اثر چند ترکیب مختلف روی فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep., Pyralidae)

مجید جعفرلو[1]، رضا فرشباف پورآباد[2*] و مصطفی ولیزاده[3]

[1]دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[2] استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[3] استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* مسئول مکاتبه: rfpourabad@yahoo.com

تاریخ دریافت: 91/8/21 تاریخ پذیرش: 92/4/15

چکیده

در این بررسی اثر هفت نوع ترکیب مختلف روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی لاروهای سن پنجم افراد نر و ماده شب‌پره مدیترانه‌ای آرد مطالعه گردید. میزان فعالیت ویژه آنزیم با استفاده از کیت تشخیص فعالیت آلفا- آمیلاز اندازه‌گیری شد. غلظت پروتئین کل در نمونه‌های آنزیمی به روش بردفورد تعیین گردید. تأثیر درجات مختلف اتانول (صفر، 25، 50، 75، 85 و 96 درصد) و غلظت‌های صفر، 1، 2، 3، 4 و 5 میلی‌مولار NaCl، EDTA، Tris، SDS نیترات منیزیم و فسفات پتاسیم روی فعالیت آنزیم در لاروهای نر و ماده بررسی شد. میانگین‌های مربوط به اثر اتانول روی فعالیت آنزیم دارای اختلاف معنی‌دار بودند و بیش‌ترین میزان مهار آنزیم توسط الکل 96 درصد صورت گرفت. فعالیت آنزیم در غلظت‌های یک تا پنج میلی‌مولار NaCl در لاروهای هر دو جنس دارای اختلاف معنی‌دار بود و با افزایش غلظت NaCl میزان فعالیت آنزیم کاهش یافت. با افزایش غلظت SDS فعالیت آنزیم کاهش پیدا کرد طوری‌که بیش‌ترین فعالیت آنزیم لاروهای نر و ماده در غلظت یک میلی‌مولار و کم‌ترین فعالیت در غلظت پنج میلی‌مولار مشاهده شد. اثر غلظت‌های مختلف EDTA روی فعالیت آنزیم در لاروهای ماده دارای اختلاف معنی‌دار بود ولی در لاروهای نر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. اثر غلظت‌های مختلف Tris روی فعالیت آنزیم در هر دو جنس دارای اختلاف معنی‌دار بود و با افزایش غلظت از فعالیت آنزیم کاسته شد. فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف نیترات منیزیم اختلاف معنی‌داری را نشان داد و با افزایش غلظت، میزان فعالیت آنزیم کاهش پیدا کرد. فعالیت آنزیم در غلظت‌های مختلف فسفات پتاسیم در لاروهای نر و ماده دارای اختلاف معنی‌دار بود و با افزایش غلظت از یک به پنج میلی‌مولار، فعالیت آنزیم افزایش پیدا نمود. آگاهی از چگونگی تأثیر مواد مختلف روی فعالیت آنزیم‌های آلفا- آمیلاز می‌تواند در امر شناسایی و تهیه مهارکننده‌های آنزیم‌ها برای کنترل با آفات موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: اتانول، یون‌های فلزی، EDTA، NaCl، SDS، Tris

مقدمه

شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) یکی از آفات مهم انباری می‌باشد و از این حشره به‌عنوان میزبان واسط آزمایشگاهی برای پرورش برخی عوامل کنترل زیستی استفاده می‌شود (سپاسگزاریان 1357 ، فتحی‌پور و مغانلو 1382). این آفت سالیانه

خسارت زیادی به محصولات انباری دارای نشاسته وارد می‌کند (کوکس و بل 1991). در حال حاضر، مؤثرترین روش کنترل این آفت استفاده از مواد شیمیایی تدخینی است (عباداللهی و همکاران 2010) که با توجه به اثرات مخرب زیست‌محیطی و انسانی آن‌ها (ایسمان 2000)، به‌کارگیری مهارکننده‌های طبیعی و مصنوعی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز می‌تواند از گزینه‌های مناسب مقابله با این آفت باشد. در سال‌های اخیر به‌کارگیری روش‌های جدید و کم‌خطر برای محیط‌زیست، انسان و موجودات غیرهدف، بیش از پیش مورد توجه محققان قرار گرفته است (ایسمان 2000 ، عباداللهی و همکاران 2010). به‌ویژه به دلیل بروز مقاومت به حشره‌کش‌ها، لزوم به‌کارگیری روش‌های جدید کنترل آفات بیشتر از قبل احساس می‌شود (عباداللهی و همکاران 2010). از آن‌جایی که در آزمایشگاه‌ها از ترکیباتی مانند اتانول استفاده می‌شود و موادی مثل NaCl، SDS و Tris در بافرهای مورد استفاده در آزمایش‌های سنجش فعالیت آنزیم‌ها به‌کار می‌روند، ضروری است تأثیر احتمالی این ترکیبات روی فعالیت آنزیم بررسی شود.

آنزیم آلفا-آمیلاز اندوآمیلازی است که در مواد نشاسته‌ای روی واحدهای آمیلوز و آمیلوپکتین عمل و حلقه α-D-(1,4)-glucan را هیدرولیز می‌کند (استروبل و همکاران 1998). به‌دلیل این‌که آنزیم آلفا- آمیلاز یک متالوآنزیم است و یون‌های فلزی روی فعالیت آن تأثیر می‌گذارند، اثر یون‌های فلزی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در خور بررسی می‌باشد. اثر ترکیبات مختلف روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز توسط محققان مختلف بررسی شده است. در این بین، مطالعه اثر یون‌های فلزی روی فعالیت این آنزیم بیش از همه مد نظر محققان بوده است (ماگل و همکاران 1982، هور و همکاران 2001، باباکان و راند 2006، رید 2007، وارالاکشمی و همکاران 2009 ، مونتریو و اولیویرا 2010) و مشاهده شده است که یون‌های فلزی با اثر تحریکی خود روی یون‌های کلسیم آنزیم آلفا- آمیلاز، در فعالیت آن اثر می‌گذارند (پاداياچی 2006). مشاهده گردیده که نسبت‌های مختلف یون‌های فلزی سبب مهار فعالیت آلفا- آمیلاز می‌شود (داس و همکاران 1998). تأثیر مواد پرکاربرد آزمایشگاهی مثل NaCl، SDS، EDTA، Tris و اتانول روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز حشراتی مانند سن *Graphosoma lineatum* (یزدانیان و فرشباف پورآباد 2007، یزدانیان و همکاران 1389)، شب‌پره هندی (رشیدی 1386)، سن *Eurygaster maura* (مهرآبادی و بندانی 2009)، سوسک کلرادوی سیب‌زمینی (صفائی خرم و همکاران 2010)، سوسک چینی حبوبات *Callosobruchus chinensis* (پودولر و اپل‌بائوم 1971) و باکتری‌هایی مانند *Archaeon thermococcus* (چانگ و همکاران 1995) و *Bacillus amyloliquefaciens* (لیائو و سیو 2009) بررسی شده است و در بیشتر موارد، SDS موجب مهار فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز گردیده است، ولی EDTA و NaCl سبب مهار یا فعال‌کردن فعالیت آنزیم شده‌اند و یا روی فعالیت آن تأثیری نداشته‌اند. SDS و EDTA با تأثیر روی یون‌های کلسیم موجود در ساختمان آلفا- آمیلاز، در فعالیت آن تأثیر می‌گذارند (پاداياچی 2006 ، آشابیل و همکاران 2008). تأثیر Tris روی فعالیت آنزیم به‌علت ایجاد پیوند با آنزیم در محل‌های فعال آن می‌باشد (سوسیک و همکاران 2007). اتانول نیز باعث رسوب پروتئین‌های خاص و کاهش فعالیت آنزیمی می‌شود (راجو و همکاران 2010).

در این پژوهش اثر مهار کنندگی یا فعال‌کنندگی چند ماده معدنی و آلی روی آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد مورد آزمون قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پرورش شب‌پره مدیترانه‌ای آرد

برای پرورش شب‌پره مدیترانه‌ای آرد از کلنی موجود در گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز استفاده گردید. این شب‌پره به‌مدت پنج نسل روی آرد گندم پرورش داده شد. دمای آزمایشگاه در طی دوره پرورش 26±1°C،

رطوبت نسبی 5 ±50 درصد و شرایط نوری به‌صورت 16 ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی بود. برای پرورش این حشره از ظروف پلاستیکی به ابعاد 30 × 20 × 10 سانتی‌متر که تا ارتفاع سه سانتی‌متر به داخل آن‌ها آرد ریخته شده بود، استفاده گردید (فیلیپس و استراند 1994). به ازای هر دو کیلوگرم آرد نیم گرم تخم شب‌پره به‌کار رفت و تخم‌ها به‌صورت یکنواخت روی سطح آرد پخش گردیدند. برای تخم‌گیری از ظروف استوانه‌ای شفاف به ارتفاع 30 و قطر 10 سانتی‌متر استفاده شد (ایرانی‌پور و همکاران 2009).

تشریح و آماده‌سازی نمونه‌های آنزیمی

لاروهای سن پنجم 24ساعته شب پره مدیترانه‌ای برای تشریح مورد استفاده قرار گرفتند. بدن لاروها از پهلو شکافته شده و بخش انتهایی آن با قیچی مخصوص تشریح و به کمک پنس قطع و دستگاه گوارش خارج گردید. لوله‌های مالپیگی، اجسام چربی و بقیه بخش‌ها از دستگاه گوارش حذف و ابتدا و انتهای آن بریده شد تا فقط روده میانی باقی بماند (یزدانیان 1385) سپس روده‌ها به درون میکروتیوب‌های 1/5 میلی‌لیتری حاوی یک میلی‌لیتر بافر فسفات سرد با pH برابر هفت منتقل گردیدند. در نهایت محتویات میکروتیوب‌ها با استفاده از دستگاه هموژنایزر مدل Ultra Turrax T8 همگن شده و میکروتیوب‌ها به‌مدت پنج دقیقه در دمای 4°C و با سرعت 10000 g سانتریفیوژ شدند. محلول روشناور به‌عنوان منبع آنزیمی در میکروتیوب‌های 1/5 میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید تا در سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گیرد.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

میزان فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز با استفاده از کیت تشخیص آلفا- آمیلاز (در سرم، پلاسما یا ادرار با روش فتومتریک) ساخت شرکت پارس آزمون و توسط دستگاه اتوآنالایزر مدل Alcyon 300 در دمای 37 °C اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز به‌صورت واحد بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) محاسبه گردید (یزدانیان 1385).

تعیین غلظت پروتئین در نمونه‌های آنزیمی

برای تعیین غلظت پروتئین کل در نمونه‌های آنزیمی از روش بردفورد (1976) استفاده شد. میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 595 نانومتر اندازه‌گیری و با توجه به موجود بودن اطلاعات مربوط به مقدار غلظت پروتئین در محلول‌های استاندارد که با استفاده از پروتئین سرم گاوی تهیه شده بودند، نمودار استاندارد ترسیم و غلظت پروتئین در محلول‌های آنزیمی محاسبه گردید.

اثر اتانول روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

اتانول با استفاده از آب مقطر در پنج غلظت 25، 50، 75، 85 و 96 درصد تهیه و آب مقطر به‌عنوان شاهد استفاده گردید. به هر میکروتیوب 500 میکرولیتر از هر غلظت و 300 میکرولیتر از محلول آنزیمی اضافه شد و فعالیت آنزیمی پس از 15 دقیقه نگه‌داری در دمای اتاق (بین 30°C - 25) توسط اتوآنالایزر اندازه‌گیری گردید.

اثر ترکیبات مختلف روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

برای تعیین اثر غلظت‌های مختلف SDS، Tris، EDTA، NaCl، نیترات منیزیم و فسفات پتاسیم روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز، غلظت‌های یک تا پنج میلی‌مولار از این ترکیبات به‌فاصله یک واحد در آب مقطر تهیه شدند و از آب مقطر به‌عنوان شاهد استفاده گردید.

تجزیه آماری داده‌ها

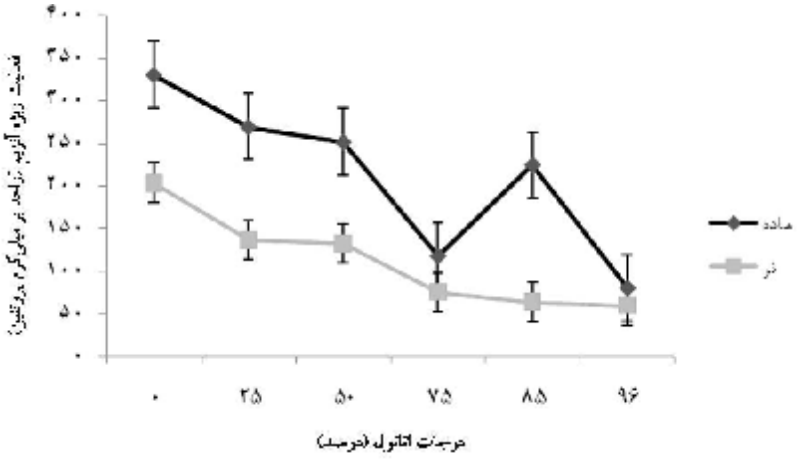
برای مطالعه اثر اتانول، فسفات پتاسیم، نیترات منیزیم، SDS، EDTA، NaCl و TRIS بر فعالیت آنزیم

آلفا- آمیلاز از طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار استفاده شد. بررسی نرمال بودن داده‌های آزمایشی، انجام تبدیل داده مناسب در صورت لزوم، تجزیه واریانس‌ها و مقایسه میانگین‌ها به روش تست چنددامنه‌ای دانکن با نرم‌افزار MSTAT-C انجام و از نرم‌افزار Excel 2007 نیز برای رسم نمودارهای مربوطه استفاده گردید.

نتایج و بحث

اثر اتانول روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

اثر غلظت‌های مختلف اتانول روی فعالیت آنزیم در لاروهای نر ($F=1160/56$، $df=5$، $P<0/01$) و ماده ($F=1160/56$، $df=5$، $P<0/01$) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. پس از شاهد، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم، هم در لاروهای نر و هم در ماده‌ها (به ترتیب 136/2 و 269/1 واحد بر میلی‌گرم پروتئین) در الکل 25 درصد مشاهده شدند که با میانگین‌های سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بودند. الکل 96 درصد نیز سبب بیش‌ترین مهار فعالیت آنزیم در هر دو جنس نر و ماده شد (به ترتیب 59/3 و 80/22 واحد بر میلی‌گرم پروتئین) (شکل 1). بر اساس مطالعه‌های انجام گرفته، اثر غلظت‌های مختلف اتانول روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی سن *G. lineatum* (یزدانیان و فرشباف پورآباد 2007) و آلفا- آمیلاز روده میانی لاروهای شب‌پره هندی (رشیدی 1386) معنی‌دار بود. بیش‌ترین فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در شب‌پره هندی در غلظت‌های 25 و 50 درصد اتانول مشاهده گردید و کم‌ترین میزان فعالیت آن نیز در الکل 96 درصد دیده شد (رشیدی 1386). در مورد سن *G. lineatum* بیش‌ترین مهارکنندگی توسط غلظت 75 درصد صورت گرفت (یزدانیان و فرشباف پورآباد 2007). اتانول دارای این ویژگی است که پروتئین‌های خاصی را رسوب می‌دهد و به‌نظر می‌رسد که آرایش ویژه بین گروه هیدروکسیل الکل و پیوند پپتیدی یک پروتئین سبب این رسوب و باعث کاهش فعالیت آنزیم‌هایی مانند آلفا- آمیلاز و لیپاز می‌شود (راجو و همکاران 2010).



شکل 1 - فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در درجات مختلف اتانول (دمای 37°C و pH=7)

اثر NaCl روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

اثر غلظت‌های مختلف NaCl روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز روده میانی لاروهای نر ($F=225/4$، $df=5$، $P<0/01$) و ماده ($F=119/26$، $df=5$، $P<0/01$) شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با افزایش غلظت NaCl میزان فعالیت آنزیمی کاهش یافت طوری‌که کم‌ترین و بیش‌ترین فعالیت آنزیم (0/485 و 6/203 واحد بر میلی‌گرم پروتئین در لاروهای ماده؛

صفر و 4/467 واحد بر میلی‌گرم پروتئین در لاروهای نر) به‌ترتیب در غلظت‌های پنج و یک میلی‌مولار مشاهده شدند. روند تغییرات فعالیت آنزیمی در حشرات نر و ماده مشابه بود و فعایت آنزیم در لاروهای نر در غلظت پنج میلی‌مولار به صفر رسید (شکل 2). فعالیت آلفا- آمیلاز بزاقی در سن *E. maura* توسط مهرآبادی و بندانی (2009) مطالعه و مشخص گردید که فعالیت آن در حضور NaCl افزایش پیدا کرد. فعال‌شدن آنزیم آلفا- آمیلاز در حضور یون Cl^- در بسیاری از پستانداران، باکتری‌ها و نماتدها نیز گزارش شده است (راوان و همکاران 2009). بویر و هارتمن (1971) مشاهده کردند که NaCl به تنهایی و به همراه استات کلسیم، سبب افزایش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز *Streptococcus* sp. شد. هم‌چنین، هوری (1969 و 1971) گزارش کرد که NaCl روی آلفا- آمیلاز بزاقی سن *Lygus disponsi* اثر فعال‌کنندگی داشت. وی پیشنهاد کرد فعال‌شدن آنزیم به‌علت وجود یون Cl^- است. با وجود این، آلفا- آمیلاز در برخی از حشرات مانند *C. chinensis* و *Bombyx mori* توسط Cl^- مهار شد (آبراهام و همکاران 1992). NaCl سبب کاهش فعالیت آنزیم آمیلاز در *Penaeus japonicus* (ماگل و همکاران 1982)، *Tricholoma matsutake* (هور و همکاران 2001)، *Bifidobactrium bifidum* (رید 2007) و آلفا- آمیلاز *Aspergillus niger* شد (وارالاکشمی و همکاران 2009). در بررسی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی سن *G. lineatum* (یزدانیان و همکاران 1389) و آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره *Plodia interpunctella* (رشیدی 1386) نیز با افزایش غلظت NaCl میزان فعالیت آنزیم کاهش یافت. نمک‌ها ساختمان دوم یا سوم پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهند و وجود نمک در یک محلول آنزیمی می‌تواند روی ساختار آنزیم تأثیر گذاشته و سبب تغییر پیکربندی[1] پروتئین شود (میقانی و ابراهیم‌زاده 1382). هم‌چنین، به‌علت رقابت بین کاتیون وابسته به آنزیم[2] و یون‌های سدیم، فعالیت آنزیم تحت تأثیر قرار می‌گیرد (رید 2007).

اثر SDS روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

اثر غلظت‌های یک تا پنج میلی‌مولار SDS روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لاروهای سن پنجم نر ($F=31/192$، $df=5$، $P<0/01$) و ماده ($F=64/160$، $df=5$، $P<0/01$) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با افزایش غلظت SDS میزان فعالیت آنزیم کاهش پیدا کرد طوری‌که پس از شاهد، بیش‌ترین فعالیت آنزیم در نر و ماده در غلظت یک میلی‌مولار (به ترتیب 26/67 و 39/09 واحد بر میلی‌گرم پروتئین) و کم‌ترین فعالیت نیز در غلظت پنج میلی‌مولار (به ترتیب 6/340 و 8/297 واحد بر میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد (شکل 3). در بررسی اثر انواع ترکیبات (کلرید سدیم، اتانول، فسفات منیزیم، نیترات منیزیم، SDS، فسفات کلسیم، EDTA و Tris) روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی، بیش‌ترین مهارکنندگی توسط SDS صورت گرفت (صفائی خرم و همکاران 2010). اثر SDS روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی *G. lineatum* (یزدانیان و همکاران 1389) و آلفا- آمیلاز روده میانی *P. interpunctella* (رشیدی 1386) معنی‌دار بود و با افزایش غلظت، فعالیت آنزیم کاهش یافت. در بررسی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی سن *E. maura* نیز همانند بسیاری از آمیلازهای جانوری، SDS سبب کاهش فعالیت آنزیم گردید (مهرآبادی و بندانی 2009) . چانگ و همکاران (1995) اظهار نمودند که SDS سبب مهار فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز خارج‌سلولی در *A. thermococcus* شد. به‌نظر می‌رسد که یون‌های سدیم در ساختمان SDS به‌عنوان پل‌های یونی بین دو اسید آمینه مجاور عمل می‌کنند و با اثر تحریکی خود روی یون‌های

[1] Configuration

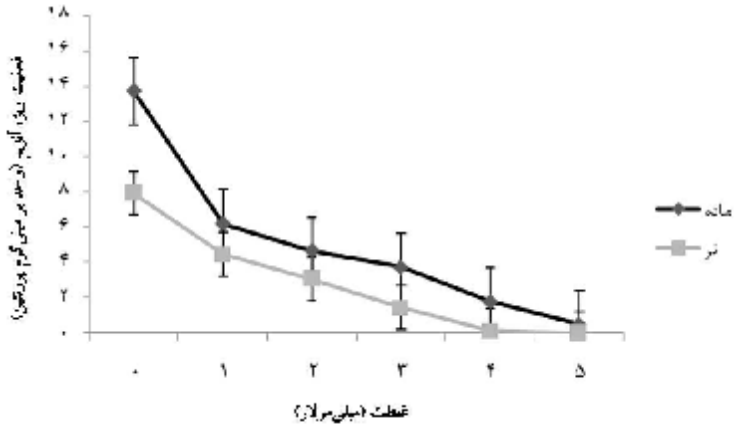
[2] Protein-associated Cation

کلسیم موجود در ساختمان آنزیم آلفا- آمیلاز سبب کاهش فعالیت آن می‌شوند (پادایاچی 2006).

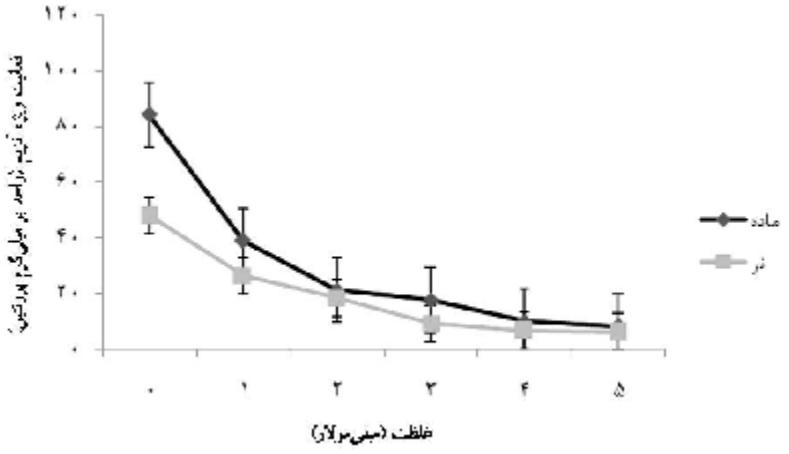
اثر EDTA روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

اثر غلظت‌های مختلف EDTA روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لاروهای سن پنجم ماده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (F=10/5، df=5، P<0/01) و بیش‌ترین فعالیت آنزیم (2/189 واحد بر میلی‌گرم پروتئین در لاروهای نر و 2/004 واحد بر میلی‌گرم پروتئین در لاروهای ماده) در شاهد مشاهده گردید. با افزایش غلظت EDTA، فعالیت آنزیم لاروهای ماده کاهش یافت. در جنس نر بین میانگین‌های مربوط به غلظت‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل 4).

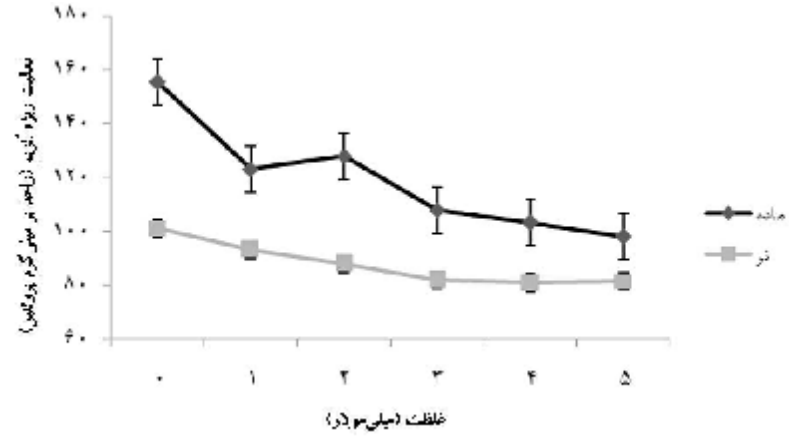
در یک بررسی روی سن *E. maura* فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی با افزودن EDTA، اوره و SDS مهار شد (مهرآبادی و بندانی 2009). اثر EDTA روی فعالیت کلی آنزیم آلفا- آمیلاز سن *G. lineatum* معنی‌دار نبود، بیش‌ترین فعالیت آنزیم در حشرات ماده و غلظت‌های یک و دو میلی‌مولار به‌دست آمد (یزدانیان و همکاران 1389). در مطالعه تأثیر برخی بازدارنده‌ها روی فعالیت آلفا- آمیلاز روده میانی سوسک کلرادوی سیب‌زمینی، EDTA باعث مهار فعالیت آنزیمی گردید (صفائی خرم و همکاران 2010). فعالیت آلفا- آمیلاز سوسک چینی حبوبات نیز درحضور یون کلر و EDTA مهار گردید (پودولر و اپل‌بائوم 1971). وجود یون کلسیم در ساختمان آلفا-آمیلاز برای حفظ ساختمان سوم آن ضروری است (باباکان و راند 2006). آلفا- آمیلاز یک متالوآنزیم و دارای یون کلسیم است و EDTA لیگاندی است که اتم‌های آن در اطراف یون کلسیم واقع هستند، به‌همین دلیل و نیز تأثیری که EDTA روی یون‌های کلسیم آنزیم آلفا- آمیلاز دارد، به تناسب میزان تأثیر موجب مهار فعالیت آنزیمی می‌شود و یا روی آن تاثیری نخواهد داشت (آشابیل و همکاران 2008).



شکل 2 - فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در غلظت‌های مختلف **NaCl** (دمای **37°C** و**pH=7**)



شکل 3 - فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در غلظت‌های مختلف **SDS** (دمای **37°C** و**pH=7**)



شکل 4 - فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در غلظت‌های مختلف **EDTA** (دمای **37°C** و**pH=7**)

اثر Tris روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

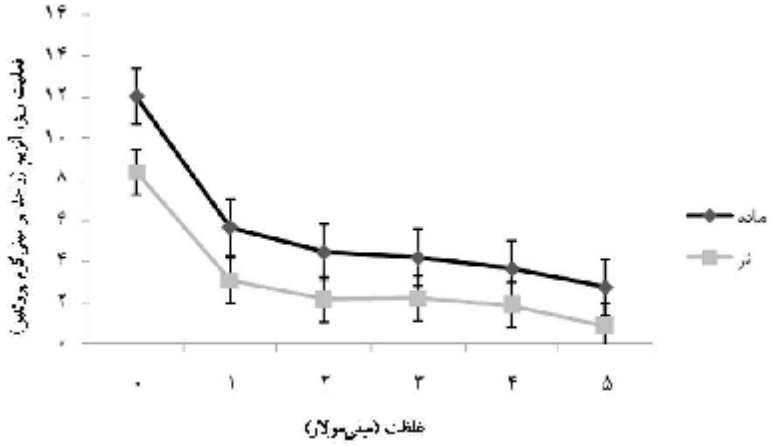
اثر غلظت‌های مختلف Tris روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لاروهای نر (F=7/24، df=5، P<0/01) و ماده (F=10/4، df=5، P<0/01) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و روند مشابهی از نظر فعالیت آنزیم در حشرات نر و ماده مشاهده شد. بیش‌ترین فعالیت آنزیم به ترتیب در شاهد و غلظت‌های 1، 2، 3، 4 و 5 میلی‌مولار به‌دست آمد و با افزایش غلظت Tris فعالیت آنزیم نیز کاهش پیدا کرد (شکل 5). اثر غلظت‌های مختلف Tris روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره هندی معنی‌دار بود و با افزایش غلظت آن، فعالیت آنزیم کاهش پیدا کرد (رشیدی 1386). در بررسی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی سوسک کلرادو افزایش غلظت Tris سبب کاهش فعالیت آنزیم گردید (صفائی خرم و همکاران 2010) که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق هم‌خوانی دارد. یزدانیان و همکاران (1389) گزارش کردند که اثر غلظت‌های مختلف Tris روی فعالیت کلی آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی سن *G. lineatum* معنی‌دار نبود و بیش‌ترین فعالیت آنزیم در سن‌های کامل افراد ماده مشاهده شد. هم‌چنین، در تعیین برخی ویژگی‌های آنزیم‌های آلفا- آمیلاز بزاقی سن‌های *Lygus hesperus* و *L. lineolaris* مشخص گردید که Tris باعث مهار فعالیت

آنزیم گردید ولی با ادامه انکوباسیون، مهار آنزیم کاهش پیدا کرد (زنگ و کوهن 2000). تأثیر Tris روی فعالیت

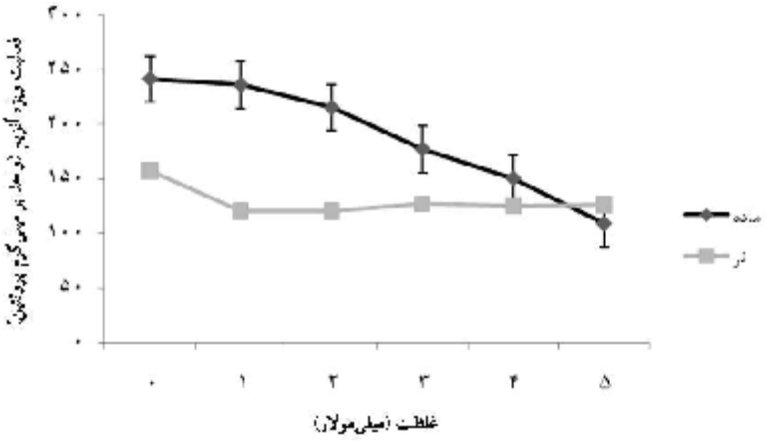
آنزیم آلفا- آمیلاز به‌علت ایجاد پیوند با آنزیم در محل‌های فعال آن می‌باشد (سوسیک و همکاران 2007).

اثر نیترات منیزیم روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

اثر نیترات منیزیم روی فعالیت آنزیم، هم در لاروهای نر (F=37/26، df=5، P<0/01) و هم در لاروهای ماده (F=28/22، df=5، P<0/01) معنی‌دار بود و افزایش غلظت آن سبب کاهش فعالیت آنزیم شد. هم‌چنین، فعالیت آنزیم در جنس ماده، از غلظت صفر (شاهد) به سمت غلظت‌های بالاتر نیترات منیزیم دارای یک روند مشخص نزولی بود که در جنس نر مشاهده نگردید (شکل 6). در مطالعه ی دیگری، اثر برخی مواد معدنی روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی سن گندم، تأثیر کلرید منیزیم، نیترات منیزیم و سولفات منیزیم روی فعالیت آنزیم بررسی و مشخص شد که کلرید منیزیم و نیترات منیزیم فعالیت آنزیم را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند (سعادتی بزدی و همکاران 2008). یون‌های سدیم، پتاسیم و منیزیم فعالیت آلفا- آمیلاز را در قارچ *Aspergillus oryzae* به‌طور قابل ملاحظه‌ای مهار کردند (راماچاندران و همکاران 2004). بررسی اثر غلظت‌های مختلف استات منیزیم روی فعالیت آنزیم‌های آمیلاز سوسک چینی حبوبات نشان داد که این ترکیب فعالیت آمیلازها را متوقف می‌سازد (پودولر و اپل‌بائوم 1971). به گزارش محققان، یون‌های منیزیم سبب مهار فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز می‌شوند (ماگل و همکاران 1982، هور و همکاران 2001، باباکان و راند 2006، رید 2007، وارالاکشمی و همکاران 2009 و مونتریو و اولیویرا 2010). مهار فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز توسط یون‌های منیزیم به‌علت رقابت بین کاتیون‌های خارجی و یون‌های کلسیم متصل به آنزیم می‌باشد که سبب کاهش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز می‌گردد (آشابیل و همکاران 2008).



شکل 5 - فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در غلظت‌های مختلف Tris (دمای 37°C و pH=7)

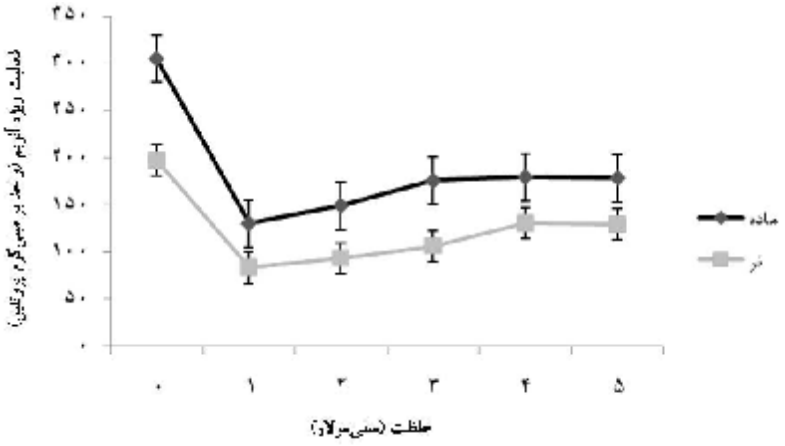


شکل 6 - فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در غلظت‌های مختلف نیترات منیزیم (دمای 37°C و pH=7)

اثر فسفات پتاسیم روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز

اثر غلظت‌های مختلف فسفات پتاسیم روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز هم در لاروهای سن پنجم نر (F=500/61، df=5، P<0/01) و هم در ماده‌ها (F=5484/68، df=5، P<0/01) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و با افزایش غلظت فسفات پتاسیم، فعالیت آنزیم افزایش یافت (شکل 7). در بررسی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی لاروهای شب‌پره هندی مشاهده شد که اثر غلظت‌های مختلف فسفات پتاسیم روی فعالیت آنزیم معنی‌دار بود و افزایش غلظت آن سبب افزایش فعالیت آنزیم شد ولی در هر حال، فعالیت آنزیم در تمامی غلظت‌های فسفات پتاسیم از شاهد کم‌تر بود (رشیدی 1386) که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مطابقت دارد. فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی سوسک کلرادو با افزایش غلظت نیترات پتاسیم افزایش یافت. فسفات پتاسیم روی فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز سوسک کلرادو تأثیر کمی داشت و به مقدار اندکی سبب کاهش فعالیت آنزیم شد (صفائی خرم و همکاران 2010). نیترات پتاسیم فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز بزاقی سن *E. maura* را افزایش داد (مهرآبادی و بندانی 2009). یون‌های فلزی به‌عنوان پل‌های یونی یا نمکی بین دو اسیدآمینه مجاور عمل می‌کنند و روی یون‌های کلسیم اثر تحریک‌کنندگی دارند (پادایاچی 2006) زیرا آلفا- آمیلازها متالوآنزیم یون‌های کلسیم هستند و برای فعالیت خود نیازمند یون‌های کلسیم می‌باشند (سیواراماکریشنان و همکاران 2006) که در بررسی اخیر، احتمالاً موجب افزایش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد گردید.

به‌عنوان یک نتیجه‌گیری کلی، اختلاف‌های مشاهده شده بین اثر مواد و یون‌های مختلف روی فعالیت آنزیم‌های آلفا- آمیلاز می‌توانند به علت تفاوت آلفا- آمیلازهای بزاقی با آلفا- آمیلازهای روده‌ای باشند. این اختلاف‌ها می‌توانند به‌وجود تفاوت در توالی‌های اسیدآمینه‌ای دامنه‌های آنزیم‌ها مربوط شوند و نه توالی‌های جایگاه‌های فعال آن‌ها. هم‌چنین، مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌های آنزیم‌ها بسته به گونه و برخی عوامل دیگر، برگشت‌پذیر (ایجاد پیوند ضعیف بین ترکیب و آنزیم) یا برگشت‌ناپذیر (ایجاد پیوند قوی بین ترکیب و آنزیم) می‌باشند. در نهایت، شرایط انجام آزمایش‌ها و مراحل نشوونمایی مورد استفاده در بررسی‌های محققان مختلف متفاوت بوده و این امر باعث بروز تفاوت در نتایج به‌دست‌آمده شده است. در هر حال، مشخص است که مواد استفاده‌شده با وجود تفاوت در اثر آن‌ها روی آنزیم‌های گونه‌های مختلف، می‌توانند آنزیم‌ها را بسته به همان دلایل ذکرشده در بالا مهار یا فعال نمایند.



شکل 7- فعالیت ویژه آنزیم آلفا- آمیلاز روده میانی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد در غلظت‌های مختلف فسفات پتاسیم (دمای 37°C و pH=7)

منابع

رشیدی ل، 1386. مطالعه برخی ویژگی‌های آنزیم آلفا-آمیلاز دستگاه گوارش شب‌پره هندی (*Plodia interpunctella*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

سپاسگزاریان ح، 1357. آفات انباری ایران و طرق مبارزه با آن‌ها. انتشارات دانشگاه تهران.

فتحی پور ی و مغانلو ه د، 1382. مقایسه برخی از پارامترهای زیستی زنبورهای پارازیتویید *Trichogramma pintoi* پرورش‌یافته روی دو گونه میزبان آزمایشگاهی متداول. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد سی و چهارم، شماره 4. صفحه‌های 881 تا 888.

میقانی ف و ابراهیم‌زاده ح، 1382. اثر تنش شوری بر آنزیم مالات دهیدروژناز دو رقم گندم. مجله رستنی‌ها، جلد چهارم، صفحه‌های 1 تا 11.

یزدانیان م، 1385. مطالعه برخی ویژگی‌های آنزیم آلفا- آمیلاز غده بزاقی سن *Graphosoma lineatum* (L.) (Het.,: Scutelleridae). پایان‌نامه دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

یزدانیان م، فرشباف پورآباد ر، رشیدی مر، ولی‌زاده م، رشتچی‌زاده ن، وطنخواه ا و حمیدی ع‌ا، 1389. اثر چند ترکیب مهارکننده آلفا-آمیلاز روی فعالیت آلفا-آمیلاز بزاقی سن *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Scutelleridae). نشریه حفاظت گیاهان، جلد بیست و چهارم، شماره 2. صفحه‌های 173 تا 186.

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 2(8): 867-873.

Ashabil A, Burhan A, Hatice K, Sadik D and Omer C, 2008. Highly thermostable and alkaline α-amylase from a alotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. Brazilian Journal of Microbiology 39: 547-553.

Babakan S and Rand AG, 2006. Characterization of honey amylase. Journal of Food Science 72(1): C050-5.

Boyer EW and Hartman PA, 1971. Extracellular transglucosylase and α-amylase of *Streptococcus equinus*. Journal of Bacteriology 106(2): 561-570.

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.

Chung YC, Kobayashi T, Kanai H, Akiba T and Kudo T, 1995. Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. Applied and Environmental Microbiology 61(4): 1502-1506.

Cox PD and Bell CH, 1991. Biology and ecology of moth pests of stored foods. Pp. 181-193. In: Gorham JR (ed.) Ecology and Management of food Industry Pests. Gaithersburg, Maryland, USA, The Association of Official Analytical Chemists.

Das MLM, Rani AS and Satyanarayana A, 1998. Effect of metal ions on the catalytic activity of amino acid acylase isolated from alpha-amylase complex. Studies in Surface Science and Catalysis 113: 911-914.

Ebadollahi A, Safaralizadeh MH, Hoseini SA, Ashouri S and Sharifian I, 2010. Insecticidal activity of essential oil of *Agastache foeniculum* against *Ephestia kuehniella* and *Plodia interpunctella* (Lep.: Pyralidae). Munis Entomology and Zoology 5(2): 785-791.

Hur TC, Ka KH, Joo SH and Terashita T, 2001. Characteristics of the amylase and its related enzymes produced by ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*. Mycobiology 29(4): 183-189.

Hori K, 1969. Effect of various activators on the salivary amylase of *Lygus disponsi*. Journal of Insect Physiology 15(12): 2305–2317.

Hori k, 1971. Physiological conditions in the midgut in relation to starch digestion and the salivary amylase of the bug *Lygus disponsi*. Journal of Insect Physiology 17(6): 1153-1167.

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.

Isman MB, 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection 19: 603-608.

Liao YC and Syu MJ, 2009. Effects of polyethyleneglycol and salt on the binding of α-amylase from the fermentation broth of *Bacillus amyloliquefaciens* by Cu^{2+} -β-CD affinity adsorbent. Carbohydrate Polymers 77(2): 344-350.

Maugle PD, Deshimaru O, Katayama T and Simpson KL, 1982. Characteristics of amylase and protease of the shrimp *Penaeus japonicus*. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 48(12): 1753-1757.

Mehrabadi M and Bandani AR, 2009. Study on salivary glands α-amylase in wheat bug *Eurygaster maura* (Hemiptera: Scutelleridae). American Journal of Applied Sciences 6(4): 555-560.

Monterio P and Oliveira PD, 2010. Application of microbial α-amylase in industry. Brazilian Journal of Microbiology 41: 850-861.

Nickavar B and Yousefian N, 2009. Inhibitory effects of six *Allium* species on α-amylase enzyme activity. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 8 (1): 53-57.

Padayachee T, 2006. Application of thermostable α-amylase from *Thermomyces lanuginosus* ATCC 58157 to nutritionally enhance starch based food. PhD Dissertation of Biotechnology, Durban University of Technology.

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.

Podoler H and Applebaum SW, 1971. The α-amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis* properties. Biochemistry Journal 121: 321-325.

Raju SN, Sathis kumar D, Banji D, Harani A, Shankar P and Kumar A, 2010. Inhibitory effects of ethanolic extract of *piper trioicum* on amylase, lipase and α-glucosidase. Der Pharmacia Lettre 2(1): 237-244.

Ramachandran S, Patel AK, Nampoothiri KM, Chandran S, Szakacs G and Soccol CR, 2004. Alpha-amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. Brazilian Archives of Biology and Technology 47 (2): 309-317.

Ravan S, Mehrabadi M and Bandani AR, 2009. Biochemical characterization of digestive amylase of wheat bug, *Eurygaster maura* (Hemiptera: Scutelleridae). African Journal of Biotechnology 8(15): 3640-3648.

Reyed M, 2007. Biosynthesis and properties of extracellular amylase by encapsulation *Bifidobactrium bifidum* in batch culture. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 1(1): 7-14.

Saadati Bezdi M, Farshbaf Pourabad R, Sadeghi H and Golmohammadi G, 2008. Some properties of α – amylase in the salivary gland of *Eurygaster integriceps* (Put) (Het. Scutelleridae). Munis Entomology and Zoology 3(2): 733-744.

Safaei Khorram M, Farshbaf Pourabad R, Yazdaniyan M and Jafarnia S, 2010. Digestive α-amylase from *Leptinotarsa decemlineta* (Coleoptera: Chrysomelidae): response to pH, temperature and some mineral compounds. American-Eurasian Network for Scientific Information 4(1): 101-107.

Sevcik J, Hostinova E, Solovicova A and Gasperic J, 2007. Structure of the complex of Saccharomycopsis *fibuligera* glucoamylase with acarbose indicates the presence of the starch-binding site in the catalytic domain. P. 32. Programme and Abstracts of the 3rd Symposium on the alpha-amylase family, Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia.

Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri KM, Soccol CR and Pandey A, 2006. Alpha-amylases from microbial sources – an overview on recent developments. Food Technology and Biotechnology 44(2): 173-184.

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.

Varalakshmi KN, Kumudini BS, Nadini BN, Solomon J, Suhas R, Mahesh B and Kavitha AP, 2009. Production and characterization of α-amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in bangalore. Polish Journal of Microbiology 58(1): 29-36.

Yazdanian M and Farshbaf Pourabad R, 2007. Inhibitory effects of different degrees of ethanol on the salivary α-amylase activity of the stripped bug, *Graphosoma lineatum (*L.). p. 89. Proceedings of the Second Plant Protection Congress of Turkey, 27-29 August. Isparta, Turkey.

Zeng F and Cohen AC, 2000. Partial characterization of α-amylase in the salivary glands of *Lygus hesperus* and *L. lineolaris*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 126(2): 9-16.

Effect of Different Compounds on Midgut α-Amylase Activity of the Mediterranean Flour Moth, *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep., Pyralidae)

M Jafarlu[1], R Farshbaf Pourabad[2*] and M Valizadeh[3]

[1]Former MSc Student of Agricultural Entomology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Professor, Dept of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: rfpourabad@yahoo.com

Received: 11 November 2012 Accepted: 06 July 2013

Abstract

In this investigation, effects of different compounds were evaluated on midgut alpha-amylase activity in male and female fifth in stars of the Mediterranean flour moth. Enzyme specific activity measured using a specific diagnostic kit for alpha-amylase. Total protein in enzyme samples was determined by Bradford's method. The effects of different degrees of ethanol (0, 25, 50, 75, 85, and 95%) and different concentrations of 0, 1, 2, 3, 4, and 5 mM of NaCl, EDTA, Tris, magnesium nitrate, and potassium phosphate were studied on larval midgut alpha-amylase. The effect of ethanol on enzyme activity was significantly different in male and female larvae and maximum enzyme inhibition occurred by 96% alcohol. Enzyme activity was significantly different in various concentrations of NaCl and it was decreased as NaCl concentration increased. Enzyme activity decreased with increasing SDS concentration and the most activity was observed in male and female larvae at the concentration of 1 mM. The concentration of 5 mM had the lowest activity levels. The effect of different concentrations of EDTA on enzyme activity in female larvae was significantly different but there was no significant difference in males. Different concentrations of Tris, showed a significant effect on enzyme activity of both sexes and enzyme activity decreased due to the increasing of Tris concentration. There was a significant difference among enzyme activities in different concentrations of magnesium nitrate, and enzyme activity decreased when the concentration increased. Enzyme activities in different concentrations of potassium phosphate showed a significant difference and increased due to the increase of concentration from 1 up to 5 mM. Having good understanding about the mode of action of different compounds on alpha-amylases can help us to identify the enzyme inhibitors and their application in pest control.

Keywords: Ethanol, Metal ions, EDTA ،NaCl ،SDS ، Tris