Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال نهم- شماره دوم - تابستان ۱۳۸۱
www.magiran.com.jasnr

تولید آنزیم زایلاناز بر روی ده نوع خوراک توسط قارچهای بی‌هوازی شکمبه

تقی قورچی[۱]، شعبان رحیمی[۱]، محمد رضائیان [۲] و غلامرضا قربانی[۳]

[۱] دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس؛ [۲] دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران؛ [۳] دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ دریافت:۸۰/۷/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۰/۱۱/۲۰

چکیده

برای بررسی توان قارچهای بی‌هوازی شکمبه در تولید آنزیم زایلاناز از مواد خوراکی نظیرکاه گندم، کاه‌برنج ، کاه‌جو ، کاه گندم + اوره، کاه گندم + ملاس، یونجه، سبوس‌گندم، کنجاله پنبه دانه، باگاس و ذرت سیلو شده برای کشت قارچهای بی‌هوازی جدا شده از شکمبه گوسفند نژاد شال، استفاده گردید. قارچها به مدت ۰، ۳، ٦ و ۹ روز برروی مواد خوراکی مذکور کشت داده شدند و تغییرات حاصله از نظر فعالیت آنزیم زایلاناز اندازه‌گیری شد. نتایج‌نشان داد که قارچهای بی‌هوازی شکمبه بر روی کل مواد خوراکی مورد مطالعه رشد نمودند. در مدت ۹ روز کشت قارچ برروی انواع خوراکهای مورد استفاده فعالیت آنزیم زایلاناز از ٤/۹۷ تا ١٤/۷۸ واحد آنزیمی متغیر بود که به‌ترتیب کمترین مقدار در کاه‌جو و بیشترین مقدار در سبوس گندم اندازه‌گیری‌شد. در اکثر خوراکها مقدار تولید آنزیم تا روزششم روند صعودی داشته و بعداز این مدت روند با سرعت کم ادامه داشت. داده‌ها و اطلاعات حاصله بیانگر توانایی‌قارچهای شکمبه گوسفند در تولید آنزیم زایلاناز در انواع خوراکها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: قارچهای بی‌هوازی، زایلاناز، گوسفند، تولید آنزیم.

مقدمه

محدودیت منابع خوراک دام در ایران، مهمترین عامل محدود کننده توسعه دامپروری کشور محسوب می‌شود، لذا شناخت روشهای مختلف که باعث استفاده بهینه از مواد خشبی در تغذیه دام به‌منظور کسب حداکثر بازده بیولوژیکی‌در تولیدات دامی می‌گردند، امری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد.

اُرپین (۱۸) اولین بار ثابت کرد که بعضی از میکروارگانیسمهای موجود در شکمبه، برخلاف عقیده محققان قبلی که تصور می‌کردند جزء تک یاخته‌های تاژکدار می‌باشند، در حقیقت زئوسپور

www.SID.ir

Archive of SID

قارچهای بی‌هوازی هستند.

قارچهای بی‌هوازی در همه نشخوارکنندگان وجود دارند و چرخه زندگی آنها دو مرحله‌ای است. مرحله متحرک دارای زئوسپور بوده و مرحله رویشی با اتصال زئوسپور قارچ به ذرات گیاهی داخل شکمبه شروع و تا تولید وآزاد شدن زئوسپورهای جدید از اسپورانژیوم ادامه می‌یابد (۱۵، ۱۹و ۲۱).

توانایی قارچها در مصرف ملکولهای بزرگ نهایتاً به توانایی قارچ در هضم آنها بستگی دارد و این خود بسته به‌توانایی قارچ در تولید آنزیمهای مورد نیاز برای هضم است. قارچها اصولاً آنزیمهای زیادی تولید می‌کنند، اما بسیاری‌از این آنزیمها ممکن است فعالیتی نداشته یا اینکه، زمینه تماس بر روی سوبسترا را نداشته باشند (۱۰). فعالیت‌آنزیم در قارچهای بی‌هوازی شکمبه هم در زئوسپور و هم در مراحل رویشی چرخه زندگی به صورت داخل‌سلولی و خارج سلولی وجود دارد (۱۷). قارچهای بی‌هوازی شکمبه آنزیمهایی مانند سلولاز، زایلاناز، آمیلاز،پروتئاز، پکتیناز و پاراکوماریل استراز تولید می‌کنند (۱۹).

تجزیه همی‌سلولز از طریق فعالیت آنزیمهای گلیکونازهای داخلی و خارجی انجام می‌شود و عمده زنجیره‌های این‌پلی ساکاریدها از حالت سری خارج شده و به حالت محلول در می‌آید. گروههای استخلافی و زنجیره جانبی از پلی‌ساکاریدهای همی‌سلولزی برداشته شده و از طریق فعالیت‌های تعدادی از گلیکوزیدازها تجزیه می‌شود (۱۸). اخیراً تولید و کاربرد زایلان رایج شده، زیرا زایلاناز نقش مهمی را در تبدیل زیستی همی‌سلولز به قندهای مربوطه دارد (٤).

گاواندە و کامت (۱۰) گزارش نمودند که سبوس‌گندم در مقایسه با باگاس و کاه برنج به‌عنوان سوبسترا بهترین تولیدزایلاناز را داشته است و فعالیت آنزیم زایلاناز (U/ml) سبوس گندم (۲٦/۷ - ۲۱/۲)، باگاس (۱۸-۲/۵) و کاه برنج(۱۱/۸-۱۰/۵) می‌باشد.

گوردن و فیلیپس (۱۲) نیز گزارش کردند که دامنه فعالیت آنزیم زایلاناز حاصل از قارچهای بی‌هوازی بر روی چهارسوبسترای گلوکز، سلوبیوز، سلولز و کاه از ۵۸۰ تا ۷۱۰۰ (/ nmol min/ml) می‌باشد. بورنمان و همکاران (۸) تولیدآنزیم زایلاناز را توسط قارچهای بی‌هوازی شکمبه حداکثر ۲ (U/ml) بدست آوردند. اکین و بورمان (۵) فعالیت‌آنزیم زایلاناز را از سویه‌های مختلف قارچ ٤/۵۱ تا ۲۰/۱٦ (U/ml) بدست آوردند. لو و همکاران (۱۷) فعالیت‌آنزیم زایلاناز قارچهای بی‌هوازی شکمبه را از ٦، ٤/۹ و ۲ (U/ml) به‌ترتیب برای کاه گندم، هولوسلولز کاه گندم وسلولز بدست آوردند. از زمانیکه قارچهای شکمبه کشف شده‌اند تحقیقات مختلفی در زمینه اکولوژی و فعالیت‌های‌بیوشیمیایی و بیولوژیک صورت گرفته(۳)، ولی هنوز نقش و سهم آنها در فرآیند هضم از طریق تولید آنزیم برروی سوبستراهای مختلف شناخته نشده است. هدف از این آزمایش بررسی تولید آنزیم بر روی یونجه، سبوس گندم،کنجاله پنبه دانه، باگاس، ذرت سیلوشده، کاه گندم کاه گندم + اوره، کاه گندم + ملاس، کاه برنج و کاه‌جو می‌باشد.

مواد و روشها

دراین پژوهش از گوسفند نر نژاد شال استفاده گردید. در طول مدت آزمایش حیوان در قفس متابولیکی انفرادی نگهداری شد. فیستول گذاری با روشهای معمول صورت گرفت (۳، ۲۰). جیره روزانه حیوان یونجه (۱۱۰۰ گرم) وجو (۲۰۰ گرم) بود. تجزیه ترکیبات شیمیایی خوراک طبق روش پیشنهادشده AOAC (۳، ٦) تعیین‌گردید. جهت جداسازی قارچهای بی‌هوازی، نمونه‌برداری از محتویات شکمبه صورت گرفت و از این نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

به عنوان منبع قارچ جهت تلقیح به محیط کشت استفاده شد. محیط کشت قارچهای بی‌هوازی از اجزاء ذیل تشکیل شده بود:

محلول نمکی شماره ۱، محلول نمکی شماره ۲، مایع صاف شده شکمبه (سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه در دور g × ۱۰۰۰)، عصاره مخمر، پپتون تریپتیکاز، بی‌کربنات سدیم، محلول ریزازورین، ال- سیستین هیدروکلراید. محیط‌کشت کاملا بی‌هوازی بوده و در این تحقیق جهت حذف اکسیژن از محیط کشت، به مدت دو ساعت از گاز اسیدکربنیک استفاده شد. مقدار ۸۰ سی‌سی از محیط کشت همراه با ۱/۲ گرم از خوراکهای مورد آزمایش را در ظروف شیشه‌ای در بسته ریخته و جهت استریل از اتوکلاو با فشار ۱۵ اتمسفر و حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه)استفاده شد (۱۶، ۲۱). حال به این محیط استریل شده مقدار ۲-۱ سی‌سی نمونه گرفته شده از محتویات شکمبه تلقیح و به مدت ٤٨ ساعت در انکوباتور ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. در طول مدت نگهداری در انکوباتور، قارچها در محیط‌کشت رشد می‌نمودند و رشد آنها با مشاهده مستقیم میکروسکوپی تأییدگردید. از قارچهای جدا شده به عنوان منبع، جهت رشد در محیطهای کشت با سوبسترای مختلف استفاده گردید.

خوراکهای مورد استفاده شامل: یونجه، سبوس گندم، کنجاله پنبه دانه، باگاس، ذرت سیلو شده، کاه گندم، کاه گندم+ اوره، کاه گندم + ملاس، کاه جو، کاه برنج به تعداد ۳ تکرار تهیه و برای مدت ۰، ۳، ٦ و ۹ روز کشت داده شد.

تعیین فعالیت آنزیم زایلاناز

تهیه مواد:۱ - محلول بافرسیترات - فسفات: مقدار ۸/۷ گرم فسفات پتاسیم و ۲/۵ گرم اسید سیتریک را با یک لیتر آب‌مقطر مخلوط نموده به‌طوریکه مواد کاملاً در آب مقطر حل گردند و pH محیط بایستی به ٦/۵ رسانده شود.

۲- محلول سوبسترا: جهت تهیه محلول زایلان ۲٪، مقدار ۲ گرم زایلان و ۱۰۰ میلی‌لیتر بافرسیترات- فسفات‌استفاده گردید که این محلول جهت استفاده به رقت یک دهم رسانده شد (۹۰ میلی‌لیتر بافر سیترات- فسفات و۱۰ میلی‌لیتر محلول زایلان ۲٪).

۳ - تهیه محلول دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNSA) اولیه: مقدار ۵ گرم DNSA، یک گرم فنل و ۵ گرم هیدروکسید سدیم در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل‌گردید.

٤- محلول سدیم فسفات ۵٪ : یک گرم Na_2So_4در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد.

۵- محلول گلوکز ۵٪ : یک گرم گلوکز در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل‌گردید.

٦- تهیه محلول دی نیترو سالیسیلیک اسید ثانویه: ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم فسفات و ۲۰ میکرولیتر محلول گلوکز با ۵۰ میلی‌لیتر محلول DNSA اولیه کاملاً مخلوط شد.

۷- تهیه محلول استاندارد (گلوکز): یک میلی گرم گلوکز در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید (۲۱).

روش انجام کار:۱ - بعد از کشت قارچ بر روی سوبسترا مقداری از مایع رویی محیط کشت را برداشته و بعد از سانتریفوژ کردن (g × ۳۰۰۰ برای مدت ۱۵ دقیقه) در فریزر در حرارت ۲۰- درجه برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نگهداری گردید و در مواقع‌اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد.

۲- مقدار ٥٤٠ میکرولیتر از محلول سوبسترا را داخل میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و مقدار ۹۰ میکرولیتراز مایع رویی نمونه کشت که

www.SID.ir

Archive of SID

سانتریفوژ شده بود، به آن اضافه گردید.
۳ – میکروتیوپها در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند.
٤– بعد از ۳۰ دقیقه میکروتیوپها را از بن‌ماری برداشته و به آن ۷۲۰ میکرولیتر DNSA ثانویه اضافه و جهت‌تکمیل واکنش‌ها اضافه گردید.
۵ – میکروتیوپها در حمام آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه جهت رنگ گرفتن قرار گرفتند.
٦ – بعد از ۲۰ دقیقه میکروتیوپها از حمام آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد خارج و به سرعت در ٤– درجه حرارت‌سرد شدند.
۷ – جذب هر نمونه در طول موج ۵۷۰ نانومتر (nm) توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (Jenway,LTD,Felstted , 6100)قرائت شد (۲۰).

نمودار استاندارد: برقراری رابطه بین جذب و غلظت از نمودار استاندارد استفاده شد.
۱– محلول گلوکز یک میلی گرم در میلی‌لیتر را به مقادیر ۰، ۳٦، ۷۲، ۱۰۸، ۱٤٤و ۱۸۰ میکرولیتر داخل‌میکروتیوپ اضافه نموده و توسط بافرسیترات – فسفات آن حجم را به ۷۲۰ میکرولیتر می‌رسانیم. با اضافه نمودن DNSA، حجم کلی ۱٤٤۰ میکرولیتر شد.
۲ – جذب هر کدام از نمونه‌ها واستانداردها توسط دستگاه اسپکتوفتومتری ودر طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.
۳ – پس‌از قرائت جذب استاندارد گلوکز مقادیرغلظت گلوکز محاسبه شدو یک نمودارخطی با معادله زیر بدست آمد (۲۱).

$$Y= a+ bx$$

محاسبه:غلظت قندهای احیا شده در نمونه‌های کشت شده توسط رگرسیون خطی و از نمودار استاندارد بدست آمد.سپس فعالیت‌های زایلاناز نمونه‌ها از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{زایلاناز (U)} = (G \times DF)/ 30$$

G = مقدار گلوکز ارزیابی شده در هر نمونه (μ mol)
DF = فاکتور رقت
۳۰ = زمان انکوباسیون (دقیقه)
U (واحد آنزیمی)= مقدار آنزیم مورد نیاز برای تولید یک میکرومول گلوکز یا زایلان در یک دقیقه در میلی‌لیتر(۲۱).

ثبت و ذخیره اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از برنامه رایانه‌ای اکسل (Excel) صورت گرفت. رسم کلیه نمودارها نیز از طریق این برنامه انجام شد. اطلاعات جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS با کاربرد مدل آماری طرح کاملا تصادفی در سه تکرار مورد تجزیه آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج

در این پژوهش جهت تلقیح قارچ در محیط کشت از محتویات شکمبه نمونه برداشته و در زیر میکروسکوپ نوری، نمونه از نظر وجود یا عدم وجود قارچ مورد بررسی قرارگرفت (شکلهای ۱ و ۲). قارچهای بی‌هوازی شکمبه بر روی‌تمامی سوبستراهای مورد آزمایش شامل: کاه‌گندم، کاه گندم + اوره (یک درصد اوره)، کاه گندم + ملاس (پنج درصدملاس)، کاه جو، کاه برنج، یونجه، باگاس، سیلوی ذرت، کنجاله پنبه دانه و سبوس‌گندم رشد نمودند.

نتایج مندرج در جدول شماره ۲، ترکیبات شیمیایی سوبستراهای مورد آزمایش را نشان می‌دهد. به استناد جدول‌شماره ۲، بیشترین مقدار پروتئین خام را کنجاله پنبه‌دانه در بین خوراک‌های

www.SID.ir

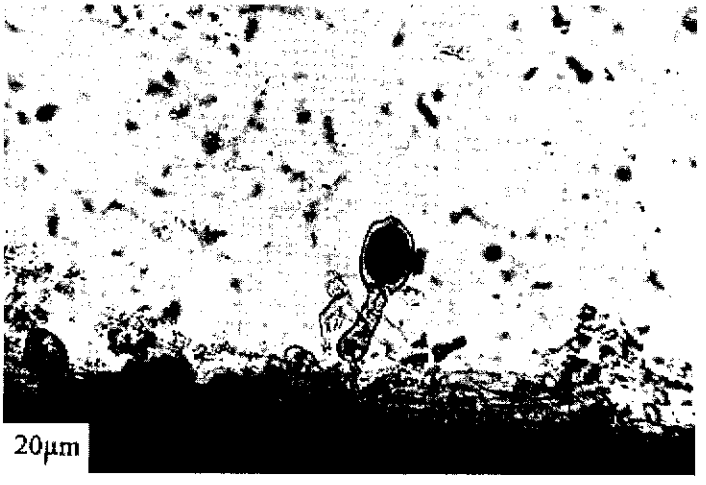
Archive of SID

جدول ۱- مقادیر استفاده شده از مواد مختلف جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم زایلاناز.

نام استاندارد	۰	۱	۲	۳	٤	٥	نمونه ۱
محلول زایلان	٥٤٠	٥٤٠	٥٤٠	٥٤٠	٥٤٠	٥٤٠	٥٤٠
محلول گلوکز (۱mg/ml)	۰	٣٦	٧٢	١٠٨	١٤٤	١٨٠	–
بافر سیترات – فسفات	١٨٠	١٤٤	١٠٨	٧٢	٣٦	۰	٩٠
نمونه کشت	–	–	–	–	–	–	٩٠
کل	٧٢٠	٧٢٠	٧٢٠	٧٢٠	٧٢٠	٧٢٠	٧٢٠

۱- واحد برحسب میکرولیتر

شکل ۱- اسپورانژیوم همراه با اسپورانژیوفور قارچهای بی‌هوازی شکمبه در محیط کشت حاوی کاه‌جو.



شکل ۲- اسپورانژیوم همراه با اسپورانژیوفور قارچهای بی‌هوازی شکمبه در محیط کشت حاوی کاه برنج.

www.SID.ir

Archive of SID

مورد آزمایش دارا بوده، میزان چربی درخوراکهای مورد آزمایش از ۰/٤٪ تا ۵/۹٪ که به ترتیب کمترین مقدار مربوط به باگاس و بیشترین مقدار متعلق به‌کنجاله پنبه‌دانه می‌باشد (جدول شماره ۲). میانگین مقدار لیگنین، همی‌سلولز و سلولز در کاه‌گندم، کاه گندم + ملاس و کاه گندم + اوره یکسان است (جدول ۲). بیشترین لیگنین در این آزمایش مربوط به کنجاله پنبه دانه(۱۳/۸٪) و کاه جو (۱۱٪) می‌باشد.

بیشترین مقدار همی‌سلولز را در این تحقیق سبوس‌گندم دارا بود و کمترین مقدار همی‌سلولز متعلق به یونجه بود. کمترین مقدار NDF و ADF را به‌ترتیب یونجه و سبوس‌گندم در بین خوراکهای مورد آزمایش دارا بودند (جدول‌شماره ۲).

فعالیت آنزیم زایلاناز: دامنه فعالیت آنزیم زایلاناز در مدت ۳ روز کشت قارچ از ۱/۵۸ تا ٤/۹٤ واحد آنزیمی بود که کمترین‌مقدار مربوط به ذرت سیلوشده و بیشترین مقدار متعلق به سبوس‌گندم بود (جدول ۳). در مدت مذکورسبوس گندم با سایر خوراکها از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت آنزیم زایلاناز در مدت ٦ روز را سبوس‌گندم و کمترین مقدار را کاه گندم دارا بودند (جدول ۳).

کاه گندم + اوره و کاه گندم + ملاس از نظر میزان فعالیت آنزیم زایلاناز در مدت ۳، ٦ و ۹ روز کشت قارچ بیشترین مقدار را نسبت به کاه‌های دیگر غلات دارا بود (جدول ۳). فعالیت آنزیم زایلاناز در اکثر خوراکهای‌مورد مطالعه تا مدت ٦ روز کشت روند افزایشی داشت (شکلهای ۳ و ٤). کمترین مقدار فعالیت آنزیم زایلاناز در مدت ۹ روز کشت قارچ متعلق به سوبسترای کاه جو (٤/۹۷ واحد آنزیمی) بود و بیشترین فعالیت آنزیم زایلاناز در مدت مذکور را سبوس‌گندم (۱٤/۷۸ واحد آنزیمی) دارا بود (جدول ۳). در مدت ۹ روزسبوس‌گندم با سایر خوراکها از نظر تولید آنزیم زایلاناز اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). کاه گندم،کاه گندم + اوره و کاه‌گندم + ملاس از نظر میزان فعالیت آنزیم زایلاناز در مدت ۹ روز کشت اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵). همچنین در مدت ۹ روز کشت از نظر میزان فعالیت آنزیم زایلاناز باگاس،ذرت سیلو شده، کنجاله پنبه دانه و یونجه نیز از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند (P >۰/۰۵).

بحث

نتایج مندرج در جدول شماره ۳ و شکلهای ۳ و ٤ بیانگر تولید آنزیم زایلاناز توسط قارچهای بی‌هوازی شکمبه‌در مدت ۳، ٦ و ۹ روز کشت می‌باشد. گزارشات محققان نشان‌دهنده فعالیت آنزیمی بالای زایلاناز توسط قارچهای بی‌هوازی شکمبه است (۱۸، ۱۹).

قارچهای بی‌هوازی شکمبه نسبت به خوراکهای دیگر دارای فعالیت بالای آنزیم زایلاناز بر روی سبوس‌گندم بودند (P <۰/۰۵). سینق و همکاران (۲۳) گزارش کردند که اختلاف معنی‌دار در تولید آنزیم زایلاناز به‌خاطر تنوع در منابع کربن و همچنین سادگی متابولیسم قندها در بعضی از خوراکها، موجب تولید سطوح بالای آنزیم زایلاناز شده‌است.

تعدادی از سوبستراهای خانواده گرامینه مانند سبوس گندم دارای آرابینو زایلان هستند که اینها فعالیت آنزیمی‌بیشتری نسبت به گلوکوروزایلان دارند (۲۳،۲۲). در این آزمایش نیز خانواده غلات کاه گندم + ملاس، کاه گندم، کاه گندم+ اوره و کاه برنج نسبت به بقیه خوراکها فعالیت آنزیمی زایلاناز بیشتری دارند (جدول ۳). فقط کاه جو فعالیت آنزیمی کمتری نسبت به بقیه خوراکها داشت. در این رابطه نیز محققان بیان داشتند که

www.SID.ir

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی ده نوع خوراک، برا ساس ۱۰۰٪ ماده خشک.

ماده خوراکی	پروتئین خام	چربی	دیواره سلولی (NDF)	دیواره سلولی بدون همی سلولز (ADF)	لیگنین (ADL)	همی‌سلولز	سلولز
کاه گندم	۶/۱۴ ±۰/۵	۱/۲ ±۰/۰۶	۷۰/۷±۳/۰۶	۴۹/۵±۱/۹	۱۰/۱± ۰/۹	۲۱/۲± ۱/۹	۳۹/۴± ۱/۵
کاه گندم + ملاس	۶/۸۲±۰/۴	۱/۳ ±۰/۰۹	۷۰/۷ ±۳/۰۶	۴۹/۵ ± ۱/۹	۱۰/۱ ±۰/۹	۲۱/۲ ±۱/۹	۳۹/۴±۱/۵
کاه گندم + اوره	۸/۹۵±۰/۵	۱/۲ ±۰/۰۵	۷۰/۷ ± ۳ /۰۶	۴۹/۵ ±۱/۹	۱۰/۱± ۰/۹	۲۱/۲±۱/۹	۳۹/۴±۱/۵
کاه جو	۲/۹±۰/۱	۱/۰ ±۰/۰۵	۷۵/۸ ± ۲/۵	۴۴/۴ ±۱/۲	۱۱/۰ ±۰/۸	۳۱/۵± ۲/۸	۳۳/۴± ۲/۱
کاه برنج	۳/۷±۰/۳	۰/۷ ۰±/۰۳	۶۹/۲ ±۱/۸	۴۹/۹ ±۲/۲	۶/۰ ±۰/۳	۱۹/۳± ۱/۲	۴۳/۹± ۲/۳
یونجه	۲۱/۳± ۲/۴	۱/۱ ±۰/۰۲	۳۳/±۹ ۱/۷	۲۵/۲± ۱/۶	۵/۳+ ۰/۲	۸/۶± ۰/۶	۱۹/۹±۱/۲
سبوس گندم	۱۴/۸± ۱/۲	۲/۹ ± /۳۳	۴۹/۷ ±۳/۲	۱۷/۳ ±۰/۷	۴/۲ ±۰/۲	۳۲/±۴ ۱/۶	۱۳/۱± ۱/۱
کنجاله پنبه دانه	۲۸/۶± ۲/۴	۵/۹± ۰/۷	۵۵/۲ ± ۳/۸	۳۶/۴±۲/۱	۱۳/۸ ±۰/۱	۱۸/۸± ۱/۲	۲۲/۷±۲/۵
سیلوی ذرت	۷/۰±۰ ۰/۶	۱/۴ ±۰/۰۴	۵۰/۱ ±۱/۷	۳۴/۹±۱/۲	۳/۷±۰/۱	۱۵/۲ ±۰/۹	۳۱/۲± ۲/۱
باگاس	۶/۳±۰/۴	۰/۴ ±۰/۰۱	۶۲/۸ ±۱/۶	۴۴/۶±۲/۷	۱۰/۳ ±۰/۴	۱۸/۳±۱/۱	۴۳/۳⊥ ۱/۲

۱- هرعدد، میانگین سه تکرار است.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- میزان فعالیت آنزیم زایلاناز در مدت ۳، ٦ و ۹ روز پس از رشد قارچهای بی‌هوازی شکمبه برروی انواع خوراکهای مورد استفاده.

ماده خوراکی	فعالیت آنزیم زایلاناز (واحد آنزیمی) ۳ روز	٦روز	۹روز
کاه گندم	۲/۲۹±۰/٤ bc	٤/۲۷±۰/۳ d	۱۰/۲۷±۲/۲ bc
کاه گندم +ملاس	۲/۰۸±۰/۸ c	۸/۹٤±۰/۱ b	۱۱/۱۱±۱/۳ b
کاه گندم + اوره	٤/۲۳±۱/۱ b	۸/٦٦±۲/۷ b	۱۰/۹۳±۱/۷ bc
کاه جو	۲/٦۰±۰/۷ bc	٤/۳۷±۰/٤ d	٤/۹۷±۰/۸ f
کاه برنج	۳/۲٤±۰/۲ bc	۷/۵۱±۰/۳ bc	۹/٦±۱/۰ dc
یونجه	۲/۵۵±۰/۵ bc	۵/۰۲±۱/٤ d	٦/۰۲±۰/۵ e
سبوس گندم	٤/۹٤±۱/۰a	۱۱/٦۷±۰/۸ a	۱٤/۷۸±۱/۹a
کنجاله پنبه دانه	۳/۸۰±۰/۲ bc	۵/۸۰±۱/۲ d	۵/۹±۰/۷ fe
سیلوی ذرت	۱/۵۸±۰/۳ b	۵/۷۷±۱/۰ dc	٦/۸۷±۱/۹ e
باگاس	۳/۰٤±۰/۵ bc	۳۲±۰۳/٦٦ d	۵/۸۹±۰/۷ fe

۱- هر عدد، میانگین سه عدد تکرار است.

۲- در هر ستون اعدادی که دارای حروف مشابه نیستند در سطح کمتر از ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

این فرضیه همیشه صدق نمی‌کند و مشخص شده که سطح زایلاناز در پولاف که از خانواده گرامینه می‌باشد سطح نبوده است (۲۳).

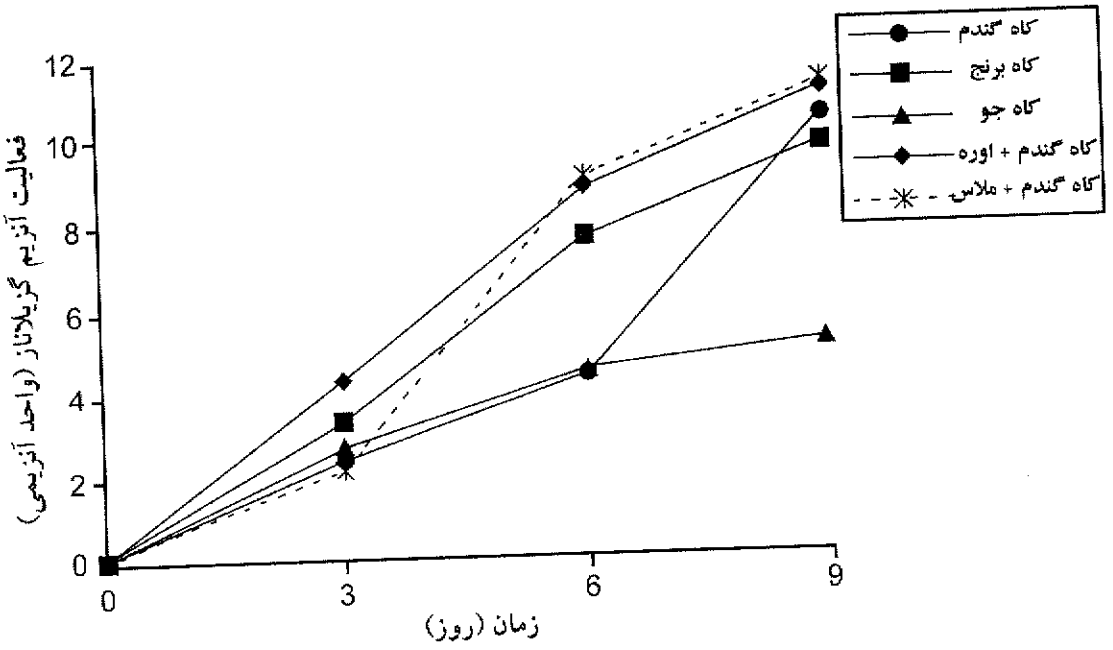
فعالیت آنزیمی زایلاناز بر روی سوبسترای کاه گندم + ملاس بیشتر از کاه‌گندم بود ولی اختلاف معنی‌داری درمدت ۹ روز کشت نداشت (جدول ۳). مواد سوبسترای متابولیسمی آماده مانند گلوکز، فروکتوز و ساکاروز فعالیت آنزیمی بالایی را موجب می‌شوند (۳). همچنین فعالیت آنزیمی زایلاناز بر روی کاه گندم + اوره به طور جزئی بالاتر از کاه‌گندم بود ولی اختلاف معنی‌داری در مدت ۹ روز کشت نداشت (جدول ۳). احتمالا به‌خاطر تأمین ازت توسط اوره برای قارچهای شکمبه جهت رشد و تجزیه بیشتر می‌باشد. گزارش شده است که سطح بالایی از فعالیت آنزیمی زایلاناز وقتی که بر روی عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده شد، مشاهده گردید (۱۹).

محققان گزارش نمودند که همبستگی مثبت بین تجزیه همی‌سلولز و آنزیم زایلاناز بیانگر نقش معنی‌دار تجزیه همی سلولز توسط زایلاناز می‌باشد. از آنجاییکه به نظر می‌رسد ارتباط بین همی‌سلولز و لیگنین نزدیک است، .فعالیت بالاتر آنزیم زایلاناز ممکن است مزیت مهمی در تجزیه دیواره سلولی لیگنینی شده داشته باشد. مقدار لیگنین‌در کاه‌جو نسبت به خوراکهای دیگر بالاتر بود و جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که کمترین فعالیت آنزیم زایلاناز مربوط به این خوراک می‌باشد. این نتیجه بیانگر این است که لیگنین یک عامل منفی و بازدارنده جهت هضم و تجزیه همی‌سلولز و در نتیجه کمی فعالیت آنزیم زایلاناز است (۳، ۵، ۱۸).

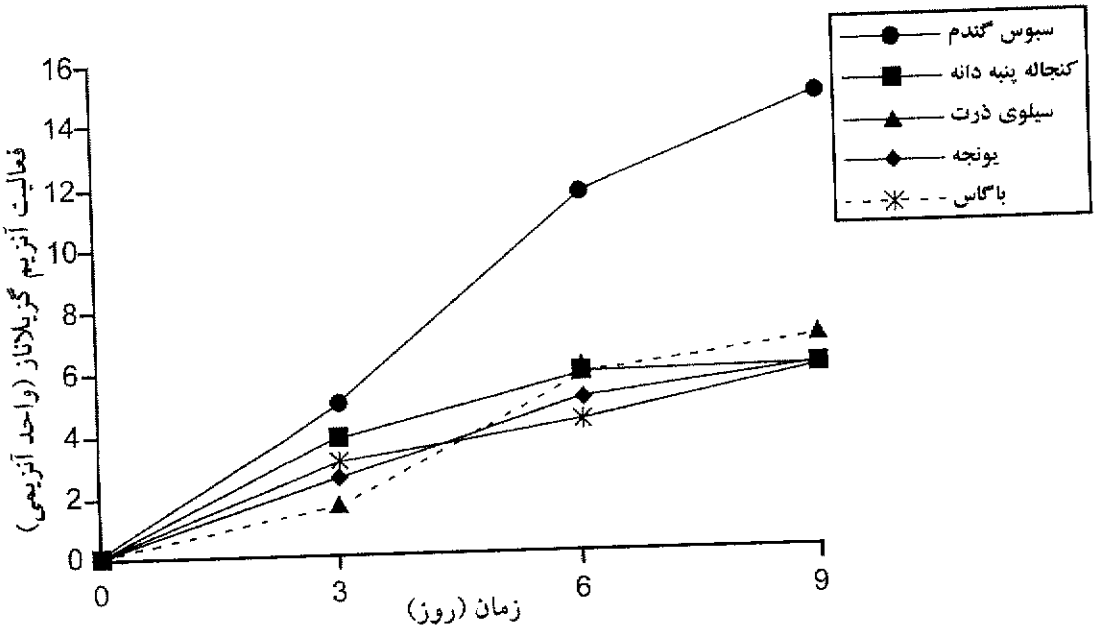
با توجه به جدول شماره ۳ و شکلهای ۳ و ٤ مشخص می‌گردد که فعالیت آنزیمی قارچها بر روی سوبستراهای مختلف با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند ($P < ۰/۰۵$). دراین زمینه برخی محققان گزارش کرده‌اند که فاکتورهای ذاتی‌مختلفی بر روی تجزیه زایلان و تولید آنزیم زایلاناز تأثیر می‌گذارند که مهمترین آنها فاکتورهای ذاتی مواد علوفه‌ای ازجمله چگونگی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳ـ میزان فعالیت آنزیم زایلاناز در طول مدت ۹ روز پس از رشد قارچهای بی‌هوازی شکمبه گوسفند بر روی انواع کاه غلات.



شکل ۴ ـ میزان فعالیت آنزیم زایلاناز در طول مدت ۹ روز پس از رشد قارچهای بی‌هوازی شکمبه گوسفند بر روی پنج نوع خوراک دام.

www.SID.ir

Archive of SID

ارتباط زایلان- سلولز، ارتباط زایلان- لیگنین و زایلان- استیل می‌باشد. این تنوع ممکن است حتی‌در قسمتهای مختلف گیاه و مرحله رشد گیاه وجود داشته باشد. مهمترین فاکتورهایی که در این رابطه تأثیر دارند، باندلیگنین با زایلان می‌باشد (۱٤، ۲۰).

مقدار فعالیت آنزیم زایلاناز کنجاله پنبه‌دانه در مدت ۹ روز نسبت به خوراک دیگر کمتر است (۵/۹ واحدآنزیمی). احتمالاً کمی فعالیت آنزیم زایلاناز به خاطر وجود لیگنین بالای کنجاله پنبه دانه می‌باشد (جدول ۲). که‌دسترسی همی‌سلولز را برای قارچ مشکل می‌سازد. همچنین کنجاله پنبه دانه دارای گوسیپول بوده که احتمالاً باعث کمی تجزیه همی‌سلولز و در نتیجه باعث کمی تولید آنزیم زایلاناز می‌شود (۲، ٤، ۱۰، ۱۳، ۲۰).

آنزیمهای سلولاز و همی‌سلولاز باعث تجزیه سلولز و همی‌سلولز شده در نتیجه اسیدهای چرب فرار،دی‌اکسیدکربن و متان در محیط کشت تولید می‌شود که منجر به کاهش pH محیط کشت می‌گردد (۳). فعالیت آنزیم زایلاناز را در pHهای مختلف گزارش نموده‌اند (۸، ۲۱). دامنه فعالیت آنزیم زایلاناز در این آزمایش در pH بین٤/۹ تا ٦/۹٦ بود. برخی محققان گزارش کرده‌اند که طیف فعالیت آنزیم زایلاناز در pH بین ٤ تا ۸ می‌باشد (۱۰، ۱۲،۲٤).

فعالیت آنزیم زایلاناز قارچهای بی‌هوازی شکمبه بر روی سوبسترای یونجه پایین می‌باشد. در این رابطه می‌توان‌گفت که احتمالاً این کاهش فعالیت به خاطر مقدار کم همی‌سلولز در یونجه (جدول ۲) است و معمولاً تولیدآنزیم با مقدار سوبسترا تا حدی رابطه مثبت دارد (۱). برخی محققان گزارش کرده‌اند که نمودار فعالیت آنزیمی‌قارچهای بی‌هوازی شکمبه بعد از ٦ یا ۷ روز رشد حالت افقی به خود می‌گیرد. در مطالعات تأثیر غلظت سوبسترا برفعالیت آنزیم، مشاهده گردید که با افزایش غلظت سوبسترا تا حد مشخصی فعالیت آنزیم افزایش می‌یافت. پس از آن فعالیت آنزیم، با افزایش سوبسترا نسبتاً ثابت باقی‌می‌ماند که احتمالاً به دلیل پرشدن تمام جایگاههای فعال آنزیمی به‌وسیله سوبسترا در غلظت مشخصی از سوبسترا می‌باشد (۱، ٤). همچنین دیگر محققان نیز نشان دادند که با افزایش زمان کشت، سرعت و میزان فعالیت قارچ در محیط کشت کاهش می‌یابد (۹، ۲٤).

فعالیت آنزیم زایلاناز در این تحقیق نسبت به آزمایشات انجام شده توسط گوردن و فیلیپس (۱۲)، بورنمان وهمکاران (۸)، آکین و بورمان (۵) ولو و همکاران (۱۷) بالاتر و نسبت به آزمایش گاوانده و کامت (۱۱) پائین بود. این اختلاف احتمالاً به خاطر تفاوت در سویه‌های قارچ و سوبستراهای مورد استفاده، در واریته گیاه، مدت زمان رشد قارچ و مرحله رویشی گیاه می‌باشد (۹، ۱۰، ۱۷و ۲۵).

نتیجه‌گیری و پیشنهادات: مشاهدات میکروسکوپ نوری، رشد قارچهای بی‌هوازی شکمبه بر روی انواع خوراکهای دام مورد آزمایش را تأیید می‌کند. نتایج نشان داد که توان قارچها از نظر تولید آنزیم زایلاناز در سوبستراهای مختلف، حتی در خوراکهایی‌که از نظر ترکیبات شیمیایی یکسان می‌باشند، می‌تواند متفاوت باشد. بیشترین مقدار فعالیت زایلاناز در سبوس‌گندم و کمترین مقدار آن در کاه جو مشاهده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و به منظور روشن نمودن هرچه بهتر جایگاه و نقش قارچهای بی‌هوازی در فرآیند تولید آنزیم زایلاناز پیشنهادات زیر می‌تواند در مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد:

۱- شناسایی گونه‌های قارچی موجود در سایر دامها از نظر تولید آنزیم مورد نیاز است.

www.SID.ir

Archive of SID

۲- با توجه به اینکه آنزیم زایلاناز را می‌توان در مصارف مختلف، از جمله در تغذیه دام و صنعت بکار برد، لذا تهیه آنزیم زایلاناز قارچهای بی‌هوازی شکمبه به‌صورت خام و خالص‌سازی آنها به منظور کاربرد استفاده در صنعت وتغذیه دام نیز می‌تواند از نظر اقتصادی مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از گروه تغذیه و اصلاح نژاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که در تأمین اعتبار لازم برای انجام این پژوهش‌همکاری لازم را مبذول داشته‌اند، و همچنین از همکاری و مساعدت آقای دکتر خسروی جهت خرید زابلان از کشورانگلستان، آقای دکتر قمصری جهت فیستول‌گذاری گوسفند و آقای مهندس پورمحمدی کارشناس آزمایشگاهی‌دانشکده دامپزشکی در کمک به انجام آزمایشات تجزیه خوراک تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

۱. امتیازی، گیتی.، نحوی، ایرج و صالح بیگ، مژده. ۱۳۷۷. مقایسه تولید آنزیم سلولاز (اگزوگلوکوناز) توسط قارچها در محیط کشت مختلف. مجله پژوهشی دانشگاه اصفهان (علوم پایه). جلد دهم، شماره ۱ و ۲: ۱۵- ۲۸.

۲. حاج حیدری، صفرعلی. ۱۳۷٦. بررسی ارزش نسبی پودرماهی در برابر کنجاله پنبه‌دانه در جیره‌هایی با تجزیه‌پذیری سریع در گاوهای شیری. کارشناسی ارشد علوم دامی. دانشگاه صنعتی اصفهان.

۳. قورچی، تقی.، رضائیان، محمد.، رحیمی، شعبان و قربانی، غلامرضا. ۱۳۸۰. تجزیه ماده خشک و مواد فیبری کاه غلات توسط قارچهای بی‌هوازی شکمبه. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ٥٦، شماره ۱: ۱-٦

٤. نقوی، نفیسه سادات. ۱۳۷۸. مقایسه تولید آنزیم سلولاز در قارچها و باکتریها و خالص‌سازی نسبی این آنزیم.پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی. دانشگاه اصفهان.

5. Akin, D.E., and W.S. Borman. 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. J. Dairy Sci. 73: 3023-3032.
6. Association of Official Analytic Chemists. 1990. Official Methods analysis AOAC. 15th Washington. DC.U.S.A
7. Bailey, M.J., and, K. Poutanen. 1989. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. Applied Microbiol. Biotech. 30: 5-10.
8. Bornman, W.S., D.E. Akin, D.E. Ljung, and E. Dahi. 1989. Fermentation products and plant cell wall degradation enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. Applied Environ. Microbiol. 55: 1066-1073.
9. Das, A., and G. Nanda. 1995. Production of xylanolytic enzymes during growth on pulverized grass by *Aspergillus ochraceus*. Anim. Feed Sci. Technol. 42: 141-144.
10. Forgarty, W.M., and T.K. Kelly. 1990. Microbial Enzymes and Biotechnology. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. New York , USA.
11. Gawande, P.V., and M.Y. Kamat. 1999. Production of *Aspergillus xylananse* by lignocellulosic waste fermentation and its application. J. Applied Microbiol. 87: 511-519.
12. Gordon, E.L., and M.W. Phillips. 1989. Degradation and utilization of cellulose and straw by three different anaerobic fungi from the ovine rumen. Applied Environ. Microbiol. 55: 1703-1710.

www.SID.ir

Archive of SID

13.Gutierrez-Correa, M., and R.P. Tengerdy. 1998. Xylanase Production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. Biotechn. Letters. 20: 45-47.
14.Hespell, R.B., and T.R. Whitehead. 1990. Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. J. Dairy Sci. 73: 3013-3022.
15.Ho, Y.W., and D.G.S. Barr. 1995. Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on the rumen fungi from Malaysia. Mycologia. 87: 655-677.
16.Joblin, K.N.1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. Applied Environ. Microbiol. 42: 119-127.
17.Lowe, S.E., M.K., Theodorou, and A.P.J. Trinci. 1987. Cellulases and xylanase of anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. Applied Environ. Microbiol. 53: 1216- 1223.
18.Matsui, H., K. Ushida, and M. Kogima. 1998. Use of ratio of digested xylan to digested cellulose (X/C) as an index of fiber digestion in plant cell- wall material by ruminal microorganisms. Anim. Feed Sci. Technol. 71:207- 215.
19.Orpin, C.G., and K.N. Joblin. 1997. The rumen anaerobic fungi. In: The Rumen Microbial Ecosystem. (Ed. Hobson, P.N. and Stewart, C. S.). Elsevier Science Publishers LTD.PP: 129- 151.
20.Orpin, C.G., and A.J. Letcher. 1979. Utilization of cellulose, starch, xylan and otherhemicelluloses for growth by the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. Current Microbiol. 104: 113-122.
21.Rezaeian, M. 1996. Assessment and Distribution of Anaerobic Fungi in the Ruminant Gut. Ph. D. Thesis, University Newcastle.
22.Shamala, T.R., and K.R. Sreeantiah. 1987. Successive cultivation of selected cellulytic fungi on rice straw and wheat bran for economic production of cellulases and D-xylanase. Enzyme Microb. Technol. 9: 97-101.
23.Singh, S., B. Pillay., V. Dilsook, and B.A. Prior. 2000. Production and properties of hemicellulase by a thermonyces lanuginosus strain. J. Dairy Sci. 88:975-982.
24.Tenuissen, M.J., G.V.M. Dekort., C.H.J.M. Op Den, and J.H.J.Huis. 1992. Production of cellulotic and xylanolytic enzymes during growth of the anaerobic fungus *piromyces sp.* on diffrent substrates. J. General Microbiol. 158: 1657-1669.
25.William, S.A.G.1987. Polysaccharide- degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrate substrates. Can. J. Microbial. 33: 418- 420.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 9(2), Summer 2002
www.magiran.com/jasnr

Production of zaylanase enzyme on ten feeds by rumen anaerobic fungi

T. Ghoorchi[1], S. Rahimi[1], M. Rezaiean[2] and G. Ghorbani[3]
[1]Faculty of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran; [2] Faculty of veterinary medicine, Tehran University, Tehran, Iran. [3] Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Abstract

An experiment was carried out to estimate the potential activity of rumen anaerobic fungi in production of zaylanase enzyme on different substrates. Samples of wheat straw, barley straw, wheat straw + urea, rice straw, wheat straw + molasses, wheat bran, bagasses (sugar cane), cotton seed, alfalfa and corn silage were used as the substrate to culture rumen fungi which isolated from a fistulated Shal sheep. Zaylanase enzyme activities of samples were measured after 0, 3, 6 and 9 days of incubation. Production of zaylanase enzyme of substrates varied from 4.97 to14.78 (unit enzyme) after 9 days of fungi growth. The highest and lowest production enzyme was related to wheat bran and barley straw, respectively. Enzyme production was increased sharply until 6 days of fungal incubation and continued slowly by 9th day in all of the cultures. The results indicated that rumen anaerobic fungi have the ability for enzyme production.

Keywords: Sheep; Anaerobic fungi; zaylanase; Rumen; Enzyme Production.

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی

www.SID.ir