بررسی فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، *Anagasta kuehniella* Zeller, 1879 (Lep., Pyralidae)

مجید جعفرلو[1]، رضا فرشباف پورآباد[2*]، مصطفی ولیزاده[3]، داود محمدی[4]، محمدعلی ضیائی مدبونی[5]

تاریخ دریافت: 90/9/19 تاریخ پذیرش: 91/5/10

1و5- دانشجویان سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

2و3- اساتید دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

4- استادیار دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان

* مسئول مکاتبه : Email: rfpourabad@yahoo.com

چکیده

در این بررسی، فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی لاروهای سن پنجم نر و ماده شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت. برای سنجش فعالیت آنزیم از کیت تجاری و دستگاه اتوآنالایزر استفاده شد. فعالیت ویژه آنزیم بر حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین (IU/mg protein) محاسبه گردید. در این بررسی برخی ویژگی‌های آنزیم آلفا- آمیلاز مانند دما و pH بهینه فعالیت آنزیم، فعالیت آنزیم در طول ساعات مختلف شبانه‌روز در لاروهای سن پنجم، فعالیت آنزیم در مراحل مختلف نشوونمایی، تأثیر مدت زمان گرسنگی و تأثیر شرایط نگه‌داری آنزیم در مدت زمان مشخص در دو دمای مختلف (چهار و 20- درجه سانتیگراد) در لاروهای سن پنجم مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان دادند که اثر دما روی فعالیت آنزیم در لاروهای سن پنجم نر و ماده معنی‌دار بود و دمای بهینه فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لاروهای سن پنجم نر و ماده، 40°C به دست آمد. فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در هر دو جنس در pH های مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان داد و بیشترین میزان فعالیت آنزیم در نر و ماده در pH = 5 مشاهده گردید. اثر غلظت آنزیم روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در هر دو جنس معنی‌دار بود و با افزایش غلظت آنزیم، فعالیت آن افزایش پیدا کرد. اثر تازگی محلول‌های آنزیمی روی فعالیت آنزیم در نگه‌داری آن در دمای 20°C- در نر و ماده و در دمای 4°C در جنس ماده فاقد اختلاف معنی‌دار با شاهد ولی در جنس نر در سطح احتمال 5 درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود. فعالیت آنزیم در ساعات مختلف شبانه‌روز در نر و ماده دارای اختلاف معنی‌دار بود. اوج فعالیت آنزیم در هر دو جنس در ساعت 12 مشاهده شد و کمترین میزان فعالیت آنزیمی در ساعت 24 ثبت گردید. فعالیت آنزیم در مراحل مختلف زیستی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد متفاوت بود و بیشترین فعالیت آنزیمی به ترتیب در لاروهای سن پنجم ماده، لاروهای سن پنجم نر، لاروهای سن چهارم، پیش‌شفیره‌های ماده، پیش شفیره‌های نر، حشرات کامل ماده و حشرات کامل نر مشاهده شد ولی در شفیره‌های نر و ماده هیچ فعالیت آنزیمی مشاهده نگردید. فعالیت آنزیم در لاروهای سن پنجم نر و ماده با یکدیگر متفاوت و دارای اختلاف معنی دار بود. اثر گرسنگی روی فعالیت آنزیم در لاروهای سن پنجم نر و ماده اختلاف معنی‌داری را نشان داد و بیشترین میزان فعالیت آنزیمی پس از دو روز گرسنگی و کمترین میزان فعالیت، پس از چهار روز گرسنگی مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، آلفا- آمیلاز، روده، فعالیت آنزیمی، ویژگی‌ها.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of Midgut α-Amylase Activity in the Mediterranean Flour Moth, *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep., Pyralidae)

M Jafarlu[1], R Farshbaf Pourabad[2*], M Valizadeh[3], D Mohammadi[4] and MA Ziaei Madboni[5]

Received: December 10, 2011 Accepted: July 31, 2012
[1, 5]Graduate MSc. Student, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[2, 3]Prof, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, , Iran
[4]Asist Prof, Faculty of Science, University of Tarbiat Moalleme Azarbaijan
[*] Corresponding author: E-mail: rfpourabad@yahoo.com

Abstract

In this study, larval midgut α-amylase activity of the Mediterranean flour moth reared on wheat flour under laboratory conditions was studied. Enzyme activity was evaluated by using a commercial kit and an autoanalayzer device. Specific enzyme activity was measured as international unit per mg protein (IU/mg Protein). In this study, some α-amylase enzyme properties such as optimum temperature and pH of enzyme activity, enzyme activity during different hours of the day and night, enzyme activity at different developmental stages of adult male and female, effect of starvation period, and the effect of storage conditions of enzyme at specified periods in two different temperatures were studied. The results revealed that incubation temperature significantly affected enzyme activity for both sexes and optimal enzyme activity was detected in 40˚C for both male and females. pH values also significantly affected enzyme activity and the optimal pHs for amylase activity in both sexes were 5. Effects of enzyme concentration on α-amylase activity were significant in both sexes. Increasing the concentration of enzyme in both sexes caused a sharp increase in enzyme activity. Storage period in -20˚C did not decreased enzyme activity significantly in both sexes, but storage period in 4˚C in males significantly decreased the activity in comparison with the control. The results of studying enzyme activity during 24 hr. periods showed significant differences during day and night and the most and the least enzyme activities in both sexes were recorded in 12 and 24 o'clock, respectively. Enzyme activity in different developmental stages showed significant differences and the most enzyme activities were detected in 5th female larvae, 5th male larvae, 4th male and females, female and male pre-pupa, and female and male adults, respectively. In male and female pupae, no detectable activity was observed.Enzyme activity in male and female fifth instar larvae showed Significant difference. Starvation periods significantly affected the digestive enzyme activity in both male and female larvae and the trends of enzyme activity during 4 days of starvation was the same in both sexes. The most and the least enzyme activity were detected 2 and 4 days after starvation, respectively.

Keywords: Mediterranean flour moth, α-Amylase, Gut, Enzyme activity, Properties.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

شب‌پره مدیترانه‌ای آرد با نام علمی *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) آفت انباری مهم در ایران و بیشتر مناطق دنیا می‌باشد. این آفت سالیانه خسارت زیادی را به محصولات انباری وارد می‌کند و اغلب روش‌های کنترل این آفت بر استفاده از مواد شیمیایی به صورت تدخینی مبتنی می‌باشند که با توجه به اثرات مخرب انسانی و زیست‌محیطی، جایگزینی روشی امن‌تر برای کنترل این آفت و آفات مشابه مستلزم مطالعات فیزیولوژیک (به ویژه فیزیولوژی گوارش) می‌باشد. آنزیم آلفا- آمیلاز، اندوآمیلازی است که پیوند α-D-(1,4)-glucan را در مواد نشاسته‌ای هیدرولیز می‌کند (استروبل و همکاران 1998). فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در حشرات راسته‌های مختلف توسط محققان زیادی بررسی شده است. مطالعه پاسخ آنزیم آلفا- آمیلاز به دما و pH و تعیین دما و pH بهینه در سن گندم (سعادتی بزدی 1387)، سن *Graphosoam lineatum* (یزدانیان 2006)، شب‌پره هندی (فرشباف پورآباد و همکاران 1389، رشیدی 1387) و بالپولکدار *Tecia solanivora* (والنسیا و همکاران 2008) و همچنین بررسی تغییرات آنزیم‌های گوارشی در لاروهای *Ephestia cautella* (بلسکیا و وول 1993)، بررسی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلازدر کرم ابریشم (ناگاراجیو و آبراهام 1995) و تعیین برخی از ویژگی‌های آنزیم آلفا- آمیلاز (کریستوفر و ماتاوانا 1885، هارشینی و همکاران 2003، هیملاتا و همکاران 2009، کوروپاتکین و اسمیت 2010 و پلیگرینی و همکاران 2006) از جمله این تحقیقات می‌باشند. بررسی آنزیم‌ها، تعیین ویژگی‌ها و شناخت هر چه بیشتر آن‌ها ما را در شناخت فیزیولوژی تغذیه در حشرات یاری خواهد کرد، زیرا ویژگی‌های یک آنزیم با رژیم غذایی آن حشره ارتباط نزدیکی دارند (نلیکا بالاسوریا و واسانتا روپاسینگه 2011). آنزیم آلفا- آمیلاز در سوخت‌وساز هیدرات‌های کربن در گیاهان و جانوران نقش مهمی دارد و شب‌پره مدیترانه‌ای آرد نیز شدیداً به این آنزیم وابسته می‌باشد چرا که برای گوارش و استفاده از نشاسته، وجود آمیلازها ضروری است. مسلما شناسایی و آگاهی از ویژگی‌های یک آنزیم قدم مهمی در شناخت مهارکننده‌های طبیعی و مصنوعی آن می‌باشد. همچنین، در این پژوهش سعی بر این بوده تا با شناسایی ویژگی‌های آنزیم آلفا- آمیلاز شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، راه برای انجام تحقیقات آنزیمی در آینده هموار شود.

مواد و روش‌ها

پرورش شب‌پره مدیترانه‌ای آرد

برای پرورش شب‌پره مدیترانه‌ای آرد از کلنی موجود در گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز استفاده شد و پنج نسل خالص‌سازی در شرایط کنترل‌شده صورت گرفت. دمای آزمایشگاه در طی دوره پرورش $26\pm2^{\circ}C$، رطوبت نسبی برابر 50 ± 5 درصد و شرایط نوری به صورت 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی بود. برای پرورش این شب‌پره از ظروف پلاستیکی مناسب به ابعاد $30\ cm \times 20 \times 10$ که داخل آن‌ها آرد گندم به ارتفاع 3 cm ریخته شده بود (فیلیپس و استراند 1994)، استفاده شد و 0/5 گرم تخم به ازای هر دو کیلوگرم آرد به صورت یکنواخت روی سطح آرد پخش گردید. برای تخم‌گیری از ظروف استوانه‌ای شفاف به ارتفاع 30cm و قطر دهانه 10cm استفاده گردید (ایرانی‌پور و همکاران 1388).

تشریح و آماده‌سازی نمونه‌های آنزیمی

تمامی تشریح‌ها، به‌جز در هنگام تعیین فعالیت آنزیمی در مراحل مختلف نشوونمایی، روی لاروهای سن پنجم نر و ماده صورت گرفتند. لاروها پس از بی‌هوش شدن توسط اتیل استات در درون پتری‌دیش‌های حاوی آب مقطر از پهلو و بخش انتهایی آن با قیچی مخصوص تشریح، شکافته شدند و لوله گوارش بیرون آورده شد. لوله‌های مالپیگی، اجسام چربی و بقیه بافت‌های متصل به آن حذف شدند. سپس، ابتدا و انتهای لوله گوارش بریده شده و فقط روده

Archive of SID
www.SID.ir

میانی در سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. روده‌ها به درون میکروتیوب‌های 1/5 ml حاوی یک میلی‌لیتر بافر فسفات سرد با pH = 7 منتقل و حشرات کامل پس از جداسازی بال‌ها و پرزهای بدن در درون میکروتیوب لـه شده و سپس محتویات میکروتیوب‌ها با استفاده از دستگاه هموژنایزر مدل Ultra–Turrax T8 همگن‌سازی شدند. در مرحله بعد میکروتیوب‌ها به مدت 5 دقیقه در دمای 4°C و با سرعت 10000 g سانتریفیوژ گردیدند و بلافاصله قبل از ته‌نشین شدن محلول روشناور، به میکروتیوب‌های جدید منتقل و تا زمان استفاده در آزمایش‌ها در دمای 20°C- نگه‌داری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

میزان فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز با استفاده از کیت تشخیص آلفا- آمیلاز ساخت شرکت پارس‌آزمون و توسط دستگاه اتوآنالایزر مدل Alcyon 300 بر اساس روش به کار رفته توسط (یزدانیان 1385) اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز به صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین (IU/mg protein) و از نسبت فعالیت کلی آنزیم به پروتئین کل به دست آمد.

تعیین غلظت پروتئین در نمونه‌های آنزیمی

برای تعیین غلظت پروتئین کل در نمونه‌های آنزیمی از روش بردفورد استفاده گردید (برادفورد 1976). از غلظت‌های مختلف پروتئین سرم گاوی برای ترسیم منحنی استاندارد استفاده شد و میزان جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 595 نانومتر اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم در دماهای مختلف

اثر دما روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در محدوده دمای 50°C- 25 به فاصله پنج واحد بررسی شد. طول موج 405 نانومتر برای اسپکتروفتومتر تنظیم شد. پس از مخلوط نمودن محلول سوبسترا با محلول آنزیمی به نسبت‌های مشخص، مقدار جذب نوری پس از دو دقیقه در هر سه تکرار قرائت گردید. سپس، با استفاده از زمان‌سنج مقدار جذب نوری پس از گذشت 1، 2 و 3 دقیقه یادداشت شد. در نهایت، اختلاف‌های جذب نوری پس از 1، 2 و 3 دقیقه با هم جمع و بر 3 تقسیم گردیدند. عدد حاصل در ثابت 5151 ضرب گردید و در نهایت، فعالیت ویژه آنزیم بر حسب U/L به دست آمد.

فعالیت آنزیم در pH های مختلف

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در pH های 5 تا 12 و در فواصل نیم واحدی اندازه‌گیری شد. pH بافر مورد استفاده با استفاده اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم تنظیم گردید. به هر میکروتیوب 500 µl از محلول آنزیمی و 300 ml بافر فسفات با pH مشخص اضافه گردید و فعالیت آنزیم پس از 30 دقیقه نگه‌داری در دمای 37°C با استفاده از اتوآنالایزر سنجیده شد. (کالیبراسیون اتوآنالایزر توسط مسئول مربوطه و با استفاده از کیت‌های تجاری انجام گرفت).

اثر غلظت آنزیم روی فعالیت آنزیمی

برای تعیین اثر غلظت آنزیم روی فعالیت آن، به ازای هر میلی‌لیتر بافر تعداد 1، 2، 3 و 4 عدد روده میانی در هر میکروتیوب هموژنیزه و سپس سانتریفیوژ شدند و فعالیت آنزیم با استفاده از روش شرح داده شده برای سنجش فعالیت آنزیم، با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر اندازه‌گیری گردید.

اثر تازگی محلول آنزیمی بر فعالیت آنزیمی

در این آزمایش، فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی لاروهای سن پنجم نر و ماده در شرایط دمایی یخچال (4°C) و فریزر (20°C-) از ابتدای استخراج آن (تازه، شاهد) تا 60 روز بعد با فاصله 10 روز از یکدیگر اندازه‌گیری شد. نمونه‌های آنزیمی در دماهای نام برده به مدت مشخص نگه‌داری شدند و

Archive of SID

www.SID.ir

سپس فعالیت آنزیم با استفاده از روش اشاره شده اندازه‌گیری گردید.

فعالیت آلفا- آمیلاز در ساعات مختلف شبانه‌روز

در این آزمایش، نمونه‌برداری از لاروهای سن پنجم نر و ماده در طول 24 ساعت شبانه‌روز و به فاصله هر سه ساعت انجام پذیرفت. نمونه‌برداری در ساعات 3، 6، 9، 12، 15، 18، 21 و 24 صورت گرفت. عمل تشریح و استخراج آنزیم مشابه روش اشاره شده صورت پذیرفت و فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز توسط اتوآنالایزر اندازه‌گیری شد.

اثر گرسنگی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

لاروهای سن چهارم به طور تصادفی انتخاب و به صورت انفرادی در درون قوطی‌های فیلم با بدنه شفاف و حاوی آرد به ارتفاع 1 mm پرورش یافتند. لاروهایی که وارد سن پنجم شده بودند، با بازدیدهای روزانه انتخاب و بر حسب جنسیت به ظروف دیگری که عاری از هر گونه ماده غذایی بودند، منتقل می‌گردیدند و زمان این انتقال‌ها یادداشت می‌شد. لاروها به مدت 1، 2، 3 و 4 روز گرسنه نگه داشته و پس از بی‌هوشی تشریح شدند. در نهایت، فعالیت آنزیم با استفاده از اتوآنالایزر سنجیده شد.

فعالیت آنزیمی در مراحل مختلف نشوونمایی

برای بررسی فعالیت آنزیم در مراحل مختلف زیستی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد، از لاروهای سن چهارم، سن پنجم، پیش‌شفیره، شفیره و شب‌پره‌های کامل نر و ماده نمونه‌برداری صورت گرفت. در مورد حشرات کامل و شفیره‌ها، کل بدن برای سنجش آنزیم مورد استفاده قرار گرفت و عمل هموژنیزه و سانتریفیوژ کردن مانند روش مورد استفاده برای لاروهای سن پنجم و پیش‌شفیره‌ها انجام شد. آنزیم‌های استخراج شده طبق روش اشاره شده مورد سنجش آنزیمی قرار گرفتند.

تجزیه‌های آماری داده‌ها

برای بررسی اثر دما، غلظت یون هیدروژن (pH)، گرسنگی، جنسیت، غلظت آنزیم در بافر فسفات، فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در ساعات مختلف شبانه‌روز و میزان پایداری آنزیم در هر یک از لاروهای نر و ماده از طرح کاملاً تصادفی در 4 تکرار استفاده شد. وضعیت نرمال بودن داده‌های آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس‌ها و مقایسه‌های میانگین به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن با نرم‌افزار MSTAT-C انجام شدند و برای رسم نمودارهای مربوطه نیز از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده گردید.

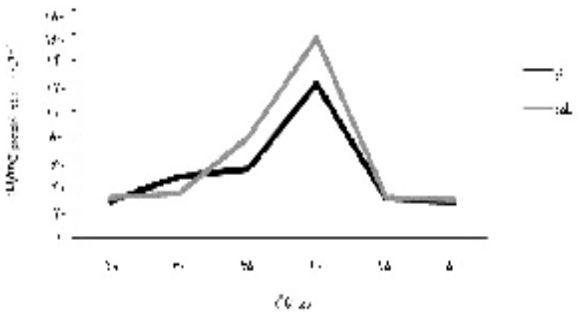
نتایج و بحث

فعالیت آنزیم در دماهای مختلف

اثر دما روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز لاروهای سن پنجم نر و ماده شب‌پره مدیترانه‌ای آرد معنی‌دار بود و بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در دمای $40^{\circ}C$ مشاهده شد که با تیمارهای دمایی دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. نتایج تحقیقات محققان مختلف موید این موضوع است که فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در حشرات مختلف با افزایش دما سیر صعودی دارد و در یک دمای بهینه، فعالیت آنزیم بیشترین مقدار را پیدا می‌کند. به عنوان مثال، اثر دما روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز سن *Graphosoma lineatum* معنی‌دار بود و فعالیت آنزیم در دماهای 25 تا $50^{\circ}C$ در سن‌های کامل نر و ماده مشابه و دمای بهینه فعالیت آنزیم $37^{\circ}C$ بود (یزدانیان 1385). در بررسی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز شب‌پره هندی، دمای بهینه فعالیت آنزیم برابر با $37^{\circ}C$ به دست آمد و فعالیت آنزیم در حشرات کامل نر و ماده روند مشابهی داشت (فرشباف پورآباد و همکاران 1389) که تحقیق حاضر با نتایج به دست آمده مطابقت دارد (شکل 1). بسته به این که واکنش آنزیمی با سوبسترا چقدر به طول بینجامد، دمای بهینه فعالیت آنزیم متفاوت خواهد بود و دمای بهینه فعالیت آنزیم‌ها به pH واکنش نیز بستگی دارد (هوری 1973). با

Archive of SID
www.SID.ir

افزایش دما، انرژی جنبشی ملکول‌های آنزیم نیز افزایش پیدا می‌کند، زنجیر پلی‌پپتیدی تشکیل‌دهنده آنزیم واسرشته می‌شود، و فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد، زیرا فعالیت حیاتی ماکروملکول‌هایی مانند پروتئین‌ها به ساختمان فضایی آن‌ها وابسته می‌باشد (کولب 2001).



شکل 1- اثر دما روی میانگین فعالیت ویژه (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی لاروهای سن پنجم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در دماهای مختلف (pH = 7).

فعالیت آنزیم در pH های مختلف

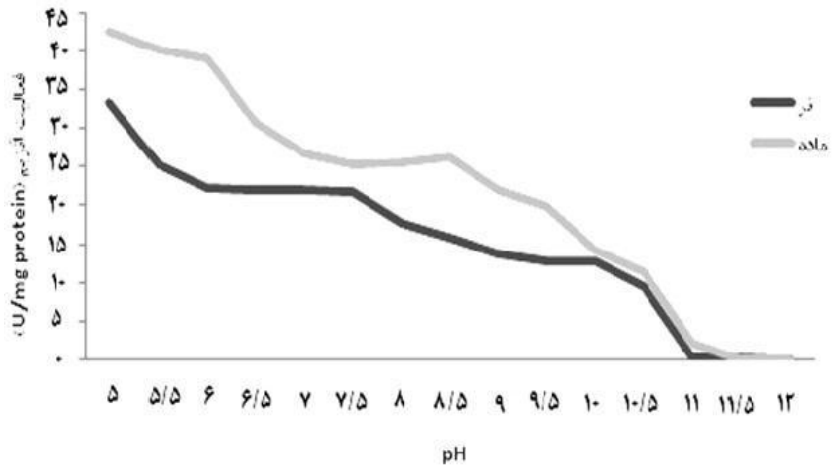
نتایج نشان دادند که فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در pH های مختلف در لاروهای سن پنجم نر و ماده در سطح احتمال 1 درصد دارای تفاوت معنی‌دار بود و بیشترین فعالیت آنزیم در pH = 5 دیده شد. با افزایش pH از مقدار بهینه، فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز کاهش یافت و در pH های 11/5 و 12 فعالیت آنزیمی مشاهده نشد (شکل 2). بررسی بیوشیمیایی آنزیم‌های آمیلاز کرم ابریشم (*Bombyx mori*) توسط آبراهام و همکاران (آبراهام و همکاران 1992) نشان داد که آنزیم در محدوده pH = 9/2 فعالیت قابل توجهی داشت. در بررسی صورت گرفته روی آنزیم آلفا- آمیلاز شب‌پره هندی اثر pH در لاروهای سن پنجم نر و ماده معنی‌دار و pH بهینه فعالیت آنزیم برابر 5/5 بود (فرشباف پورآباد و همکاران 1389) که با نتایج به دست آمده مبنی بر pH بهینه اسیدی در تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین، بالاترین میزان فعالیت پروتئاز روده‌ای در بالپولکدار *Anticarsia gemmatalis* در pH = 5/5 و pH = 8 مشاهده شد (زاویر و همکاران 2005). pH بهینه فعالیت آنزیم گوارشی هگزوز آمینیداز در *Spodoptera frugiperda* برابر 5/5 گزارش شده است (تومیا و همکاران 2006). آنزیم آلفا- آمیلاز در گستره وسیعی از pH های اسیدی و قلیایی فعالیت دارد. pH محیط روده به طور مطلق روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی مؤثر نیست چرا که برخی آنزیم‌های دیگر غیر از آمیلاز نیز در محیط قلیایی روده دارای pH بهینه اسیدی هستند. همچنین، اثر pH روی فعالیت آنزیم با تغییر مدت زمان واکنش تفاوت خواهد کرد (یزدانیان 1385). از عوامل دیگر تأثیرگذار می‌توان به غلظت سوبسترا و pH بافر مورد استفاده اشاره کرد (روس و همکاران 1951). pH بافر مورد استفاده در این آزمایش برابر 7 بود. گزارش شده که تأثیر pH روی فعالیت آنزیم می‌تواند به خاطر ایجاد تغییر در ترکیب و بار الکتریکی در اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال یا کاتالیکی و جایگاه تماس یا پیوند در آنزیم باشد (کریم‌زاده و همکاران 1383).

اثر غلظت آنزیم روی فعالیت آنزیمی

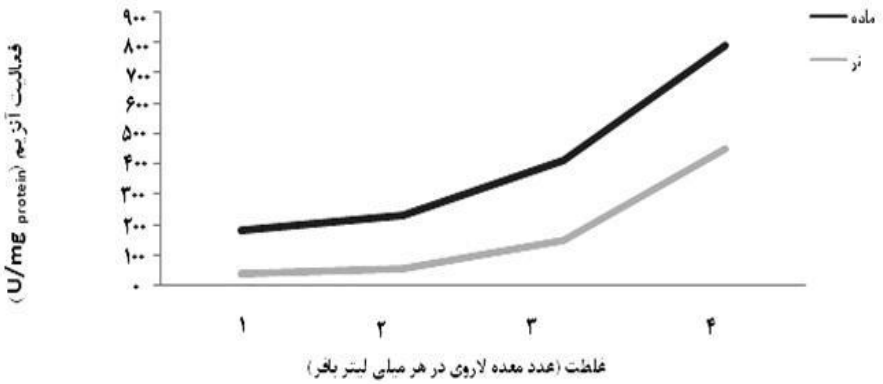
اثر غلظت روی فعالیت آنزیمی در لاروهای سن پنجم نر و ماده شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در سطح احتمال 1% معنی‌دار بود و بیشترین فعالیت آنزیم در غلظت 4 عدد روده میانی در 1 میلی‌لیتر بافر فسفات مشاهده شد. با افزایش غلظت آنزیم، میزان فعالیت آنزیم نیز افزایش یافت (شکل 3). اثر غلظت آنزیم در بافر روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز سن *G. lineatum* و سن گندم معنی‌دار بود و مشاهده شد که بین فعالیت آنزیم و تعداد غدد بزاقی مورد استفاده رابطه خطی وجود داشت (سعادتی بزدی 1386 و یزدانیان 1385) که با نتایج به دست آمده در مورد شب‌پره مدیترانه‌ای آرد مطابقت دارد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 2- اثر pH روی میانگین فعالیت ویژه (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی لاروهای سن پنجم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد (دمای 37 °C).



شکل 3- اثر غلظت آنزیم در بافر روی فعالیت ویژه (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی لاروهای سن پنجم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد (pH = 7).

اثر تازگی محلول آنزیمی بر فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیم در محلول‌های آنزیمی مربوط به لاروهای سن پنجم نر و ماده شب‌پره مدیترانه‌ای آرد نگه‌داری شده در دمای 20°C- با شاهد (محلول آنزیمی تازه تهیه شده) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. اثر تازگی محلول آنزیمی بر فعالیت آنزیمی روی فعالیت آنزیم در دمای 4°C در جنس ماده معنی‌دار نبود ولی روی فعالیت آنزیم در جنس نر در سطح احتمال 5 % معنی‌دار بود و فعالیت آن در محلول‌های 10، 30، 40 و 60 روزه با فعالیت آنزیم در محلول 20 روزه اختلاف معنی‌دار داشت (جدول 1). به گزارش (یزدانیان 1385) اثر مدت زمان نگه‌داری محلول آنزیمی آلفا- آمیلاز در دمای 4 درجه سانتیگراد، روی فعالیت آن غیرمعنی‌دار و آنزیم تا 40 روز پس از نگه‌داری دارای فعالیت بود. اثر تازگی محلول آنزیمی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز شب‌پره هندی معنی‌دار نبود و نگه‌داری محلول آنزیمی در دمای 4°C به مدت 30 روز، روی فعالیت آنزیم تأثیری نداشت (فرشباف پورآباد و همکاران 1389).

www.SID.ir

فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز سن *Lygus disponsi* پس از یک سال نگه‌داری آن در دمای 18°C- همچنان ثابت باقی ماند (هوری 1973). مشاهده می‌شود که همانند موارد فوق، آنزیم آلفا- آمیلازروده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد نیز یک آنزیم بسیار پایدار است و می‌توان آن را به مدت طولانی در دمای مناسب نگه‌داری کرد و مورد استفاده قرار داد.

جدول 1- مقایسات میانگین اثر تازگی محلول آنزیمی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی لاروهای سن پنجم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد

		مدت زمان نگهداری آنزیم (روز)					
		10	20	30	40	50	60
دمای -20°C	ماده	102/4 A	101/1 A	103/9 A	104/1 A	103/4 A	101/4 A
	نر	78/44 A	77/56 A	79/42 A	77/29 A	79/49 A	80/42 A
دمای 4 °C	ماده	305/6 A	305/2 A	306/1 A	307/9 A	304/4 A	304/2 A
	نر	219/9 A	217/8 B	219/6 A	219/5 A	218/5 AB	219/4 A

حروف غیر مشابه در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5 % می باشند.

فعالیت آلفا- آمیلاز در ساعات مختلف شبانه‌روز

اختلاف بین میانگین‌های مربوط به فعالیت آنزیم در ساعات مختلف شبانه‌روز در لاروهای نر و ماده در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود و اوج فعالیت آنزیم در ساعت 12 مشاهده شد که با فعالیت آنزیم در بقیه ساعات شبانه‌روز دارای اختلاف معنی‌دار بود (جدول 2). در رابطه با بررسی فعالیت آنزیم در ساعات مختلف شبانه‌روز تحقیقات زیادی انجام نشده است. بیشترین فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز سن *G. lineatum* در حشرات نر و ماده به ترتیب در ساعات 12 و 24 مشاهده شد (یزدانیان 1385). بیشترین فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در شب‌پره هندی در ساعت 12 مشاهده شد (رشیدی 1386). در توجیه اختلافات مشاهده شده بین فعالیت آنزیم در ساعات مختلف شبانه‌روز گفتنی است که میزان تغذیه حشره در طول ساعات شبانه‌روز یکسان نیست و در نتیجه فعالیت آنزیم نیز در طول این ساعات تفاوت خواهد کرد چرا که میزان آنزیم آلفا- آمیلاز ترشح شده با میزان تغذیه آفت و سوبسترا (نشاسته آرد) متناسب است. همچنین، برخی محققان تفاوت در فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز را در ساعات شبانه‌روز به تغییر در میزان تولید آنزیم بر اثر دمای محیطی و شرایط گرسنگی نسبت داده‌اند (فرشباف پورآباد و همکاران 1389).

جدول 2- مقایسه میانگین فعالیت ویژه (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی لاروهای سن پنجم شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در ساعات مختلف شبانه‌روز.

	ساعات شبانه‌روز							
	24	3	6	9	12	15	18	21
ماده	280/6 D	285/4 D	305 BCD	321/9 B	362/3 A	316 BC	330/2 B	293/2 CD
نر	129/1 F	130/7 F	140/5 E	174/1 C	201/3 A	165/8 D	180/1 B	138/6 E

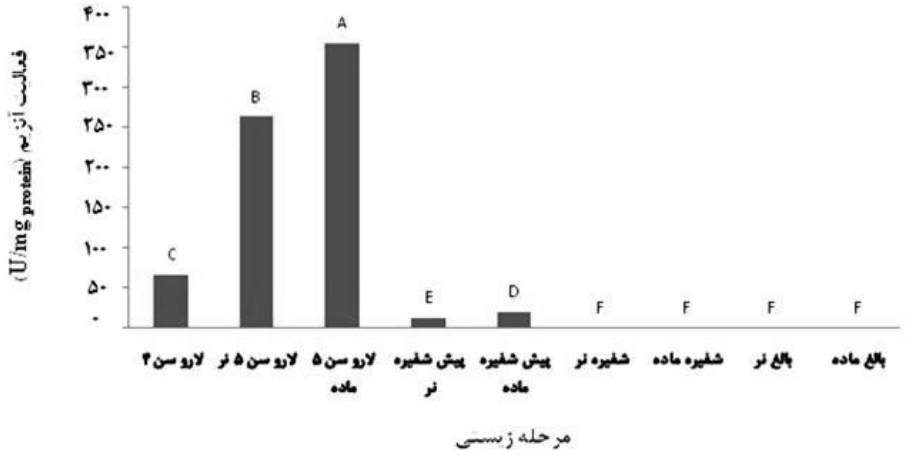
حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 1 % می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت آنزیمی در مراحل مختلف نشوونمایی

اختلاف بین میانگین‌های فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در مراحل مختلف نشوونمایی در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود و بیشترین فعالیت آنزیمی به ترتیب در لاروهای سن پنجم ماده، لاروهای سن پنجم نر، لاروهای سن چهارم، پیش‌شفیره‌های ماده، پیش‌شفیره‌های نر، حشرات کامل ماده و حشرات کامل نر مشاهده شد. آنزیم آلفا- آمیلاز در شفیره‌های نر و ماده فعالیت قابل سنجش را نشان نداد (شکل 4). بین میزان خوردن غذا و فعالیت آنزیم‌های گوارشی رابطه مستقیم وجود دارد (کریستوفر و ماتاوانا 1985) و سنین مختلف نشوونمایی از لحاظ نیاز غذایی یکسان نیستند چنان که به طور مثال در شفیره‌ها و حشرات کامل که تغذیه نمی‌کنند، فعالیت آنزیمی نیز مشاهده نشد. همچنین، غلظت آنزیم در مراحل مختلف نشوونمایی تفاوت دارد و فعالیت آنزیمی تحت تأثیر قرار می‌گیرد به طوری که با افزایش سنین لاروی، فعالیت آنزیم نیز افزایش می‌یابد (فرشباف پورآباد و همکاران 1389، هوری 1968 و هوری 1973).



شکل 4- مقایسه میانگین فعالیت ویژه (واحد بر میلی‌گرم پروتئین) آنزیم آلفا- آمیلاز در مراحل مختلف نشوونمایی (دمای $37^{\circ}C$ و $pH = 77$).

اثر گرسنگی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

اثر گرسنگی روی فعالیت آنزیم در لاروهای نر و ماده در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود (جدول 3) و بیشترین میزان فعالیت آنزیم بعد از دو روز گرسنگی مشاهده شد که با فعالیت آنزیم در سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. در هر دو جنس، بیشترین میزان فعالیت آنزیم پس از تیمار دو روز گرسنگی، به ترتیب در تیمارهای یک، سه و چهار روز گرسنگی مشاهده شد. در بررسی صورت گرفته روی سوسک کلرادوی سیب زمینی، اثر گرسنگی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلازمعنی‌دار گزارش شد و بیشترین فعالیت آنزیم در تیمارهای یک و دو روزگرسنگی مشاهده گردید. کمترین میزان فعالیت آنزیم نیز پس از چهار روز گرسنگی ثبت شد (صفائی خرم و همکاران 2010). اثر گرسنگی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز لاروهای سن پنجم نر و ماده شب‌پره هندی معنی‌دار بود و بیشترین فعالیت آنزیمی در نر و ماده پس از 24 ساعت گرسنگی دیده شد (فرشباف پورآباد 1389). اثر گرسنگی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز سن *G. lineatum* معنی‌دار بود و بیشترین فعالیت آنزیم پس از 24 و 36 ساعت مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (یزدانیان 1385). آن چه که در

www.SID.ir

تمامی موارد و مطالعه حاضر مشاهده می‌شود این است که در اثر تنش گرسنگی، فعالیت آنزیم در مراحل ابتدایی که بسته به نوع حشره متفاوت است، افزایش می‌یابد. سپس، با گذشت زمان و ادامه گرسنگی، هیچ افزایشی در فعالیت آنزیم مشاهده نمی‌گردد و فعالیت آن کاهش پیدا می‌کند چرا که میزان فعالیت آنزیم با توجه به وجود ماده اولیه (سوبسترا) تنظیم می‌شود و در مراحل ابتدایی گرسنگی برای رفع گرسنگی اقدام به افزایش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز می‌شود ولی با ادامه گرسنگی و عدم دسترسی به نشاسته آرد، فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد و در نهایت حشره تلف می‌شود.

جدول 3- مقایسات میانگین اثر طول دوره گرسنگی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز.

	روزهای گرسنگی			
	1	2	3	4
ماده	247/4 ^{B}	376/5 ^{A}	140/8 ^{C}	75/01 ^{C}
نر	156/7 ^{B}	209/7 ^{A}	103 ^{C}	62/23 ^{D}

حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار درسطح احتمال 1% می‌باشند.

منابع مورد استفاده

Abraham EG, Nagaraju TJ and Datta RK, 1992. Biochemical Studies of Amylases in The Silkworm, *Bombyx mori* L.: Comparative Analysis in Diapausing and Nondiapausing Strains. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 22(8): 867-873.

Belskya NK and Wool D, 1993. Ecological Aspects of Digestive Enzyme Covariation in Almond Moth Larvae, *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera, Phyticidae). Journal of Stored Products Research, 29(4): 323-332.

Bradford MM, 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72:248–254.

Christopher MSM and Mathavana S, 1985. Regulation of Digestive Enzyme Activity in the Larvae of *Catopsilia crocale* (Lepidoptera). Journal of Insect Physiology, 31(3): 217-221.

Farshbaf PourAbad R, Rashidi L, Valizadeh M, Yazdanian M and Mohammadi D, 2010. Study of Some Properties of α-amylase Enzyme in Indian Moth, *Plodia interpunctella* (Lep., Pyralidae). Journal of Plant Protection (Agricultural industry & science), 24(3): 1-10. (In Persian).

Harshini S, Reshmi V and Sreekumar S, 2003. A Brain Peptide Stimulates Release of Amylase from the Midgut Tissue of Larvae of *Opisina arenosella* Walk. (Lepidoptera: Cryptophasidae). Neuropeptides, 37(3): 133-139 .

Hemlata MK, Priya JS, Vaijayanti AT, Vidya SG and Ashok PG, 2009. Responses of Midgut Amylases of *Helicoverpa armigera* to Feeding on Various Host Plants. Journal of Insect Physiology, 55: 663-670.

Archive of SID

www.SID.ir

Hori K, 1968. Feeding Behavior of the Cabbage Bug, *Eurydema rugosa* Mutschulsky (Hemiptera: Pentatomidae) on the Cruciferous Plants. Applied Entomology and Zoology, 3: 26-36.

Hori K, 1973. Studies on Enzymes, Especially Amylases, in the Digestive System of the Bug *Lygus disponsi* and Starch Digestion in the System. Research Bulletin of Obihiro University, 8: 173-260.

Iranipour S, Vaez N, Nouri Ghanbalani G, Asghari Zakaria R and Mashhadi Jafarloo M, 2009. Effect of Host Change on Demographic Fitness of the Parasitoid, *Trichogramma brassicae*. Journal of Insect Science. 10(78):1-12.

Karimzadeh HR, Raftari AR and Abtahi M, 1994. *Harper Biochemistry* Vol A, (23th Ed.). Shahre Ab Publishing. (In Persian).

Kolb VA, 2001. Cotranslational Protein Folding. Molecular Biology, 35(4): 584-590.

Koropatkin, N. M. and Smith, T. J. 2010. SusG: A Unique Cell-Membrane-Associated α-Amylase from a Prominent Human Gut Symbiont Targets Complex Starch Molecules. Structure, 18(2): 200-215.

Nagaraju J and Abraham EG, 1995. Purification and Characterization of Digestive Amylase from the Tasar Silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 110(1): 201-209.

Nileeka Balasuriya BW and Vasantha Rupasinghe HP, 2011. Plant Flavonoids as Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors in Regulation of Hypertension. Functional Foods in Health and Disease, 5:172-188.

Pelegrini PB, Murad AM, Grossi de Sa, MF, Mello LV, Romerio LAS and Noronha EF, 2006. Structure and Enzyme Properties of *Zabrotes subfasciatus* α-Amylase. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 61: 77-86.

Phillips TW and Strand MR, 1994. Factors Affecting Oviposition and Orientation by Female *Plodia interpunctella*. Proceedings of the International Working Conference on Stored product protection. 1: 561-565.

Ross MH, Ely JO and Archer JG, 1951. Alkaline Phosphatase Activity and pH Optima. Biochemical research Foundation, pp. 561-568.

Saadati Bezdi M, 2007. Study of Some Properties of α-amylase Enzyme in Wheat Bug *Eurygaster integriceps* and Comparision on Diapausing and Nondiapausing Physiological Position. M. Sc. Dissertation, University of Tabriz, 92 pp. (In Persian).

Safaei Khorram M, Farshbaf Pourabad R, Yazdanian M and Jafarnia S, 2010. Digestive α-amylase from *Leptinotarsa decemlineta* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): Response to pH, Temperature and Some Mineral Compounds. American-Eurasian Network for Scientific Information, 4(1): 101-107.

Archive of SID

www.SID.ir

Strobl S, Wiegand G and Glockshuber R, 1998. Crystal Structure of Yellow Meal Worm α-Amylase at 1.64 Å Resolution. Molecular Biology, 278: 617-628.

Tomiya N, Narang S, Park J, Abdul-RAhman B, Choi O, Singh S, Hiratake J, Sakata K, Betenbaugh MJ, Palter KB and Lee YC, 2006. Purification, Characterization, and Cloning of a *Spodoptera frugiperda* Sf9 *β-N*-Acetylhexosaminidase that Hydrolyzes Terminal *N*-Acetylglucosamine on the *N*-Glycan Core. The Journal of Biological Chemistry, 281(28): 19545-19560.

Valencia Jimenz A, Arboleda JW, Lopez A, Vila A and Grossi-de-Sa MF, 2008. Digestive α-Amylases from *Tecia solanivora* Larvae (Lepidoptera: Gelechiidae): Response to pH, Temperature and Plant Amylase Inhibitors. Bulletin of Entomological Research, 98: 575-579.

Xavier LP, Oliveira MGA, Guedes RNC, Santos AV and De-Simone SG, 2005. Trypsin-like Activity of Membrane-Bound Midgut Proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). European Journal of Entomology, 102: 147-153.

Yazdanian M, 2006. Study of Some Properties of α-amylase Enzyme in the Salivary Glands of *Graphosoma lineatum* (Hem., Scutelleridae). PhD Dissertation. University of Tabriz, 243 pp. (In Persian).

Archive of SID

www.SID.ir