33) و این مطلب می‌تواند تا حد زیادی به‌دلیل تاثیر بر میزان فعالیت آنزیم‌های شکمبه‌ای دخیل در هضم فیبر باشد. با توجه به اینکه تفاله زیتون دارای فیبر، NDF، ADF و تانن بالا است (27,37) و بر طبق بعضی گزارش‌ها، جیره حاوی فیبر بالا سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های سلولازی (کربوکسی متیل سلولاز و میکروکریستالین سلولاز) می‌شوند (36)، اما در مقابل تانن‌ها می‌توانند هضم الیاف را با تشکیل کمپلکس با لیگنوسولوز و کاهش اتصال آن‌ها با میکروارگانیسم‌ها و یا مهار مستقیم میکروارگانیسم‌ها کاهش دهند (23). با توجه به نتایج به‌دست آمده وجود فیبر در تفاله از جمله عوامل احتمالی افزایش دهنده آنزیم‌های سلولولیتیک است. همچنین سطح بالای فیبر در جیره نشخوارکنندگان ممکن است فرایند کلونیزاسیون را تحریک کند و از این‌رو، آنزیم‌های تجزیه‌کننده سلولز در شکمبه به بیشترین مقدار خود بعد از 2 ساعت خوراک خوردن می‌رسند (2). پژوهشگران بیان کردند که در صورت عادت کردن دام به‌مصرف این نوع خوراکی، سازکارهایی در آن‌ها شکل می‌گیرد که سبب کاهش آثار منفی ترکیبات ضد تغذیه‌ای آن‌ها خواهد شد (1).

سبب تغییر جمعیت میکروبی و متعاقب آن تغییر در الگوی آنزیمی شده است (16). مطابق با نتایج این تحقیق، عزیزی و همکاران (4) نیز بیشترین میزان فعالیت آنزیمی را برای بخش جامد (وابسته به ذرات) و کمترین میزان فعالیت را برای بخش خارج سلولی گزارش کردند. میزان فعالیت کل به‌دست آمده از آنزیم‌های مورد بررسی در این آزمایش از لحاظ عددی کمی متفاوت با میزان فعالیت کل گزارش شده توسط میرمحمدی (26) است که فعالیت کل در آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز، میکروکریستالین سلولاز را به‌ترتیب در دامنه 282-524 و 143-203 نانومول گلوکز آزاد شده در هر دقیقه گزارش نمودند. مشخص شده‌است که تعداد بیشتر میکروب‌های وابسته به بخش جامد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های فیبرولیتیک شده و عمدتاً در هضم فیبر دخیل هستند (5,32). همان‌گونه که ملاحظه شد، میزان فعالیت آنزیم‌های میکروبی در بخش جامد (وابسته به ذرات) شیرابه شکمبه در مورد همه آنزیم‌های بررسی شده به‌مراتب بیشتر از دو بخش دیگر یعنی بخش خارج سلولی و بخش درون سلولی بود (جدول 3 و 4). همچنین، کمترین میزان فعالیت آنزیمی مربوط به بخش خارج سلولی شیرابه شکمبه بود. بیشتر بودن فعالیت آنزیمی در بخش جامد شیرابه شکمبه به دلیل کلونیزه شدن ذرات خوراک توسط میکروب‌هاست. علت فعالیت آنزیمی کمتر در بخش سلولی شیرابه شکمبه این است که میکروب‌های سلولولیتیک به ذرات خوراکی متصل شده‌اند و در نتیجه جمعیت میکروب‌های آزاد در بخش مایع بسیار کمتر می‌شود (2,32). حداقل غلظت آنزیم‌های تجزیه‌کننده الیاف در بخش خارج سلولی شیرابه شکمبه قابل انتظار بود، زیرا این آنزیم‌ها به پوشش سلولی متصل‌اند و تنها مقدار کمی از آن‌ها به‌دلیل تخریب یا تجزیه مکانیکی میکروب‌های تجزیه‌کننده الیاف به بخش مایع سلولی آزاد می‌شود (2). میناتو و همکاران (25) نشان دادند که 50-70 درصد میکروب‌های شکمبه با ذرات خوراک همراه، و 75 درصد از باکتری‌های تجزیه‌کننده فیبر، چسبیده به ذرات خوراک هستند. در آزمایشی که منافی رائی و همکاران (21) انجام دادند فعالیت آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز در نمونه‌های گرفته‌شده از دام‌های کشتار شده را به‌ترتیب 0/573 و 1/025 واحد بر لیتر گزارش کردند. در پژوهش اربابی (3) گستره فعالیت کل آنزیم میکروکریستالین سلولاز از 26/48-59/14 و کربوکسی متیل سلولاز از 323-549 در سطوح مختلف کنسانتره به علوفه مشاهده شد. که میزان دامنه فعالیت کل آنزیم کربوکسی متیل سلولاز تقریباً مشابه به نتایج تحقیق حاضر است. همچنین اربابی (3) نشان داد که به دنبال افزایش مقدار مواد متراکم و سهل‌الهضم در جیره کاهش معنی‌داری در فعالیت کل آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز و فعالیت کاغذ صافی مشاهده شد. میزان فعالیت کربوکسی متیل سلولاز در بخش جامد، خارج سلولی، درون سلولی و کل شیرابه شکمبه نسبت به

جدول 3- تاثیر سطوح مختلف تفاله زیتون بر فعالیت آنزیم میکرو کریستالین سلولاز (نانومول در دقیقه) در مایع شکمبه بزغاله‌های کشتار شده
Table 3. Effect of olive cake diets on microcrystalline cellulose enzyme activity (nmol min) in rumen fluid of slaughtered goat kids

جیره‌های آزمایشی					
P-value	SEM	حاوی 20 درصد تفاله زیتون	حاوی 10 درصد تفاله زیتون	شاهد	آنزیم‌ها
0/0001	5/037	165/71 ^a	134/72 ^b	118/18 ^c	داخل سلولی
0/0105	4/858	78/29 ^a	51/64 ^b	35/26 ^c	خارج سلولی
0/0081	10/881	264/62 ^a	220/63 ^b	167/80 ^c	وابسته به ذرات
0/0001	19/318	508/62 ^a	406/99 ^b	321/25 ^c	کل فعالیت

a-c میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0/05).

جدول 4- تاثیر سطوح مختلف تفاله زیتون بر فعالیت آنزیم کربوکسی متیل سلولاز (نانومول در دقیقه) در مایع شکمبه بزغاله‌های کشتار شده
Table 4. Effect of olive cake diets on carboxymethyl cellulose enzyme activity (nmol min) in rumen fluid of slaughtered goat kids

جیره‌های آزمایشی					
P-value	SEM	حاوی 20 درصد تفاله زیتون	حاوی 10 درصد تفاله زیتون	شاهد	آنزیم‌ها
0/0001	5/878	176/55 ^a	153/35 ^b	119/55 ^c	داخل سلولی
0/0001	5/097	96/75 ^a	77/57 ^b	47/46 ^c	خارج سلولی
0/0039	9/989	305/08 ^a	241/25 ^b	219/26 ^b	وابسته به ذرات
0/0001	19/721	574/18 ^a	474/18 ^b	386/27 ^c	کل فعالیت

کاهش جمعیت پروتوزوایی در شکمبه می‌باشد و روغن موجود در تفاله زیتون هیچ‌گونه تأثیری بر pH نداشت. کاهش pH اثر نامطلوبی بر باکتری‌های سلولولیتیک می‌گذارد. حیوانات نشخوارکننده نیازمند باکتری‌های سلولولیتیک جهت هضم الیاف می‌باشند، اما در pH پایین، رشد آن‌ها بر سلوبیوز محدود می‌شود (29,9). اما در این آزمایش pH شکمبه در محدوده طبیعی خود قرار داشت. به‌طور کلی نشخوارکنندگان قادرند pH شکمبه را با تنظیم مقدار خوراک مصرفی، تولید بافر از طریق بزاق، تطابق‌پذیری میکروارگانیسم‌ها و جذب اسیدهای چرب فرار از دیواره شکمبه در محدوده فیزیولوژیکی تنظیم نمایند (1). در مجموع، نتایج این آزمایش نشان‌داد با افزایش سطح تفاله زیتون در جیره، فعالیت آنزیم‌های سلولولیتیک در هر سه بخش محتویات شکمبه افزایش یافت. بخش وابسته به ذرات شیرابه شکمبه در تمام تیمارها بیشترین و بخش خارج سلولی کمترین بود. هم‌چنین میزان فعالیت کربوکسی متیل سلولاز در بخش جامد، خارج سلولی، درون سلولی و کل شیرابه شکمبه نسبت به فعالیت آنزیم میکرو کریستالین سلولاز در بخش‌های مربوطه بیشتر بود.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از حوزه معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جهت تأمین اعتبارات مالی بی نهایت تشکر و سپاسگزاری به‌عمل می‌آید.

pH مایع شکمبه

مقادیر pH شکمبه در جدول 5 نشان داده شده است. مقدار pH شکمبه بزغاله‌ها با افزایش سطوح تفاله زیتون در جیره کاهش معنی‌داری یافت (P<0/05). pH در بزغاله‌های تغذیه شده با 20 درصد تفاله زیتون نسبت به سایر تیمارها کمتر بود. البته این کاهش مقادیر pH از لحاظ بیولوژیک در دامنه طبیعی pH شکمبه (6/5-6/1) قرار داشت (22). نتایج پژوهش حاضر مطابق با نتایج دوستی و همکاران (7) روی بزغاله‌های پرواری است که کمترین مقدار pH را برای بزغاله‌های تغذیه‌شده با 20 درصد تفاله زیتون گزارش کردند. اما شینگفیلد و همکاران (34) افزایش pH را با استفاده از مخلوط منابع روغن و چربی گزارش نمودند که این یافته‌ها برخلاف نتایج ما بود. این پژوهشگران گزارش کردند که این افزایش در pH ممکن است به‌علت تأثیر روغن بر کاهش خوراک مصرفی و کاهش قابلیت هضم فیبر باشد، بنابراین از کاهش pH جلوگیری می‌کنند. مومن و همکاران (28) گزارش کردند که جیره شاهد نسبت به جیره حاوی تفاله زیتون سبب افزایش pH گردید. تانن pH شکمبه را کاهش می‌دهد و هم‌چنین سبب کاهش تعداد پروتوزوا می‌شود (24,14,44). کاهش جمعیت پروتوزواها در بره‌ها و بزغاله‌های مصرف‌کننده خوراک حاوی تانن احتمالاً در کاهش pH شکمبه نقش دارد (44). با توجه به اینکه تفاله زیتون حاوی تانن است، کاهش pH در شکمبه بزغاله‌های تغذیه‌شده با 20 درصد تفاله زیتون نسبت به سایر تیمارها قابل انتظار بود. پس می‌توان گفت که احتمالاً کاهش pH یا به‌علت وجود تانن در تفاله زیتون و یا

منابع

1. Acamovic, T. and C.S. Stewart. 2000. Plant phenolic compounds and gastrointestinal micro-organism. In: Brooker, J.D. (Ed.), Tannins in Livestock and Human Nutrition. In: Proceedings of an International workshop held in Adelaide, Australia, 31 May-2 June 1999. Australia Center for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra, Australia, 92: 127-129
2. Agarwal, N., I. Agarwal, D.N. Kamra and L.C. Chaudhary. 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.
3. Arbabi, S. 2013. Effect of forage ratios on bean-based concentrates on fermentation, cellulase enzyme activity and ruminal bacterial population of sheep. Ph.D. Thesis, Gorgan University, Gorgan, Iran. 241 pp (In Persian).
4. Azizi Sotorkhoft, A., A. Safifi, D. Mirmohamadi, J. Rezaei, A. Kiani and H. Fazaeli. 2014. Effect of energy source on some hydrolytic enzymes activities in different fractions of rumen liquor and N retention in sheep fed diet containing heat-processed broiler litter. *Journal of Research in Ruminants*, 2: 1-16 (In Persian).
5. Cheng, K.J. and T.A. McAllister. 1997. Comport mentation in the rumen. In *The rumen microbial ecosystem*. In: Hobson, P.N and C.S. Stewart (eds), Chapman and Hall, London, 492-522.
6. Doi, R.H., A. Kosugi, K. Murashima, Y. Tamaru and S.O. Han. 2003. Cellulosomes from Mesophilic Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 185(20): 5907-5914.
7. Dousti, F., T. Ghoorchi, B. Dastar and A. Azarfar. 2017. Effect of olive cake on performance, rumen characteristics, fibrolytic enzyme and microbial protein synthesis in Najdi goat kids. *Animal production research*, 6(1): 13-25 (In Persian).
8. Ehsani, M., M.M. Sharifi Hosseini, H. Sadeghi Panah, O. Dayani and M. Asadi Foozi. 2017. The effect of slow-release mineral supplements and eCG injection on twining, birth weight and weaning weigh to fluffy raeini goats. *Research on Animal Production*, 8(15): 76-83.
9. Enemark, J.M.D. 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis. *Veterinary Journal*, 176: 32-43.
10. Eryavuz, A. and B.A. Dehority. 2004. Effect of *Yucca schidigera* extract on the concentration of rumen microorganisms in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 117: 215-222.
11. Festenstein, G.N. 1957. Cellulolytic enzymes from sheep-rumen liquor microorganisms. *Biochemical Journal*, 69(4): 562-567.
12. Ghoorchi, T., B. Ghorbani. 2011. *Ruminal microbiology*. Publication Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 169 pp.
13. Ghoorchi, T., F. Dousti. 2015. Study of cellulase enzymes activities in rumen fluid of slaughtered fattening lambs. Research report, Gorgan University, Gorgan, Iran, 33 pp (In Persian).
14. Hervás, G., F. PilarFrutos, R. JavierGiráldez Ángel, C. Mantecón María and P. ÁlvarezDel. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109: 65-78.
15. Jiriaei, F., M. Kazemi-Bonchari, M.H. Moradi and D. Mirmohamadi. Effect of starch source in diets contained corn steep liquor on performance, blood metabolites, and ruminal enzymes activities of fattening lambs. *Research in ruminants*, 5(1): 151-168 (In Persian).
16. Kamra, D.N., N. Agarwal and T.A. McAllister. 2010. Screening for compounds enhancing fiber degradation. In: Vercoe, P. E., H.P.S. Makkar, A.C. Schlink (eds.), *In vitro* Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, 85-107.
17. Karami, M. 2018. Effect of diets with different levels of metabolizable energy on physical and chemical carcass characteristic of male kids. *Research On Animal Production*, 9(22): 83-91.
18. Kitts, W.D. and L.A. Underkofler. 1954. Digestion by rumen microorganisms. Hydrolytic products of cellulose and the cellulolytic enzymes. *Agricultural Food Chemistry*, 2: 639-645.
19. Krause, M.K. and G.R. Otzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 126: 215-236.
20. Makkar, H.P.S., A.O. Aderibigbe and K. Becker. 1998. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chemistry*, 62: 207-215.
21. Manafi Rasi, H., M. Chamani and S. Afshar. 2014. Comparison of methods for dehiscence, concentration and maintenance of digestive enzymes of plant fibers from rumen content of sheep. *Animal Production*, 16(2): 167-178 (In Persian).
22. McDonald, P., R.A. Edwards, J.F.D. Greenhalgh, C.A. Morgan, L.A. Sinclair and R.G. Wilkinson. 2011. *Animal Nutrition*. 7th ed., Longman Group UK, Harlow, UK, 693 pp.
23. McSweeney, C.S., B. Palmer, R. Bunch and D.O. Krause. 2001. Effect of the tropical forage *Calliandra* on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 78-88.

24. Min, B.R., G.T. Attwood, K. Reilly, W. Sun, J.S. Peters, T.N. Barry and W.C. McNabb. 2002. Lotus corniculatus condensed tannins decrease in vivo populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 911-921.
25. Minato, H., A. Endo, M. Higuchi, Y. Ootomo and T. Uemura. 1966. Ecological treatise on the rumen fermentation. 1. The fractionation of bacteria attached to the rumen digesta solids. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 12: 39-53.
26. Mirmohamadi, D. 2013. Effect of physical form of feed in broiler chickens without broiler diets on yield of lambs. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, 120 pp (In Persian).
27. Molina Alcaide, E., D.R. Yañez Ruiz, A. Moumen and I. Martín García. 2003. Chemical composition and nitrogen availability for goats and sheep of some olive by-products. *Small Ruminant Research*, 49: 329-336.
28. Moumen, A., D.R. Yanez Ruiz, I. Martín-García and E. Molina Alcaide. 2007. Fermentation characteristics and microbial growth promoted by diets including two-phase olive cake in continuous fermenters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92: 9-17.
29. Nagaraja, T.G and E.C. Titgemeyer. 2007. Ruminant acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science*, 90: 17-38.
30. NRC. 1985. Nutrient Requirements of Small Ruminants. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
31. O'Donovan, L. and J.D. Brooker. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiol*, 147: 1025-1033.
32. Raghuvansi, S.K., R. Prasad, M.K. Tripathi, A.S. Mishra, O.H. Chaturvedi, A.K. Mishra, B.L. Saraswat and R.C. Jakhmola. 2007. Effect of complete feed blocks or grazing and supplementation of lambs on performance, nutrient utilisation, rumen fermentation and rumen microbial enzymes. *An international of animal bioscience*, 1: 221-226.
33. Russell, J.B., J.D.O. Connor, D.G. Fox., P.J. Van Sose and C.J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. Ruminant fermentation. *Journal of Animal Science*, 70: 351-356.
34. Shingfield, K.J., S. Ahvenjarvi, V. Toivonen, A. Arola, K.V.V. Nurmela, P. Huhtanen and J.M. Griinari. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Journal of Animal Science*, 77: 165-179.
35. Silva, A.T., R.J. Wallace and E.R. arskov. 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.
36. Sirohi, S.k., P.K. Choudhury, S.S. Dagar, A.K. Puniya and D. Singh. 2013. Isolation, characterization and fibre degradation potential of anaerobic rumen fungi from cattle. *Annals of Microbiology*, 63: 1187-1194.
37. Teimouri Yansari, A., H. Sadeghi, Z. Ansari Pirsarai and H. Mohammad Zadeh. 2007. Ruminant dry matter and nutrient degradability of different olive cake by-products after incubation in the rumen using Nylon bag technique. *International Journal of Agricultural and Biological*, 9: 439-442.
38. Thareja, A., A.K. Puniya, G. Goel, R. Nakgpal, J.P. Sehgal, P.K. Singh and K. Singh. 2006. In vitro degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants. *Archives. Anim. Nutrition*, 60(5): 412-417.
39. Vaithiyanaatha, S., R. Bhatta, A.S. Mishra, R. Prasad, D.L. Verma and N.P. Singh. 2007. Effect of feeding graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on rumen ciliate protozoa, nitrogen balance and microbial protein supply in lambs and kids. *Animal Feed Science and Technology*, 133: 177-191.
40. Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2 ed. Comstock Publ. Assoc., Ithaca, NY.
41. Wang, M., X.G. Zhao, Z.L. Tan, S.X. Tang, C.S. Zhou, Z.H. Sun, X.F. Han, and C.W. Wang. 2010. Effects of Increasing Level of Dietary Rice Straw on Chewing Activity, Ruminant Fermentation and Fibrolytic Enzyme Activity in Growing Goats. *Asian- Australasian. Journal of Animal Science*, 23(8): 1022-1027.
42. Wang, S.P and W.J. Wang. 2016. Effects of dietary supplementation of Chinese herb medicine mixture on rumen fermentation, nutrient digestion and blood profile in goats. *South African Journal of Animal Science*, 46: 247-260.
43. Wina, E., S. Muetzel and K. Becker. 2005. The dynamics of major fibrolytic microbes and enzyme activity in the rumen in response to short- and long-term feeding of *Sapindus rarak* saponins. *Journal Applied Microbiology*, 100: 114-122.
44. Yanez Ruiz, D.R., A. Moumen, A.I. Martin Garcia and E. Molina Alaide. 2004. Ruminant fermentation and degradation patterns, protozoa population and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two stage olive cake: effect of PEG supply. *Journal of Animal Science*, 82: 2023-2032.

Study of Cellulase Enzymes Activity in Rumen Fluid of Fattening Slaughtered Goat Kids

Safoura Shahravan¹ and Taghi Ghoorchi²

1- Ph.D Student, Department of Animal Nutrition, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources

2- Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources

(Corresponding author: Ghoorchit@yahoo.com)

Received: October 27, 2018 Accepted: November 12, 2019

Abstract

An experiment was conducted to investigate the activity of carboxymethylcellulase and microcrystalline-cellulase (Nonomol/min) ruminal hydrolytic enzymes from different fractions of particulate material, extra cellular or cellular. For this purpose, 15 rumen fluids of slaughtered fattening Najdi goat kids at the age of 6 months with an average of 28 kg were sampled in 3 treatments and 5 replicates. The experimental diets included 0, 10, 20 percent olive cake was replaced by barley. The results showed that the highest enzyme activity for both enzymes was in the fractions of particulate material in the goat kids fed diet was 20 percent olive cake ($P < 0.05$). Also, the highest total activity of microcrystalline cellulase and carboxymethyl cellulase enzymes was observed in the goats fed with 20% olive cake (nmol / min) compared with other treatments ($P < 0.0001$). Moreover, carboxymethyl-cellulase in particulate material, cellular, extra cellular and total activity were higher than microcrystalline-cellulase. The ruminal pH of goats decreased significantly with the increase in the olive cake in the diet ($P < 0.0001$). The lowest PH in goat kids fed with 20% olive cake was seen compared to other treatments. Overall, the results of this study showed that with increasing levels of olive cake in the diet, the activity of cellulolytic enzymes increased in all three fraction of the rumen contents. The activity of enzymes in particulate material fraction was the highest in all treatments and the extracellular fractions were lowest ($P < 0.05$).

Keywords: Carboxymethyl-Cellulase, Microcrystalline-Cellulase, Enzymes, Slaughtered Goat Kids, Olive Cake