

## فعالیت لیپاز روده‌ای کرم غوزه‌ی پنبه *Helicoverpa armigera* Hb. و اثر چند ترکیب آزمایشگاهی بر آن

مسعود چمنی<sup>۱</sup>، رضا فرش‌باف پورآباد<sup>۲\*</sup> و مصطفی ولیزاده<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

۲- اساتید دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

\*مسئول مکاتبه [rfpourabad@yahoo.com](mailto:rfpourabad@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۴

### چکیده

کرم غوزه‌ی پنبه *Helicoverpa armigera* یکی از آفات مهم گیاهان زراعی در اکثر نقاط دنیا می‌باشد. بدیهی است که فهم فیزیولوژی گوارشی آفات، یکی از گام‌های اساسی در شناخت سازوکار زیستی و کنترل شیمیایی و بیولوژیک مبتنی بر سم و بیمارگرها است. در این پژوهش برخی ویژگی‌های آنزیم لیپاز گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه مورد بررسی قرار گرفتند. فعالیت آنزیم در تیمارهای مختلف توسط روش کروموزنیک و دستگاه اتوآنالیزر اندازه‌گیری شد. بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم به ترتیب در لاروهای سن ششم و حشرات کامل نر مشاهده گردید. همچنین، بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ۴۰ درجه‌ی سلسیوس مشاهده شد. pH بهینه فعالیت لیپاز این حشره برابر ۹/۵ به دست آمد. در دمای زیر ۲۰- درجه‌ی سلسیوس، فعالیت آنزیم در هفته‌ی هشتم به ۱۷ درصد مقدار آن در هفته‌ی اول رسید در حالیکه در دمای چهار درجه، فعالیت آنزیم پس از پنج هفته، شش درصد مقدار آن در هفته اول بود و پس از آن کاملاً متوقف گردید. نتایج مربوط به بررسی میزان فعالیت آنزیم در زمان‌های مختلف گرسنگی لاروها نشان داد که پس از ۴ روز گرسنگی، فعالیت آنزیم کاهش پیدا می‌کند و تقریباً ۹ درصد مقدار آن در لاروهای تغذیه‌کرده بود. فعالیت آنزیم توسط اتانول ۹۶ درصد، غلظت‌های سه، چهار و پنج میلی‌مولار NaCl، غلظت‌های سه، چهار و پنج میلی-مولار CaCl<sub>2</sub> و غلظت‌های مختلف SDS کاهش و به وسیله غلظت یک و دو میلی‌مولار NaCl و غلظت پنج میلی-مولار KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> افزایش یافت. غلظت‌های مختلف Tris و EDTA، غلظت‌های تا چهار میلی‌مولار KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> و نیز غلظت ۲۵ درصد اتانول روی فعالیت آنزیم تاثیری نداشتند.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنزیمی، کرم غوزه‌ی پنبه، لیپاز.

### مقدمه

همکاران (۲۰۰۳). این آفت به طور عمده میوه‌ها و جوانه‌های انتهایی (متیوز ۱۹۹۹)، غنچه‌ها، گل‌ها و غوزه‌های پنبه و نیام بقولاتی مثل نخود، لوبیا و سویا (خانجانی ۱۳۸۵) و میوه‌های نارس گوجه فرنگی، ساقه و خوشه ذرت را مورد حمله قرار می‌دهد (اسمیت و همکاران ۱۹۹۲).

آنزیم‌ها پلی‌مرهای زیستی هستند که واکنش‌های شیمیایی را طوری کاتالیز می‌کنند که بسته به ویژگی‌های زیستی به حفظ حیات و تولید مثل می‌انجامد.

کرم غوزه‌ی پنبه از اکثر کشورهای اروپایی و آسیایی و بعضی کشورهای آفریقایی و آفریقای جنوبی گزارش شده و در ایران نیز گسترش وسیعی دارد (اسمیت و همکاران ۱۹۹۲). این حشره به بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی در سراسر جهان حمله می‌کند (رابرت و همکاران ۲۰۰۷). کرم غوزه‌ی پنبه دارای میزبان‌های درجه دوم نیز هست که عبارتند از: گل میخک، رز، گل داودی، یونجه، سویا، نخود فرنگی و سورگوم (وینت و

تولید مثل، نشو و نما، دفاع در برابر بیمارگرها، تنش اکسیداتیو و علامت‌دهی فرومونی اهمیت زیادی دارد (هورن و همکاران ۲۰۰۹). مطالعات انجام گرفته در مورد لیپاز حشرات اندک می‌باشد لیپاز گوارشی در حشرات و بالاخص در راسته بالپولکداران دارای اهمیت فراوانی است و مطالعات زیادی در مورد پایداری و خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی آن توسط محققان انجام شده است و اغلب روی اجسام چربی متمرکز بوده‌اند (اورسجلیک و همکاران ۲۰۰۷). لیپازها از سلول‌های روده میانی تولید می‌شوند و قادر هستند تا تری آسید گلیسرول‌ها را هیدرولیز کنند که با تشکیل مونوآسید گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد همراه است. لیپازها در سلول‌های روده میانی تری آسید گلیسرول را به مونوآسید گلیسرول و اسید چرب آزاد هیدرولیز می‌کنند. (کاناوسو و همکاران ۲۰۰۱).

زیبایی و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنزیم‌های لیپاز و اینورتاز را در روده میانی و غدد بزاقی کرم ساقه خوار برنج (*Chilo suppressalis* Walker) مورد بررسی قرار داده و pH و دمای بهینه، برای هر دو آنزیم را به ترتیب ۱۰ تا ۱۱ و ۳۷ الی ۴۰ درجه‌ی سلسیوس گزارش کردند. مطالعات تئو و وودرینگ (۱۹۸۸) روی آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز گوارشی سیرسیرک خانگی (*Acheta domesticus* L.) نشان داد که pH بهینه برای پروتئاز ۷/۶ و برای لیپاز ۸ می‌باشد. فعالیت پروتئاز از دمای ۲۰ تا ۴۵ درجه روند افزایشی داشته و در ۵۰ درجه‌ی سلسیوس متوقف شد. بیشترین فعالیت لیپاز در ۳۵ درجه‌ی سلسیوس بوده و مدت زمان مهار ۵۰ درصد آنزیم ( $IT_{50}$ ) در دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس برای پروتئاز ۶۲ دقیقه و برای لیپاز ۴۸ دقیقه بود. پنج روز گرسنگی موجب کاهش ۷۴ درصدی فعالیت کلی و کاهش ۷۲ درصدی فعالیت ویژه پروتئاز، و کاهش ۶۰ درصدی فعالیت کلی و ۳۵ درصدی فعالیت ویژه لیپاز (فعالیت بر میلی

(محمدی ۱۳۸۴). مطالعه سامانه گوارشی حشرات در راستای یافتن روش‌های کنترلی بر اساس ایجاد اختلال در آن در راس کار محققین مختلف بوده‌است (لاورنس و کوندال ۲۰۰۲). آنزیم‌های لیپاز هیدرولازهای تری آسید گلیسرول (EC 3.1.1.3) هستند که پیوندهای کربوکسیل استر را در دی آسید گلیسرول‌ها، گالاکتولیپیدها و فسفولیپیدها و به‌ویژه در تری آسید گلیسرول‌ها شکسته و در نتیجه، نقش کلیدی را در کنترل جذب، انتقال و بهره‌برداری از لیپید جانداران ایفا می‌کنند (هورن و همکاران ۲۰۰۹). این آنزیم‌ها عموماً محلول در آب بوده و واکنش‌های هیدرولیتیک پس از جذب آنزیم‌ها به یک سطح آب-روغن رخ می‌دهند (شارما و همکاران ۲۰۰۱؛ مرداکوویچ و همکاران ۲۰۰۸؛ حسن و همکاران ۲۰۰۹). لیپازها در مدیریت آفات حشره‌ای نیز توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند، به‌طوری‌که با توجه به نقش تعیین‌کننده آن‌ها در هضم لیپیدهای ترکیبات غذایی و جابجایی این لیپیدها در حشرات، اهداف بالقوه‌ای برای ایجاد حشره‌کش‌های جدید می‌باشند (مرداکوویچ و همکاران ۲۰۰۸). ظهور حشرات کامل در بالپولکداران ارتباط زیادی با ذخیره‌سازی لیپیدی در دوران لاروی به ویژه در سنین آخر لاروی و پیش شفیرگی دارد. روغن شفیرگی<sup>۱</sup> موجود در پيله‌های پروانه‌ی کرم ابریشم (*Bombyx mori* L.) به مقادیر زیادی دارای اسیدهای آمینه پالمیتیک، اولئیک، لینولئیک و لینولینیک می‌باشد (ماجومدر و سنگوپتا ۱۹۷۹). لیپیدها همچنین به عنوان ذخایر انرژی در زمان گرسنگی عمل می‌کنند. هنگامی که حشرات کامل کرم شاخدار توتون (*Manduca sexta* L.) گرسنه هستند لیپیدهای ذخیره شده در بافت‌های چربی به همولنف حشره آزاد می‌شوند (زیگلر، ۱۹۹۱). آنزیم لیپاز در حشرات برای بهره‌برداری از چربی‌ها، ذخیره‌سازی و انتقال آن‌ها دارای نقش‌های کلیدی است. همچنین در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک مانند

<sup>۱</sup>Chrysalis oil

سر ملاک تشخیص سن قرار می‌گیرد. با استفاده از این روش محدودده‌ی مورد نیاز برای تشخیص سنین لاروی معین شده و در مراحل مختلف تشریح مورد استفاده قرار گرفت.

### تشریح لاروها و تهیه محلول آنزیمی

برای خارج ساختن لوله گوارش لاروهای سنین چهار، پنج و شش ابتدا لاروها روی یخ گذاشته شدند تا کاملاً بی‌حس شوند و سپس در ظروف پتری حاوی بافر فسفات سرد (دمای چهار درجه‌ی سلسیوس و  $\text{pH}=6/5$ ) تشریح شدند. به منظور تشریح، لاروهای بی‌حس به پهلو قرار گرفته و با قیچی جراحی مخصوص از پهلو کپسول سر حشره برشی داده شده و سپس جلد بدن لارو، کپسول سر و انتهای لارو جدا شدند. سپس دو عدد روده میانی کاملاً عاری از ذرات چربی به داخل میکروتیوب‌های  $1/5$  میلی لیتری حاوی بافر فسفات سرد منتقل شدند. میکروتیوب‌ها در تمام مدت تشریح در ظرفی پر از آب یخ نگهداری شدند تا کمترین تغییرات در فعالیت آنزیمی آنها رخ دهد. با اتمام تشریح، محتویات میکروتیوب‌ها با استفاده از دستگاه هموژنایزر ultra-turax T8 به مدت یک دقیقه هموژنیزه شدند. سپس میکروتیوب‌های حاوی آنزیم‌های گوارشی به مدت دو ساعت در یخچال قرار داده شدند تا آنزیم کاملاً در بافر حل شود و سپس عمل سانتریفیوژ با  $10000 \text{ rpm}$  به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $4^\circ\text{C}$  انجام گرفت. محلول رویی که حاوی چربی بود جدا گشته و دور ریخته شد و محلول آنزیمی استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت.

### هم‌سن سازی لاروها

به منظور هم‌سن سازی، لاروهای سن پنج آماده پوست اندازی ۲۴ ساعت قبل از رفتن به سن ششم، جداسازی شده و به ظرف‌های مجزا منتقل گشته و بعد از تعویض جلد و ورود به سن ششم لاروی پس از ۲۴

گرم پروتئین) شد. زیبایی و دینان (۲۰۱۲) با مطالعه روی حشره (*Naranga aenscens* Moore) گزارش نمودند که آنزیم لیپاز در سن سوم لاروی بیشترین فعالیت را در مقایسه با دو سن دیگر داشت. این بررسی نشان داد که آنزیم لیپاز خالص‌سازی شده بیشترین فعالیت را در  $\text{pH}=10$  و دمای  $40-35$  درجه‌ی سلسیوس داشته و میزان پایداری آنزیم در  $\text{pH}$  بهینه ۲۴ ساعت و در دماهای ذکر شده شش ساعت بود.

هدف از انجام این تحقیق، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیپاز در روده میانی کرم غوزه‌ی پنبه و شناخت ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنزیم و تعیین شرایط بهینه فعالیت آن بود. اثر چندین ترکیب آزمایشگاهی هم‌روی لیپاز گوارشی بررسی خواهد شد تا مشخص شود که این آنزیم به یون‌های فلزی و مهارکننده‌های عمومی آزمایشگاهی چه پاسخی می‌دهد و یون‌های فلزی تا چه میزان اثر افزایشی یا کاهش‌ی بر فعالیت لیپاز کرم غوزه‌ی پنبه دارند.

### مواد و روش‌ها

#### پرورش حشرات

لاروهای سن آخر کرم غوزه‌ی پنبه از کلنی موجود در گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تهیه و برای تشکیل کلنی و پرورش حشرات به یکی از واحدهای پرورشی گلخانه منتقل شدند. پرورش لاروهای این حشره روی غذای مصنوعی طبق روش شوری و هال (۱۹۶۵) انجام شد. حشرات به مدت سه نسل در شرایط گلخانه، در دمای  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ، رطوبت نسبی  $10 \pm 60$  و دوره نوری ۸:۱۶ (تاریکی:روشنایی) پرورش یافته و از نسل چهارم برای انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

#### تشخیص سنین لاروی

برای تشخیص سنین لاروی، از قانون دایر (۱۸۹۰) استفاده شد که در آن اندازه عرض کپسول

حسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین (U/mg protein) محاسبه گردید. (روش ارائه شده توسط سازنده کیت).

### تعیین غلظت پروتئین کل در نمونه‌های آنزیمی

برای تعیین غلظت پروتئین کل در نمونه‌های آنزیمی از روش بردفورد (۱۹۷۶) استفاده شد.

### تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم

این آزمایش روی لاروهای سن شش در قالب طرح کاملاً تصادفی، با سه تکرار انجام شد. برای هر تکرار، چهار عدد میکروتیوب در نظر گرفته شد که هر کدام شامل دو عدد روده میانی لارو بود. سپس محتویات چهار میکروتیوب پس از سانتریفیوژ با هم مخلوط شده و به عنوان نمونه‌ی واحد مورد استفاده قرار گرفت و سنجش فعالیت آنزیم توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر صورت گرفت. دماهای مورد بررسی عبارت بودند از: ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ درجه‌ی سلسیوس که توسط حمام آب گرم اعمال شد.

### تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم

در این آزمایش، هر تیمار شامل شش میکروتیوب و ۱۲ عدد روده میانی لارو بود که پس از سانتریفیوژ در ۱۰ هزار دور در دقیقه، محتویات میکروتیوب‌های هر تکرار با هم مخلوط شده و نمونه واحدی به دست آمد.

pH های مورد نظر با استفاده از NaCl و HCl در بافر فسفات مورد استفاده اعمال گردید. pH ها از پنج تا ۱۰ به فاصله نیم واحد تغییر داده شد. از هر کدام ۰/۵ میلی‌لیتر بافر در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی-لیتری ریخته شد سپس به هر میکروتیوب ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی اضافه و فعالیت آنزیمی پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق اندازه‌گیری گردید.

ساعت، تشریح شدند. کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. فعالیت آنزیمی مراحل مختلف نشو و نمایی شامل لاروهای سنین چهارم، پنجم، ششم، پیش شفیره، شفیره و حشرات کامل نر و ماده در سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. در مورد حشرات کامل امکان شناسایی جنس نر و ماده وجود داشت و به‌همین دلیل جنس‌ها از هم تفکیک شده و جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مورد لاروهای سنین مختلف از روده‌ی میانی، در مورد شفیره از کل بدن و در مورد حشرات کامل از کل بدن با حذف بال‌ها و سر استفاده شد.

### سنجش فعالیت آنزیم لیپاز

فعالیت آنزیم لیپاز با کیت تشخیصی Randox ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری شد. زیرنهیشت<sup>۱</sup>، ترکیب تریولئین است که پس از هیدرولیز با لیپاز، دو محصول مونو گلیسیریدی و ۲-اولئیک اسید را ایجاد می‌کند. جذب نوری بطور مستقیم متناسب با فعالیت آنزیم لیپاز است. فعالیت لیپاز در طول موج ۵۷۸ نانومتر و دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس توسط دستگاه اتوآنالایزر اندازه‌گیری شد و دستگاه پس از وارد کردن پارامترهای مربوط به سنجش فعالیت لیپاز که توسط شرکت سازنده ارائه شده است، کالیبره شد. محلول‌های آنزیمی نیز به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر در داخل تیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری مخصوص دستگاه Alycon ریخته شده و در جایگاه اصلی قرار داده شدند. پس از اتمام کالیبراسیون، دستگاه به طور اتوماتیک شش میکرولیتر از محلول آنزیمی را با ۳۰۰ میکرولیتر از زیر نهشت در داخل کووت‌های خاصی مخلوط کرده و پس از ۱۰ دقیقه ماندن در فضای آزمایشگاه، میزان فعالیت آنزیم را بر حسب واحدبرلیتر اندازه‌گیری کرد. در نهایت، فعالیت ویژه آنزیم بر

<sup>1</sup>substrate

### تعیین میزان پایداری محلول آنزیمی

برای تعیین میزان پایداری محلول آنزیمی، نمونه‌های مورد نیاز تا ۶۰ روز به فواصل یک هفته‌ای با تشریح لاروهای سن شش و هموژنیزه کردن روده‌ی میانی آنها تهیه شده و پس از سانتریفیوژ و تهیه محلول آنزیمی در دماهای چهار و ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از آن میزان فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت.

### تعیین اثر دوره گرسنگی روی فعالیت آنزیم

بدین منظور، لاروهای سن شش پس از یک، دو، سه و چهار روز گرسنگی، تشریح شده و نمونه‌های حاصل در آزمایش‌های سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

### بررسی اثرات ترکیبات مختلف روی فعالیت آنزیم

اثر ترکیباتی مانند  $\text{CaCl}_2$ ،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ،  $\text{NaCl}$ ، EDTA و Tris به غلظت‌های یک تا پنج میلی مولار روی فعالیت لیپاز گوارشی بررسی شد. بدین منظور غلظت‌های مختلف این ترکیبات در آب مقطر تهیه شده و با استفاده از  $\text{HCl}$  و  $\text{NaCl}$  اسیدیته محیط در ۶/۵ تنظیم شد. برای هر تیمار ۳۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌ها با ۳۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی داخل کووت‌های ویژه دستگاه اتوانالایزر قرار گرفته و فعالیت آنزیمی پس از ۱۰ دقیقه، اندازه‌گیری شد. برای تیمار شاهد از ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر همراه با ۳۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استفاده گردید.

برای بررسی اثر اتانول، از غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۸۵ و ۹۶ و برای تیمار شاهد از آب مقطر استفاده شد. محتوای میکروتیوب‌ها شامل ۰/۵ میلی‌لیتر محلول الکل یا آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی بود که پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق (۲۵-۲۳ درجه-ی سلسیوس) میزان فعالیت آنزیمی آن اندازه‌گیری شد.

### تجزیه آماری

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین با استفاده از همین نرم افزار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. برای تست نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده گردید و در صورت نیاز تبدیل داده‌ی مناسب صورت گرفت.

### نتایج و بحث

#### فعالیت آنزیم لیپاز در مراحل مختلف نشو و نمایی کرم غوزه

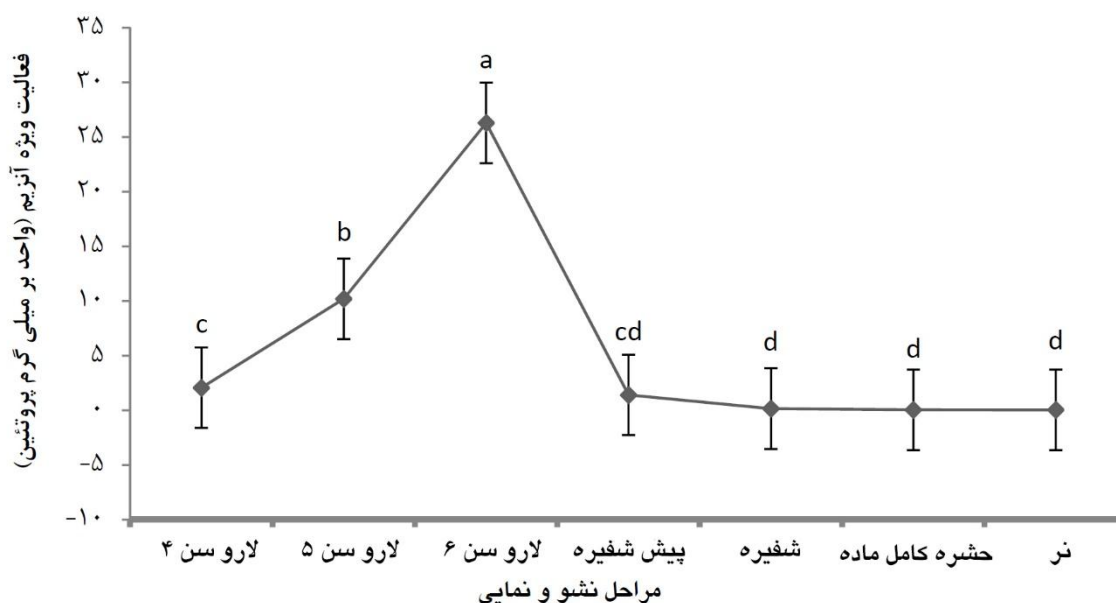
روند تغییرات فعالیت لیپاز در مراحل مختلف نشو و نمایی کرم غوزه، در شکل ۱ ارائه شده است. فعالیت آنزیم در سنین چهار، پنج و شش به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $F_{6,14} = 455.235$ ;  $P < 0.5$ ). به طوری که در سن چهارم لاروی از ۲/۱ واحد بر میلی‌گرم پروتئین به ۱۰/۲ واحد بر میلی‌گرم پروتئین در سن پنجم لاروی و ۲۶/۳ واحد بر میلی‌گرم پروتئین در سن ششم لاروی رسید. در مراحل پیش شفیرگی، شفیره و در حشره کامل میزان فعالیت آنزیم به طور معنی‌داری کاهش یافت. بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم به ترتیب در سن ششم لاروی و در حشرات کامل نر مشاهده شدند که میزان فعالیت آنزیمی آن ۰/۰۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود.

ترشح و میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی ارتباط تنگاتنگی با میزان تغذیه موجود زنده دارند. در مطالعات کاپین و احمد (۱۹۸۰) روی فعالیت آنزیم استرازکرم ابریشم‌باف ناجور (*Lymantira dispar* L.) مشاهده شد که فعالیت این آنزیم ارتباط زیادی با فعالیت تغذیه‌ای و نشو و نمایی لارو دارد و هر چه لارو تغذیه‌ی بیشتری داشته باشد میزان فعالیت لیپاز

در مراحل آخر سنن لاروی و کمی قبل از ورود به مرحله‌ی شفیرگی، حشره، چربی را در بافت چربی خود ذخیره می‌کند تا در مراحل غیر فعال برای ادامه زندگی و انجام فرآیندهای بیولوژیکی و فیزیولوژیکی ذخیره کافی داشته باشد. به همین دلیل آنزیم لیپاز در کمترین میزان ممکن خود ترشح و مورد استفاده قرار می‌گیرد و به عبارتی فعالیت خیلی کمی دارد. همچنین در حشرات کامل که رژیم تغذیه ای مبتنی بر استفاده از شهد می‌باشد نیز لیپاز گوارشی فعالیت بسیار کمی دارد.

گوارشی هم بیشتر خواهد بود. در بررسی‌های آلیزا و استنلی (۱۹۹۸) روی آنزیم فسفولیپاز A<sub>2</sub> گوارشی در کل بدن و روده میانی لاروی پشه تب زرد ( *Aedes aegypti* L. ) مشخص شد که فعالیت این آنزیم در طول سن چهارم لاروی همواره بالا بوده، ولی در اولین روز شفیرگی که یک مرحله غیرتغذیه‌ای است به سطوح بسیار پایینی کاهش پیدا کرد.

از داده‌های به دست آمده از این مطالعه که نشان می‌دهد مراحل دارای تغذیه‌ی بالا، فعالیت آنزیمی بیشتر و مراحل فاقد تغذیه، دارای کمترین فعالیت آنزیمی و یا حتی فاقد آن هستند، استباط می‌شود که



شکل ۱- روند تغییرات فعالیت آنزیم در مراحل مختلف نشو و نمایی و مقایسه میانگین‌ها (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد است).

یافت و بیشترین فعالیت آنزیم در ۴۰ درجه‌ی سلسیوس مشاهده شد. فعالیت آنزیم در دمای ۴۰ درجه‌ی سلسیوس حدود ۲۶ واحد بر میلی گرم پروتئین بود. در دماهای بالاتر از ۴۰ درجه، فعالیت آنزیمی روند نزولی پیدا کرد و در دماهای ۵۵ و ۶۰ درجه‌ی سلسیوس متوقف شد، که در دمای ۶۰ درجه، میزان فعالیت آن در حدود ۰/۰۳ واحد بر میلی گرم پروتئین بود.

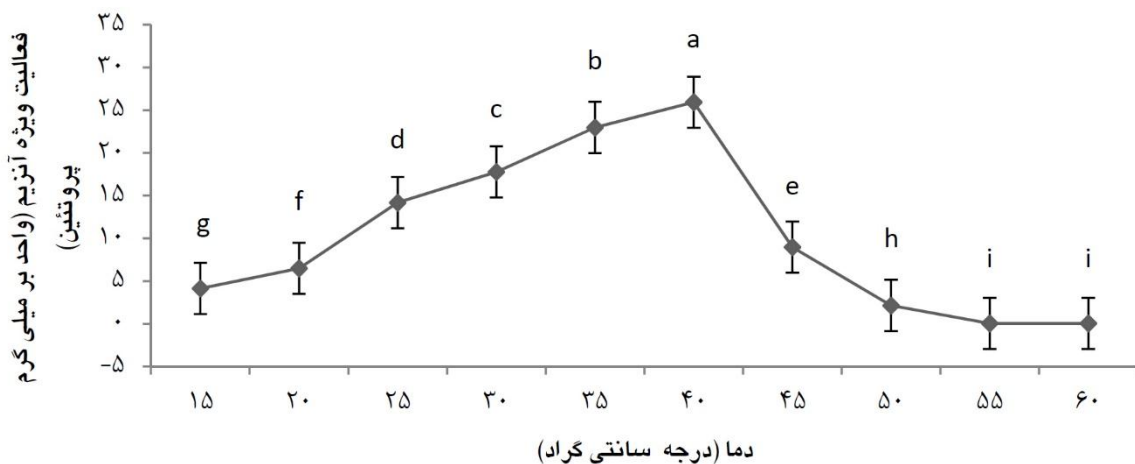
#### دمای بهینه فعالیت آنزیم

روند تغییرات فعالیت آنزیم در دماهای مختلف و جدول تجزیه واریانس در شکل ۲ ارائه شده است. بین فعالیت آنزیم در دماهای مختلف، در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری وجود داشت ( $F_{9,20} = 1117.00; P < 0.5$ ). با افزایش دما تا ۴۰ درجه‌ی سلسیوس، فعالیت آنزیمی به طور معنی داری افزایش

آنزیم لیپاز (لیپاز ۲) *Yarrowia lipolytica*، دمای بهینه برای لیپاز خالص‌سازی شده، ۴۰ درجه‌ی سلسیوس بود. این نتایج بیانگر این است که دمای بهینه‌ی فعالیت لیپازها در بسیاری از موجودات زنده احتمالاً بین ۳۵ تا ۴۰ درجه است.

به نظر می‌رسد که افزایش دما باعث می‌شود تا سرعت واکنش‌های آنزیمی و غیر آنزیمی بعلت افزایش انرژی جنبشی و فراوانی برخورد مولکول‌های واکنشگر افزایش یابد. همچنین انرژی حرارتی می‌تواند انرژی جنبشی آنزیم را تا نقطه‌ای افزایش دهد که باعث تخریب ساختار سه بعدی آنزیم شده و آنرا واسرشته کند که به دنبال آن فعالیت‌های کاتالیزی آنزیم از بین خواهد رفت. این موضوع شاید بتواند روند صعودی فعالیت آنزیمی تا دمای ۴۰ درجه‌ی سلسیوس، روند نزولی بعد از آن و توقف فعالیت آنزیمی در دماهای ۵۵ و ۶۰ درجه را توضیح دهد.

در مطالعات زیبایی و همکاران (۲۰۰۸) روی فعالیت آنزیم لیپاز گوارشی و غدد بزاقی کرم ساقه خوار برنج محدوده دمایی ۳۷ تا ۴۰ درجه‌ی سلسیوس به عنوان دمای بهینه برآورد گردید. تئو و وودرینگ (۱۹۸۸) با مطالعه آنزیم لیپاز گوارشی سیرسیرک خانگی مشاهده کردند که حداکثر فعالیت آنزیم در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس رخ می‌دهد. در مطالعات هیول و همکاران (۲۰۰۰) روی ویژگی‌های آنزیم لیپاز خارج سلولی تولید شده به وسیله *Rhizopus oryzae* دمای بهینه، ۳۵ درجه‌ی سلسیوس تعیین شد. در مطالعات گاور و همکاران (۲۰۰۸) روی ویژگی‌های لیپاز *Pseudomonas aeruginosa* دمای بهینه فعالیت این آنزیم ۴۰ درجه‌ی سلسیوس به دست آمد و مشخص شد که این آنزیم در محدوده دمایی ۲۵ تا ۵۰ درجه‌ی سلسیوس پایدار است. در نتایج به دست آمده از بررسی‌های یو و همکاران (۲۰۰۷) روی ویژگی‌های



شکل ۲- روند تغییرات فعالیت آنزیم لیپاز در دماهای مختلف (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است).

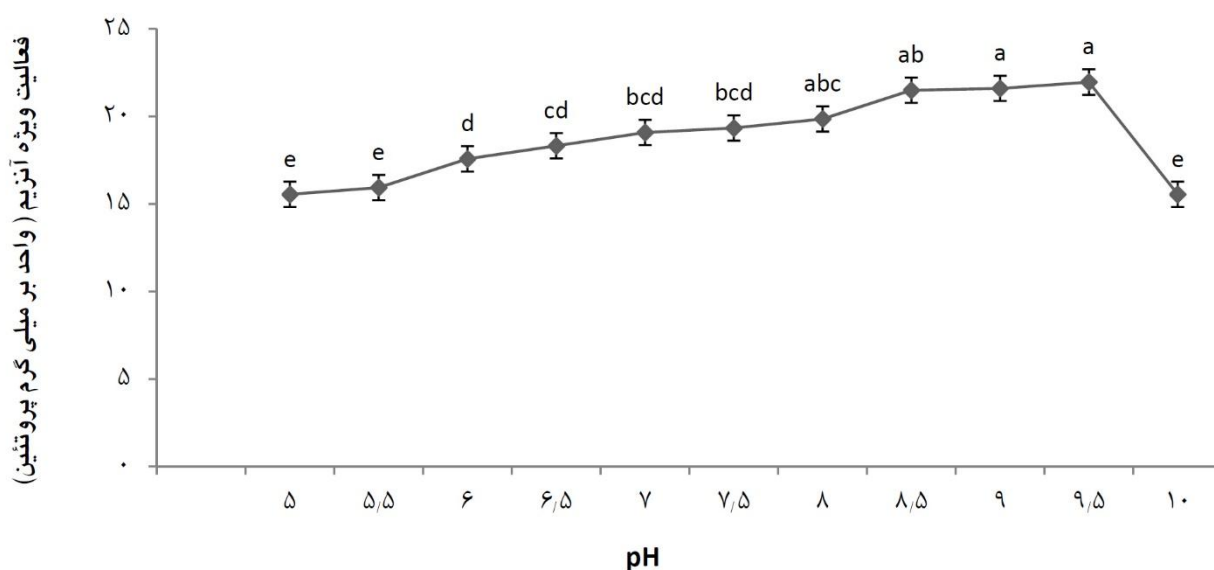
نظر گرفته شد، میزان فعالیت آنزیمی ۲۱/۹۶ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود. کمترین فعالیت آنزیم در pHهای پنج و ۱۰ مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری باهم نداشته و میزان فعالیت آنزیم در هر دو ۱۵/۵۵ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود.

### pH بهینه فعالیت آنزیم

اثر pH روی فعالیت آنزیم معنی‌دار بود ( $F_{10,22} = 16.004$ ;  $P < 0.5$ ). روند تغییرات فعالیت آنزیم در pHهای مختلف در شکل سه نشان داده شده است. فعالیت آنزیم در pHهای هشت تا ۹/۵ در بیشترین میزان خود بود. در pH ۹/۵ که به عنوان pH بهینه در

خوار برنج، مشخص شد که حداکثر فعالیت آنزیم در pH برابر ۱۰ تا ۱۱ رخ می‌دهد. کریستلر و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت آنزیم لپپاز را در شش گونه مختلف از لارو بالپولکداران بررسی و گزارش کردند که تمامی آنزیم‌های لپپاز این شش گونه بیشترین فعالیت خود را در pH قلیایی دارند و pH بهینه برای گونه‌ها بین ۹ تا ۱۰/۵ بود. سرعت تقریبی تمامی واکنش‌های آنزیمی وابستگی قابل توجهی به غلظت یون هیدروژن را نشان می‌دهد. این ارتباط فعالیت با غلظت یون هیدروژن، انعکاسی از تعادل بین واسرشته‌سازی آنزیمی در مقادیر بالا و پایین pH و تاثیر روی حالت باردار آنزیم، زیرنهشت‌ها و یا هر دو می‌باشد. به طوری که ایجاد یا حذف گروه‌های باردار مهم، می‌تواند اثرات جانبی روی اتصال زیرنهشت داشته و به این ترتیب کاتالیز را تسریع یا متوقف نماید (محمدی ۱۳۸۴).

در بیشتر گونه‌های حشرات pH لوله گوارش در محدوده شش تا ۷/۵ است (مرداکوویچ و همکاران ۲۰۰۸)، در حالیکه pH لوله گوارش بالپولکداران، قلیایی است و بیشتر مطالعات انجام شده روی فعالیت آنزیم لپپاز در این حشرات نشان می‌دهد که pH بهینه برای فعالیت آن، pH قلیایی می‌باشد. مطالعات انجام یافته توسط کانائوسو و همکاران (۲۰۰۰) روی آنزیم لپپاز کرم شاخ‌دار توتون، نشان از قلیایی بودن pH بهینه این آنزیم دارد. انور و سلیم الدین (۱۹۹۷) pH بهینه فعالیت آنزیم لپپاز را در روده لارو شب پره (*Opilosoma obiluqua* Walker) برابر هشت گزارش نمودند. در مطالعات مرداکوویچ و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت بهینه آنزیم لپپاز کرم ابریشم باف ناجور (*L. dispar*) pH ۸/۲ به دست آمد که با pH روده میانی آن مطابقت داشت. در بررسی‌های زیبایی و همکاران (۲۰۰۸) روی فعالیت آنزیم لپپاز گوارشی و غدد بزاقی کرم ساقه-



شکل ۳- روند تغییرات فعالیت آنزیم لپپاز در pH های مختلف (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد است).

و چهار درجه‌ی سلسیوس ( $F_{7,16} = 3860.53$ ;  $P < 0.5$ ) در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس فعالیت آنزیم در هفته هشتم، به ۱۷ درصد مقدار آن در هفته اول رسید، در حالیکه در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس فعالیت آنزیم پس از پنج هفته، ۶ درصد مقدار آن در هفته اول بود و پس از

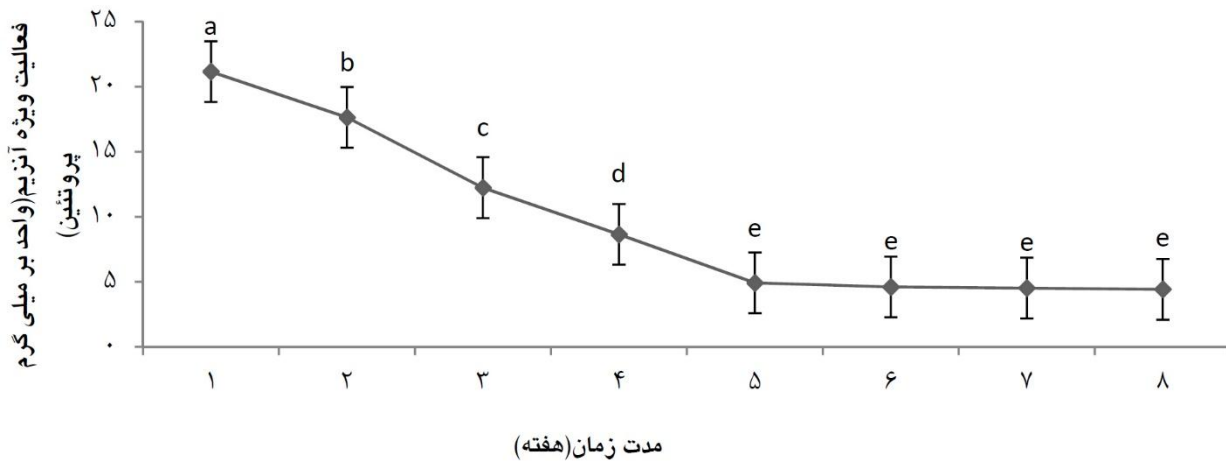
#### میزان پایداری محلول آنزیمی

روند تغییرات فعالیت آنزیم لپپاز در طول مدت زمان‌های متفاوت در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. تفاوت میزان پایداری آنزیم در مدت زمان‌های مختلف در هر دو دمای ۲۰- ( $F_{7,16} = 311.95$ ;  $P < 0.5$ )

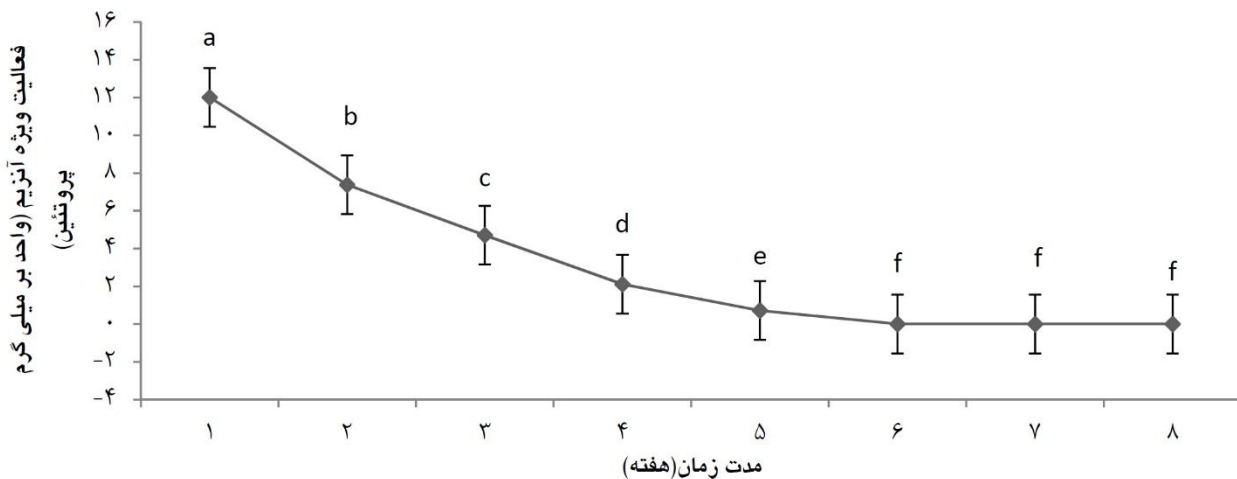


هر چه بیشتر شرایط بهینه فعالیت، کاهش سریعتر در فعالیت آن ایجاد می‌شود نتایج این آزمایش مبنی بر کاهش سریع فعالیت آنزیم در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نسبت به دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس قابل توجیه است.

آن کاملاً متوقف گردید و محلول آنزیمی پایداری خود را از دست داد. داده‌های حاصل از ارزیابی این آنزیم در pHهای مختلف، نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم در pHهای مختلف تنها دارای یک نقطه اوج است و بنابراین یکنواخت بودن آنزیم از این استنباط می‌شود. با در نظر گرفتن این که آنزیم‌های یکنواخت‌تر با تغییر



شکل ۴- روند تغییرات آنزیمی در طول هشت هفته نگهداری در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است).



شکل ۵- روند تغییرات آنزیمی در طول هشت هفته نگهداری در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است).

داد ( $F_{4,10} = 1297.79$ ;  $P < 0.5$ ). میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد ۲۷/۲۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود که پس از ۲۴ ساعت گرسنگی فعالیت آنزیم ۹/۷۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود که تقریباً کاهش ۶۴ درصدی را نسبت به شاهد نشان داد. پس از چهار روز گرسنگی

#### اثر طول دوره گرسنگی بر فعالیت آنزیم

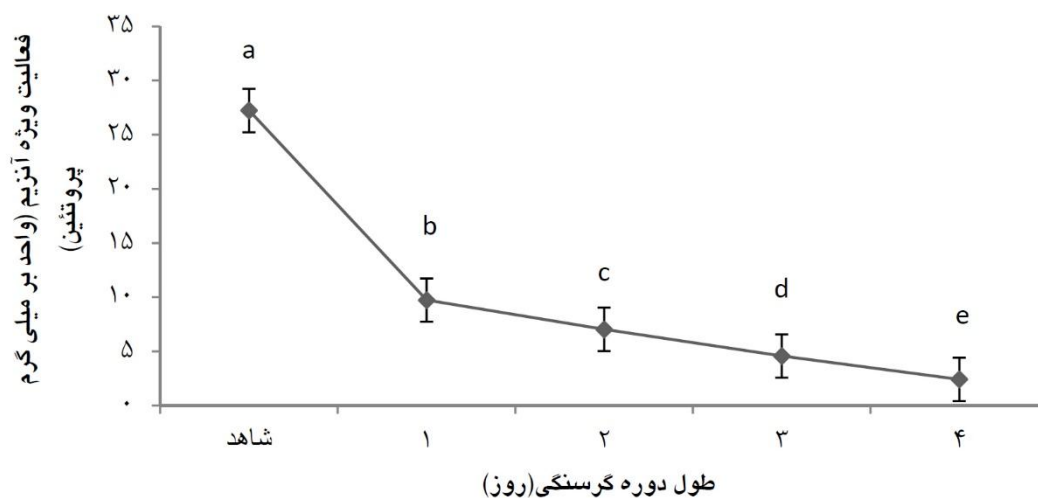
شکل شش روند تغییرات اثر این تیمار را ارائه می‌دهد. میزان فعالیت آنزیمی با افزایش میزان گرسنگی، کاهش معنی‌داری را در سطح احتمال ۵ درصد نشان

کاهش ۶۰ درصدی در فعالیت کلی و کاهش ۳۵ درصدی در فعالیت ویژه آنزیم گردید. نتایج مطالعات اوسیان و همکاران (۱۹۹۵) روی فسفولیپاز A<sub>2</sub> محتویات روده‌ی میانی سوسک ببری *Cicindella circumpecta* نشان داد که در هنگام فعالیت تغذیه‌ای، فعالیت این آنزیم هم در روده‌ی میانی این حشرات بیشتر است.

آنزیم‌های گوارشی به حالت زایموزن تولید شده و تنها در صورت رسیدن ماده غذایی و زیرنهدشت به آن‌ها، فعال می‌شوند. آنزیم‌های گوارشی در محدوده مشخصی از pH فعالیت دارند و pH روده‌ی میانی با ورود ماده غذایی به آن، تحت تاثیر قرار می‌گیرد. با توجه به این نکات می‌توان پائین بودن فعالیت آنزیم را در شرایط گرسنگی توجیه کرد.

فعالیت آنزیم ۲/۴۲ واحد بر میلی‌گرم پروتئین به دست آمد که تقریباً ۹ درصد مقدار فعالیت، در شرایط تغذیه بود.

مطالعات رانا و همکاران (۱۹۹۸) روی فعالیت فسفولیپاز A<sub>2</sub> گوارشی در روده‌ی میانی کرم شاخدار توتون، *M. sexta* نشان داد که فعالیت این آنزیم در لاروهای تغذیه کرده بیشتر از لاروهای گرسنه بود. در بررسی‌های گریلو و همکاران (۲۰۰۷) روی متابولیسم لیپید و نقش لیپاز گوارشی در سن *Rhodnius prolixus* Stal نشان می‌دهد که پس از تغذیه فعالیت آنزیم بسیار شدید بوده و به تدریج فعالیت آن کاهش می‌یابد. در مطالعات تنو و وودرینگ (۱۹۸۸) روی آنزیم لیپاز گوارشی سیرسیرک خانگی *domesticus* A. مشاهده شد که پنج روز گرسنگی موجب



شکل ۶- روند تغییرات آنزیم در طول دوره گرسنگی (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است).

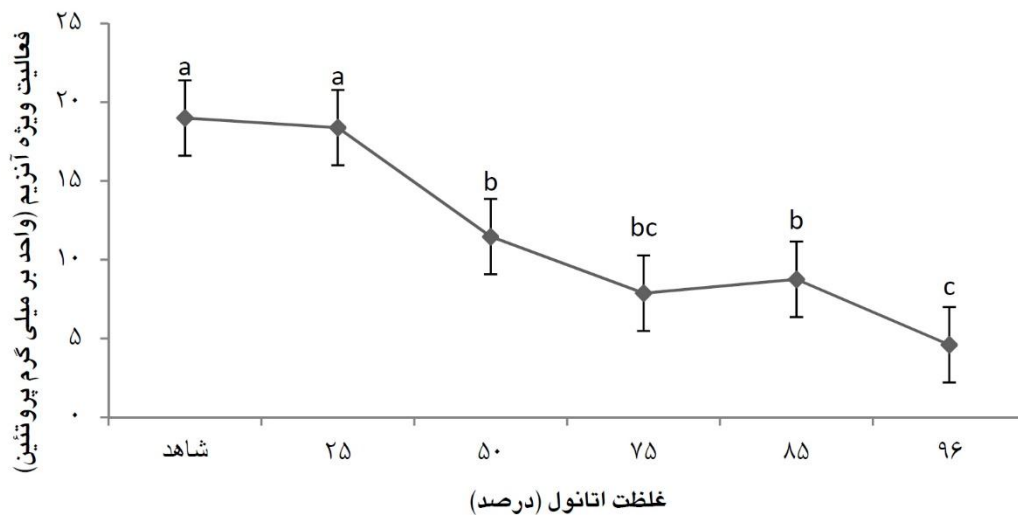
بر میلی‌گرم پروتئین بود. با کاهش غلظت اتانول میزان فعالیت آنزیم افزایش یافت، به طوری که غلظت ۲۵ درصد اتانول کمترین تاثیر را روی فعالیت آنزیم داشته و میزان فعالیت آنزیم ۱۸/۴ واحد بر میلی‌گرم پروتئین بود. با توجه به اینکه با آزاد شدن بیشتر OH در محیط، میزان بیشتری از بازدارندگی و کاهش فعالیت آنزیم روی می‌دهد. بنابراین این غلظت ۹۶ درصد که

#### تاثیر غلظت‌های مختلف اتانول بر فعالیت آنزیم

شکل هفت روند تغییرات اثر این تیمار روی فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد. تاثیر غلظت‌های مختلف اتانول روی فعالیت آنزیم با افزایش غلظت اتانول، کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $F_{5,12} = 26.767; P < 0.5$ ). بیشترین میزان بازدارندگی آنزیمی در غلظت ۹۶ درصد اتانول بوده که میزان فعالیت آنزیمی ۴/۶ واحد

اوچوا و همکاران (۲۰۰۵) روی ویژگی‌های آنزیم لیپاز تولید شده توسط باکتری *B. thermoleovorans* CCR11 فعالیت این آنزیم در حضور حلال‌های آلی بجز بوتانول در حالت عادی بود. در مطالعات رپ (۱۹۹۵) روی لیپاز *Fusarium oxysporum* Schlecht مشخص شد که غلظت ۲۵ درصدی استون، الکل اتانول و n- پروپانول روی آنزیم لیپاز بی تاثیر بود. آنزیم لیپاز در این غلظت پایداری خود را حفظ می‌کند.

بیشترین مقدار OH را در محیط آزاد می‌کند بیشترین اثر بازدارندگی و کاهش فعالیت را روی آنزیم دارد. جعفرلو و همکاران (۱۳۹۲) با بررسی اثر اتانول روی فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز گوارشی شب پرهی مدیترانه‌ای آرد (*Anagasta kuehniella* Zeller) گزارش کردند که با افزایش میزان غلظت اتانول، فعالیت آنزیمی نیز کاهش می‌یابد. آنها بیشترین مهار آنزیمی را در غلظت ۹۶ درصد اتانول و کمترین مهار را در غلظت ۲۵ درصد گزارش نمودند. در مطالعات کاسترو-



شکل ۷- روند تغییرات تاثیر غلظت‌های مختلف اتانول روی فعالیت آنزیم (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است).

**کلرید سدیم (NaCl):** غلظت‌های یک و دو میلی-مولار NaCl تاثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم نشان ندادند ولی غلظت‌های سه، چهار و پنج میلی-مولار به طور معنی‌داری فعالیت آنزیم را کاهش دادند. در حالیکه غلظت‌های یک و دو میلی-مولار فعالیت آنزیم را از لحاظ عددی افزایش دادند.

یون‌های فلزی بسته به نوع آنزیم می‌توانند باعث افزایش یا کاهش فعالیت آن شوند (حسن و همکاران ۲۰۰۹). در مطالعاتی که زیبایی و همکاران (۲۰۰۸) روی فعالیت آنزیم لیپاز روده‌ی میانی و غدد بزاقی کرم ساقه خوار برنج انجام دادند، فعالیت این آنزیم با

#### تاثیر ترکیبات مختلف بر فعالیت آنزیم

طبق نتایج، اثر کلرید سدیم ( $F_{5,12} = 4.059; P < 0.5$ )، فسفات پتاسیم ( $F_{5,12} = 2.421; P < 0.5$ )، کلرید کلسیم ( $F_{5,12} = 18.61; P < 0.5$ ) و SDS ( $F_{5,12} = 304.476; P < 0.5$ ) بر فعالیت لیپاز معنی‌دار بود ولی اثر Tris ( $F_{5,12} = 1.097; P < 0.5$ ) و EDTA ( $F_{5,12} = 1.181; P < 0.5$ ) معنی‌دار نبود. روند تغییرات فعالیت آنزیم در اثر تیمار با غلظت‌های یک تا پنج میلی-مولار هر یک از این ترکیبات در شکل هشت نشان داده شده است.

مطالعات زیبایی و همکاران (۲۰۰۸) روی فعالیت آنزیم لپپاز روده‌ی میانی و غدد بزاقی کرم ساقه‌خوار برنج *C. suppressalis* نشان داد که فعالیت این آنزیم در حضور KCl که پس از یونیزه‌شدن یون  $K^+$  آزاد می‌کند، کاهش می‌یابد. بررسی‌های کومار و همکاران (۲۰۰۵) روی ویژگی‌های آنزیم لپپاز باکتری *B. coagulans* BST-3 نشان داد که یون  $K^+$  فعالیت آنزیمی را افزایش می‌دهد.

**کلرید کلسیم ( $CaCl_2$ ):** بین غلظت‌های یک و دو میلی‌مولار با توجه به روند کاهشی فعالیت آنزیم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی در غلظت‌های سه، چهار و پنج میلی‌مولار تفاوت معنی‌دار دیده شد و بیشترین میزان کاهش فعالیت آنزیمی در غلظت‌های چهار و پنج میلی‌مولار بود.

**کارادزیچ و همکاران (۲۰۰۶):** طی مطالعاتی که روی لپپاز قلیایی تولیدشده توسط *P. aeruginosa* انجام دادند، مشاهده نمودند که این آنزیم توسط یون‌های منیزیم و کلسیم به طور خفیف مهارشد. مطالعات زیبایی (۲۰۱۲) روی سفیده بزرگ کلم *Pieris brassicae* L. مشخص کرد که یون‌های  $Ca^{2+}$  و  $Mg^{2+}$  باعث افزایش فعالیت آنزیم لپپاز خالص سازی شده این حشره می‌گردد. طی مطالعات الخطابی (۲۰۰۳) روی لپپاز *Burkholderia glumae* مشخص گردید که یون  $Ca^{2+}$  باعث کاهش شدید فعالیت آنزیم لپپاز و افزایش حساسیت آنزیم پروتئاز می‌شود.

**SDS:** با افزایش غلظت SDS تغییرات فعالیت آنزیمی روند کاهشی داشت. بین تیمار شاهد و غلظت یک میلی‌مولار SDS و نیز بین غلظت‌های چهار و پنج میلی‌مولار آن اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. غلظت‌های دو تا پنج میلی‌مول باعث کاهش فعالیت آنزیم شدند ولی بیشترین تاثیر مربوط به غلظت‌های چهار و پنج میلی‌مولار بود. غلظت‌های چهار و پنج میلی‌مولار به ترتیب ۸۷/۷۷ و ۹۲ درصد فعالیت آنزیم را مهار کردند.

افزودن NaCl کاهش پیدا کرد. در بررسی گریلو و همکاران (۲۰۰۷) روی متابولیسم لپپید و نقش آنزیم لپپاز تری‌آسیل‌گلیسرول روده‌ی میانی در *R. prolixus* فعالیت این آنزیم با غلظت NaCl تحت تاثیر قرارگرفت و با افزایش غلظت آن فعال‌تر شد. مطالعات هیول و همکاران (۱۹۹۹) روی ویژگی‌های آنزیم لپپاز خارج سلولی (*Mucor hiemalis* f. *hiemalis*) نشان داد که یون  $Na^+$  موجب افزایش فعالیت این آنزیم می‌شود. در بررسی‌های کومار و همکاران (۲۰۰۵) روی ویژگی‌های لپپازباکتری *Bacillus coagulans* BTS-3 نشان داد که یون  $Na^+$  هیچ تاثیری بر فعالیت آن ندارد. یون‌های فلزی معمولاً ترکیبات پیچیده‌ای را با اسیدهای چرب یونیزه‌شده تشکیل می‌دهند که با تغییراتی در رفتار و حلالیت آن‌ها در سطوح آب-روغن همراه است. آزاد سازی اسیدهای چرب به این سطح، تعیین‌کننده‌ی میزان فعالیت آنزیم است که با یون‌های فلزی می‌تواند تحت‌تاثیر قرارگیرد. با این وجود تاثیر یون‌های فلزی بستگی به نوع خاص لپپاز دارد (حسن و همکاران ۲۰۰۹).

بسیاری از آنزیم‌ها برای فعالیت خود نیازمند گروه‌های پروستتیک شامل کوفاکتور یا کوآنزیم از جمله فلزات و یون‌های فلزی هستند که در حضور این یون‌ها، آنزیم عمل کاتالیز را با سرعت بیشتری انجام می‌دهد. البته با افزایش غلظت یون‌های فلزی، این گروه‌های پروستتیک می‌توانند عمل عکس داشته و باعث مهار فعالیت آنزیم شوند.

**Tris:** تفاوت معنی‌داری بین تاثیر غلظت‌های مختلف Tris بر فعالیت آنزیم مشاهده نشد.

**فسفات پتاسیم:** غلظت‌های تا چهار میلی‌مولار با وجود روند افزایشی، تاثیر معنی‌داری روی فعالیت آنزیم نداشتند در حالی‌که غلظت پنج میلی‌مولار فعالیت آنزیم را به طور معنی‌داری افزایش داد. فسفات پتاسیم در غلظت‌های بالا نه تنها اثر کاهندگی بر فعالیت آنزیم نداشته بلکه باعث افزایش فعالیت آنزیم شد.

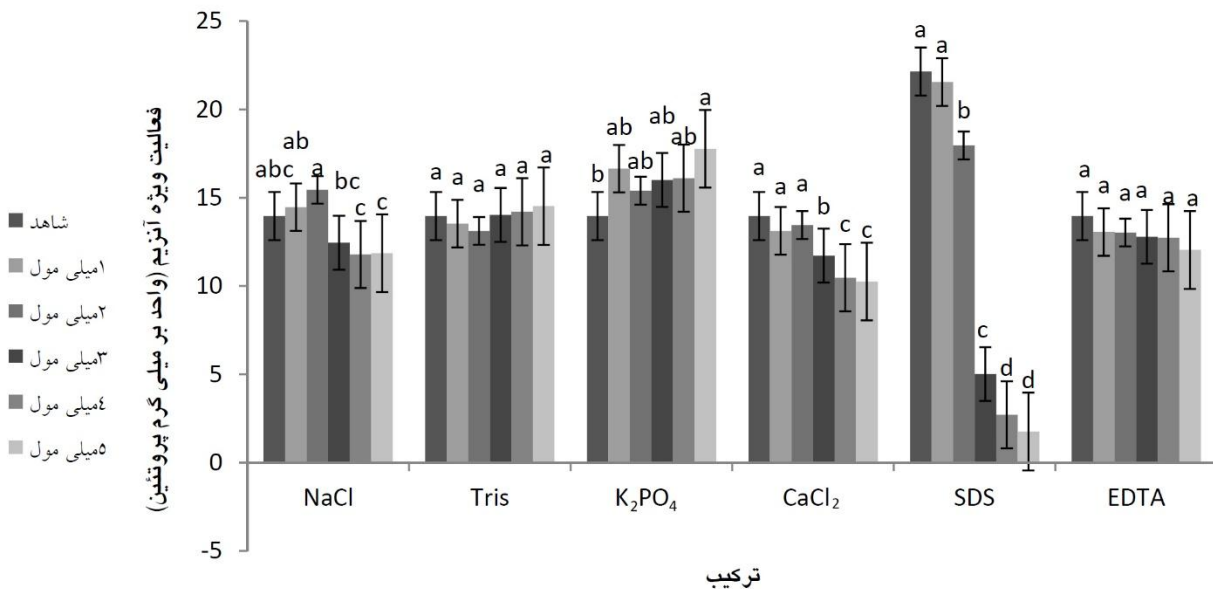
به نظر می‌رسد EDTA در برخی موجودات از جمله حشرات باعث مهار فعالیت آنزیم لیپاز شده و در برخی دیگر تاثیر چندانی روی فعالیت آنزیم ندارد. به طوری که مطالعات هیول و همکاران (۱۹۹۹) روی ویژگی‌های آنزیم لیپاز خارج سلولی *Mucor hiemalis* و *hiemalis* نشان داد که فعالیت این آنزیم با EDTA تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. در بررسی‌های گاور و همکاران (۲۰۰۸) روی ویژگی‌های لیپاز *P. aeruginosa* نیز مشخص شد که فعالیت آنزیمی با ۱ میلی‌مول EDTA به طور معنی‌داری تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد. مطالعات لی و ژانگ (۲۰۰۵) روی ویژگی‌های آنزیم لیپاز *Geobacillus* sp. TW1، نیز نشان داد که این آنزیم در حضور یک میلی‌مول از EDTA پایدار است. مطالعات دمیر و توکل (۲۰۱۰) روی ویژگی‌های لیپاز *S. platensis* حاکی از این بود که فعالیت این آنزیم بوسیله EDTA مهار می‌گردد. زیبایی (۲۰۱۲) با بررسی فعالیت آنزیم لیپاز گوارشی در *P. brassicae* گزارش کرد که EDTA باعث مهار فعالیت آنزیم لیپاز در این حشره گردید. طی مطالعات الخطابی و همکاران (۲۰۰۳) روی لیپاز *B. glumae* مشخص شد که EDTA به شدت باعث مهار فعالیت آنزیم لیپاز و افزایش حساسیت آنزیم پروتئاز می‌گردد.

EDTA با نام کامل اتیلن دی‌آمین تترا استیک-اسید یک عامل کلات کننده فلزات است که یون‌های فلزی را از ترکیبات دارنده آن‌ها جدا می‌کند. بنابراین معنی‌دار نبودن کاهش ایجاد شده توسط این ترکیب در فعالیت آنزیم لیپاز می‌تواند شاهدی بر عدم نیاز ضروری به برخی یون‌های فلزی در جایگاه کاتالیتیک این آنزیم باشد.

بیشتر مطالعات انجام یافته در این زمینه همانند نتایج حاصل از این مطالعه، کاهش فعالیت آنزیم لیپاز در حضور SDS را نشان می‌دهند. در بررسی‌های کاسترو-اوچوا و همکاران (۲۰۰۵) روی ویژگی‌های آنزیم لیپاز تولید شده توسط *B. thermoleovorans* CCR11 مشاهده شد که SDS اثر مهارکنندگی روی این آنزیم دارد. همچنین طی مطالعات زیبایی (۲۰۱۲) روی فعالیت آنزیم لیپاز *P. brassicae* مشخص شد که SDS باعث مهار فعالیت آنزیم لیپاز گوارشی در این حشره می‌شود. مطالعات هیول و همکاران (۲۰۰۰) روی ویژگی‌های آنزیم لیپاز خارج سلولی تولید شده توسط *Rhizopus oryzae* نشان داد که فعالیت این آنزیم با SDS مهار می‌شود. طی مطالعات وانگ و همکاران (۲۰۰۹) روی ویژگی‌های آنزیم لیپاز *Burkholderia cepacia* ATCC25416 در حضور SDS مشاهده شد. نتایج حاصل از بررسی‌های یو و همکاران (۲۰۰۷) روی ویژگی‌های آنزیم لیپاز (لیپاز دو) *Y. lipolytica* نیز حاکی از مهار فعالیت آن با SDS بود. در مطالعه‌ی دمیر و وتوکل (۲۰۱۰) روی ویژگی‌های آنزیم لیپاز *Spirulina platensis*، تحریک فعالیت آن در حضور SDS مشاهده شد.

SDS با نام کامل سدیم دو دسیل سولفات، یک سورفکتانت آنیونی با فرمول شیمیایی  $C_{12}H_{25}SO_4Na$  است که به علت داشتن ۱۲ اتم کربن متصل به گروه سولفات، دارای ویژگی‌های دوگانه دوستی است که می‌تواند به عنوان یک شوینده عمل کند. از آنجا که آنزیم‌های لیپاز در سطوح مشترک آب-لیپید عمل می‌کنند حضور یک ماده شوینده در محیط می‌تواند روی فعالیت آنزیمی آن تاثیر بگذارد.

**EDTA:** بین تاثیر غلظت‌های مختلف EDTA روی فعالیت آنزیم میزان کاهش مختصری دیده شد که معنی‌دار نبود.



شکل ۸- اثر ترکیبات مختلف بر فعالیت ویژه آنزیم لیباز (حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد است).

## منابع

جعفرلو م، فرشباغ پورآباد ر و ولیزاده م، ۱۳۹۲. اثر چند ترکیب مختلف روی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز روده میانی شب پره مدیترانه‌ای آرد *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lep., Pyralidae)، نشریه پژوهش‌های کاربردی در گیاهپزشکی، جلد دوم، شماره ۱. صفحه‌های ۱ تا ۱۳.

خانجانی م، ۱۳۸۵. آفات سبزی و صیفی ایران، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه بوعلی سینا، صفحه‌های ۳۷-۳۵.

محمدی ر، ۱۳۸۴. بیوشیمی پزشکی هارپر(ترجمه)، انتشارات آبیژ، ۸۱۶ صفحه.

Aliza ARN and Stanley DW, 1998. A digestive phospholipase A2 in larval mosquitoes, *Aedes aegypti*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28: 561-569.

Anwar A and Saleemuddin M, 1997. Alkaline-pH-acting digestive enzymes of the polyphagous insect pest *Spilosoma oblique*: stability and potential as detergent additives. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 25: 43-46.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Biochemistry* 72: 248

Canavoso LE and Wells MA, 2000. Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 1173-1180.

Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE and Wells MA, 2001. Fat metabolism in insects. *Annual Review of Nutrition* 21: 23-46.

Castro-Ochoa LD, Rodriguez-Gomez C, Valerio-Alfaro G and Ros RO, 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology* 37: 648-654.

- Christeller J, Sawsan Amara T and Carrière F, 2011. Galactolipase, phospholipase and triacylglycerol lipase activities in the midgut of six species of lepidopteran larvae feeding on different lipid diets. *Journal of Insect Physiology* 57: 1232–1239.
- Demir BS and Tukel SS, 2010. Purification and characterization of lipase from *Spirolina platensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64:123-128.
- Dyar HG, 1890. The number of molts of lepidopterous larvae. *Psyche* 5:420-422
- El Khattabi M, Van Gelder P, Bitter W and Tommassen J, 2003. Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. *Journal of Molecular Catalysis* 22: 329-338.
- Gaur R, Gupta A and Khare SK, 2008. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry* 43: 1040-1046.
- Grillo LA, Majerowicz MD and Gondim KC, 2007. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerollipase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 579-588.
- Hasan F, Ali shah A and Hameed A, 2009. Methods for detection and characterization of lipases, *Biotechnology Advances* 27: 782-798.
- Hiol A, Jonzo MD, Druet D and Comeau L, 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 80-87.
- Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, Druet D, Sarda L and Comeau LC, 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Journal of Enzyme and Microbial Technology* 26: 421-430.
- Horne I, Haritos VS and Oakeshott JG, 2009. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 547-567.
- Kapin MA and Ahmad S, 1980. Esterases in larval tissues of gypsy moth *Lymantria dispar* (L.) optimum assay condition, quantification and characterization. *Insect Biochemistry* 10: 331-337.
- Karadzic I, Masui A, Zivkovic LI and Fujiwara N, 2006. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102(2): 82-89.
- Kumar S, Kikon K, Upadhyay A, Kanwar SS and Gupta R, 2005. Production purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification* 41: 38-44.
- Lawrence PK and Koundal KR, 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* 5(1): 1-17.
- Li H and Zhang X, 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein Expression and Purification* 42: 153-159.
- Majumder UK and Sengupta A, 1979. Triglyceride composition of chrysalis oil and insect lipid. *Journal of the American Oil Chemists Society* 56: 620-623.
- Matthews M, 1999. Heliolithism of Australia. C.S.I.R.O. Publishing.
- Mrdakovic M, Lazarevic J, Peric-Mataruga V, Ilijin L and Vlahovic M, 2008. Partial characterization of a lipase from gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larval midgut. *Folia Biologica (Krakow)* 56(1-2): 103-110.
- Orscelik O, Akpinar MA and Gorgun S, 2007. Partial purification of total body lipase from *Gryllus campestris* L. (Orthoptera: Gryllidae), *Fen Bilimleri Dergisi* 28(2): 1-10.
- Rana RL, Sarath G and Stanley DW, 1998. A digestive phospholipase A2 in midguts of tobacco hornworms, *Manduca sexta* (L.). *Journal of Insect Physiology* 44: 297-303.

- Rapp P, 1995. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 832-838.
- Robert CV, Davis EE, Zaspel J, Heisler H and Larson M, 2007. Mini risk assessment Old World bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Department of Entomology* 28:1-36.
- Sharma R, Chisti Y and Banerjee UC, 2001. Production, purification, characterization and application of lipases. *Biotechnology advances* 19: 627-662.
- Shorey HH and Hale RL, 1965. Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 58: 522-524.
- Smith IM, McNamara DG, Scott PR, Harris KM and Holdernees M, 1992. Quarantine pests for Europe. C.A.B. International 159-164.
- Teo LH and Woodring JP, 1988. The digestive protease and lipase in the house cricket *Acheta domesticus*. *Insect Biochemistry* 18(4): 363-367.
- Uscian JM, Miller JS, Sarath G and Stanley-Samuelson DW, 1995. A digestive phospholipase A2 in the tiger beetle *Cicindella circumpecta*. *Journal of Insect Physiology* 41(2): 135-141.
- Venette RC, Davis EE, Zaspel J, Heisler H and Larson M, 2003. Mini Risk Assessment Old World bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Department of Entomology. University of Minnesota* 28:1-36.
- Wang X, Yu X and Xu Y, 2009. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Enzyme and Microbial Technology* 45: 94-102.
- Yu M, Qin S and Tan T, 2007. Purification and characterization of the extracellular lipase lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* 42: 384-391.
- Ziegler R, 1991. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Physiology [B]* 161: 125-131.
- Zibae A, 2012. A digestive lipase of *Pieris brassicae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) purification, characterization, and host plants effects. *Arch Insect Biochemistry Physiology* 81(1):1-19.
- Zibae A, Bandani AR and Ramzi S, 2008. Lipase and invertase activities in midgut and salivary glands of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae), Rice striped stem borer. *ISI* 5: 180-189
- Zibae A and Dinan MF, 2012. Purification and characterization of a digestive lipase in *Naranga aescens* Moore (Lepidoptera: Noctuidae). *SOAJ of Entomological Studies* 1:17.



## Lipase Enzyme Activity in Digestive System of *Helicoverpa armigera* Hb. (Lep.: Noctuidae) and Effect of Some Laboratory Compounds on It

M Chamani<sup>1</sup>, R Farshbaf Pourabad<sup>2\*</sup> and M Valizadeh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Former MSc. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>2</sup>Professors, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

\*Corresponding author: [rfpourabad@yahoo.com](mailto:rfpourabad@yahoo.com)

Received: 13 Mar 2015

Accepted: 12 Jul 2015

### Abstract

Cotton boll worm "*Helicoverpa armigera*" is one of the most important pests in cultivated crops. Physiological understanding is one of the basic steps to control pests by chemicals and pathogens. In this study, Lipase enzyme characteristics in mid gut of cotton boll worm were studied. Studying of enzyme activity and other treatments were done by Auto analyzer and chromogenic method. The highest and longest enzyme activity were observed in the 6<sup>th</sup> instar larvae and male adults, respectively, The highest enzyme activity was observed at 40°C. Optimum pH for lipase enzyme activity in the mid gut was 9.5. After eight week enzyme activity at -20°C was 17% of its activity in the first week. While enzyme activity at 4°C after five weeks, was 6% of its activity in the first week, then enzyme activity completely stopped. The results of the study of enzyme activity at different times of starvation showed that enzyme activity after four day starvation was reduced to approximately 9% of its activity when larvae had fed. Enzyme activity was decreased by ethanol 96%, and 3, 4 and 5mM of NaCl and 3, 4 and 5mM of CaCl<sub>2</sub> and different concentrations of SDS. Enzyme activity was increased by 1 and 2mM of NaCl and 5mM of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Different concentrations of Tris, EDTA concentration up to 25% ethanol and 4mM of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> also had no observed effect on enzyme activity.

**Keyword:** Cotton boll worm, Enzyme Activity, Lipase.