

## خالص سازی و تعیین ویژگی های لیپاز گوارشی سن معمولی گندم، *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae)

### آرش زیبایی\*

\*نویسنده مسوول: استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران (arash.zibae@mx.com)

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۲۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۰۵

### چکیده

دانه های گندم حاوی ۱۳-۸ درصد چربی در ژرم پلاست خود هستند که در سطح مولکول های نشاسته قرار گرفته و سبب افزایش کیفیت آرد می شوند. حشرات برای استفاده از منابع غذایی به آنزیم های گوارشی وابسته هستند. علیرغم اینکه چربی ها بخش قابل توجهی از مولکول های غذا را تشکیل می دهند، اما پژوهش های کمی در مورد آنزیم های تجزیه کننده آن ها انجام شده است. در این پژوهش، آنزیم لیپاز گوارشی از معده سن معمولی گندم، *Eurygaster integriceps* که آفت اصلی گندم در ایران است خالص سازی و تعیین ویژگی شد. فرآیند خالص سازی، آنزیمی با وزن مولکولی ۲۵/۴ کیلو دالتون، بازیابی ۱۹/۵۸ درصد، نسبت خالص سازی ۶۹/۷۰ و فعالیت ویژه ۲/۳۷ میکرومول بر میلی گرم پروتئین را نشان داد. آزمایش های اسیدیته و دمای بهینه بیشترین فعالیت آنزیمی را در اسیدیته ۶ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نشان دادند. انکوباسیون آنزیم در این مقادیر نشانگر ثبات آنزیمی به مدت ۳-۱ ساعت بود. غلظت های مختلف EDTA و PMSF برای مشخص کردن ویژگی مکان فعالیت آنزیم استفاده شدند. غلظت های مختلف EDTA تأثیری بر فعالیت آنزیمی نداشت اما PMSF به طور معنی داری آن را کاهش داد. تجزیه و تحلیل کینتیک، بازدارندگی مخلوط PMSF روی لیپاز خالص شده سن گندم را نشان داد. مطالعه لیپازهای حشرات به دلیل نقش هیدرولیزکنندگی آن ها علیه بازدارنده های پروتئازی استفاده شده در گیاهان تراریخته اهمیت دارد و می تواند راهگشای مدیریت پایدار آفات از طریق گیاهان تراریخته شود.

**کلید واژه ها:** *Eurygaster integriceps*، لیپاز گوارشی، خالص سازی، بازدارنده

### مقدمه

استفاده از منابع غذایی مختلف یکی از توانایی های کلیدی حشرات برای موفقیت تکامل و تنوع آن هاست (Nation, 2008). تغذیه از منبع غذایی مناسب سبب رشد سریع تر حشره و توانایی تولیدمثل بیشتر می شود. اجزای اصلی غذای حشرات عبارت از کربوهیدرات ها، چربی ها و پروتئین ها هستند که حشرات برای استفاده از آن ها نیازمند کاربرد کربوهیدرازها، لیپازها و پروتئازها می باشند. چربی ها از واحدهای اسیدچرب ساخته شده اند که در تولید چربی های ذخیره ای و غشاهای سلولی اهمیت دارند. از چربی های ذخیره ای موجود در بذرها و بافت های

جانوری می توان به تری گلیسرید اشاره کرد که توسط لیپازها هیدرولیز می شود (Terra and Ferreira, 2005). لیپازها پیوندهای استری خارجی تری گلیسریدها را هیدرولیز کرده و مهم ترین ویژگی آن ها فعالیت روی سوبستراها در حدواسط بین فازهای قطبی و غیرقطبی است (Terra and Ferreira, 2005; Grillo et al., 2007). لیپازهای گوارشی حشرات در تعدادی از حشرات مانند کرم ساقه خوار نواری برنج، کرم سبزی برگخوار برنج، سفیده بزرگ کلم و کرم گلوگاه انار بررسی شده اند (Terra and Ferreira, 2005; Ranjbar et al., 2015; Zibae et al., 2009; Zibae, 2012)

باشد. علاوه بر این، دانه های گندم حاوی ۸ تا ۱۳ درصد چربی هستند که برای رشد و جوانه زنی بذر اهمیت دارد (Stramkova et al., 2009). بنابراین اهداف پیش رو جهت بررسی حضور و ویژگی های آنزیمی لیپاز گوارشی سن گندم مد نظر قرار گرفتند. در ابتدا فعالیت لیپاز گوارشی در بخش های مختلف معده ارزیابی شد تا مکان اصلی فعالیت این آنزیم نسبت به سایر بخش ها مشخص شود. سپس آنزیم هدف با استفاده از آمونیوم سولفات و دو ستون کروماتوگرافی خالص شد. در نهایت ویژگی های آنزیمی لیپاز خالص شده از جمله اسیدیته و دمای بهینه و وضعیت مکان فعال آن با استفاده از دو بازدارنده اصلی تعیین شدند.

### مواد و روش ها

#### حشرات

افراد بالغ سن گندم در اوایل بهار ۱۳۹۱ از مزارع گندم رستم آباد استان گیلان جمع آوری شده و بعد از تخمگذاری، پوره های تفریح شده به ظروف (۱۵×۲۰ سانتی متری) منتقل شده و با دانه های گندم و پنبه آغشته به آب در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۸۰ درصد و دوره روشنایی به تاریکی ۱۶:۸ تا بلوغ تغذیه شدند و سپس افراد بالغ به وجود آمده از نسل جدید برای انجام آزمایش ها به کار گرفته شدند.

#### آماده سازی نمونه های بیوشیمیایی

افراد بالغ سن معمولی گندم از ظروف پرورش جدا شده و روی یخ بی حس شدند، سپس در زیر استریومیکروسکوپ و در پتری حاوی بافر نمکی حاوی کلرید سدیم ۱۰ میلی مولار به کمک پنس و تیغ تشریح بدن آن ها برش داده شده و دستگاه گوارش خارج شد. روده های میانی به تعداد ۱۰ عدد به میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۸۰۰ میکرو لیتر آب مقطر منتقل شدند. ابتدا به کمک هموژنایزر دستی، بافت های روده میانی هموژنایز شده، سپس هموژنایت ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. مایع رانشین حاصل در دمای ۲۰-

(et al., 2008). این آنزیم ها اسیدهای چرب را در موقعیت آلفا جدا کرده و از نظر فعالیت تا حدی شبیه لیپاز پانکراس پستانداران هستند (Terra and Ferreira, 2005).

سن معمولی گندم، *Eurygaster integriceps* (Puton (Hemiptera: Scutelleridae) آفت اصلی گندم در ایران، شمال آفریقا و شرق اروپاست که خسارت مستقیم و غیرمستقیم آن روی گندم گزارش شده است (Kinaci and Kinaci, 2004). در ابتدا، پوره ها و افراد بالغ قطعات دهانی خود را وارد دانه کرده و مواد مایع شده را می مکند. بعد بزاق تزریق شده به بافت ارزش نانوائی دانه ها را به دلیل هیدرولیز پروتئین گلو تن کاهش می دهد (Aja et al., 2004؛ Kinaci and Kinaci, 2004). این حشره یکی از موانع اصلی تولید گندم بوده و روش های مختلف کنترل آن طی دهه های متوالی کارآمد نبوده اند. تاکنون پژوهش های زیادی روی فیزیولوژی گوارش سن معمولی گندم انجام شده است. آلفا-آمیلاز گوارشی این حشره خالص سازی شده و تأثیر بازدارنده های استخراج شده از ارقام فلات و مهدوی بر کاهش فعالیت آنزیم بررسی شده است (Kazzazi, 2005). فعالیت آلفا- و بتا-گلو کوزیداز گوارشی در سن معمولی و سن *Eurygaster maura* بررسی شده است (Mehrabadi et al., 2011). حضور پروتئازهای تریپسین و کیموتریپسین در معده سن معمولی گندم گزارش شده و نشان داده شده است که بیشترین بازدارندگی توسط بازدارنده اختصاصی کیموتریپسین و بازدارنده استخراج شده از سویا ایجاد شده است (Saadati and Bandani, 2011). با در نظر گرفتن نقش مهم آنزیم های گوارشی در هضم و جذب حشرات، درک کامل فرآیند هضم و اهمیت آنزیم های درگیر ضرورت دارد. علاوه بر این، لیپازها به دلیل داشتن نقش هیدرولازی می توانند بازدارنده های بیان شده در ارقام مقاوم یا تراریخته را هیدرولیز کنند (Terra and Ferreira, 2005). بنابراین خالص سازی و تعیین ویژگی های آنزیمی لیپازها می تواند در موفقیت برنامه های ایجاد گیاهان مقاوم اهمیت داشته

سپس فرکشن گیری به صورتی انجام شد که جریان خروجی ۲۰ میلی لیتر بر ساعت و حجم هر فرکشن ۱ میلی لیتر باشد. در ادامه غلظت پروتئین و فعالیت لیپاز اندازه گیری شد و فرکشن های با بیشترین فعالیت با هم مخلوط شدند. فرکشن های حاصل از کروماتوگرافی مرحله اول، به ستون کروماتوگرافی سی. ام. سفادکس<sup>۶</sup> منتقل شده و فرکشن گیری انجام شد. در مرحله بعدی ستون با استفاده از غلظت های ۰-۰/۴ مولار نمک طعام شستشو داده شد. جریان خروجی ۶۰ میلی لیتر بر ساعت و حجم هر فرکشن ۱ میلی لیتر بود. فرکشن های دارای بیشترین فعالیت آنزیم جدا و با هم مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس برای انجام آزمایش های بعدی نگه داری شدند.

### الکتروفورز احیایی

تشخیص کیفی فعالیت لیپازی و آنزیم خالص شده با استفاده از ژل اکریل آمید<sup>۷</sup> ۱۰٪ و ۴٪ انجام شد (Laemml, 1970). الکتروفورز غیر احیایی در ولتاژ ثابت ۱۱۰ میلی ولت و در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. هنگامی که رنگ به پایین رسید، ژل به دقت جدا شده و به مدت ۱۵ دقیقه در بافر یونیورسال قرار داده شد. سپس در آب مقطر شسته شد و بلافاصله با مخلوط کوماسی بلو<sup>۸</sup> (R-250) ۰/۱ درصد، متانول<sup>۹</sup> - اسید استیک<sup>۱۰</sup> - آب مقطر (۵۰:۱۰:۴۰) به مدت ۱۲ ساعت رنگ آمیزی شد. رنگ بری در متانول - اسید استیک - آب مقطر (۵۰:۱۰:۴۰) به مدت حداقل ۲ ساعت انجام شد. بررسی فعالیت لیپاز در بخش های مختلف معده سن معمولی گندم با استفاده از سوبسترای فلورسنت ۴-methylumbelliperyl-butyrate به غلظت ۵ میلی مولار انجام شد.

### اثر اسیدیته و دما بر فعالیت آنزیم

اثر اسیدیته بر فعالیت لیپاز با استفاده از بافر یونیورسال

درجه سلسیوس تا زمان انجام بررسی ها نگه داری شد. از ترکیب حاصل (آنزیم) در آزمایش های بیوشیمیایی پیش رو استفاده شد.

### سنجش فعالیت لیپاز

تعیین فعالیت لیپاز بر اساس روش Tsujita et al. (1989) انجام شد. مخلوط واکنش شامل: ۱۰ میکرولیتر آنزیم (مایع روشن حاصل از سانتریفیوژ)، ۲۰ میکرولیتر پی-نیتروفنیل بوتیریت<sup>۱</sup> ۲۷ میلی مولار به عنوان سوبسترا و ۴۵ میکرولیتر بافر یونیورسال ۲۰ میلی مولار (شامل گلايسين<sup>۲</sup>، سوکسینات<sup>۳</sup> و ۲-مورفولینواتان سولفوریک اسید<sup>۴</sup>) با اسیدیته ۷ بود که در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. برای کنترل منفی، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری (حمام آب گرم) قرار داده شده و سپس سرد شدند. بعد از ۱۰ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار به هر کدام از میکروتیوپ ها اضافه و سپس در جذب نوری ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند. آزمایش سنجش لیپاز در سه تکرار انجام شد.

### خالص سازی لیپاز

از روش Orsclik et al. (2005) برای خالص سازی لیپاز گوارشی سن معمولی گندم استفاده شد. نمونه های آنزیمی به دست آمده با سولفات آمونیوم ۳۵ و ۷۵ درصد به صورت اشباع درآمدند و به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از هر رسوب دهی به وسیله سولفات آمونیوم، رسوبات جمع آوری شده و در حجم کمی از بافر یونیورسال ۲۰ میلی مولار با اسیدیته ۷ محلول شدند. سپس نمونه ها به کیسه های دیالیز (با منافذ ۱۲ کیلودالتون) منتقل شده و در حدود ۱ لیتر بافر با اسیدیته ۷ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس تکانیده شدند تا سولفات آمونیوم خارج شود. نمونه های دیالیز شده به ستون سفاریل جی - ۱۰۰<sup>۵</sup> که قبلاً با بافر یونیورسال (اسیدیته ۷) کالیبره شده بود منتقل شدند.

6- CM-Sephadex

7- Acrylamide

8- Commassie Brilliant Blue

9- Methanol

10- Acetic acid

1- *p*-nitrophenyl butyrate

2- Glycine

3- Succinate

4- 2-Morpholinoethan sulfuric acid

5- Sepharyl G-100

پارامترهای آنزیمی لیپاز در سه تکرار انجام شد.

### تعیین پروتئین

غلظت پروتئین نمونه های حاصل از سانتریفیوژ (آنزیم) با استفاده از آلومین سرم گاوی به عنوان استاندارد انجام شد (Bradford, 1976). آزمایش در سه تکرار انجام شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

همه داده های به دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شدند. مقایسه میانگین ها با آزمون توکی در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

#### سنجش لیپاز در بخش های مختلف معده

در پژوهش حاضر، مشخص شد که آنزیم لیپاز در معده سن معمولی گندم وجود داشت و فعالیت آن در بخش های مختلف معده متفاوت بود. مشخص شده است که معده سن گندم چند قسمتی و شامل بخش های  $V_1^4$ ،  $V_2$ ،  $V_3$  و  $V_4$  است (Mehrabadi et al., 2009)؛ که در تشریح انجام شده در این پژوهش هم  $V_1$  کوتاه،  $V_2$  حجیم،  $V_3$  طویل و  $V_4$  کوتاه مشاهده شد (شکل ۱) و بیشترین کمترین فعالیت لیپاز در بخش های  $V_3$  و  $V_4$  مشاهده شد (شکل ۲). در زایموگرام با استفاده از سوبسترای فلورسنت باندهای واضحی در بخش  $V_3$  مشاهده شد که مطابق نتایج آزمایش بیوشیمیایی بود (شکل ۳). بخش  $V_3$  محل اصلی فرآیندهای هضم و جذب در معده سن معمولی گندم است. این بخش دارای غشاهای میکروویلار<sup>۵</sup> و پری میکروویلار<sup>۶</sup> هستند که با داشتن سلول های ستونی دارای میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی خشن و چین خوردگی غشای تحتانی مشخص می شوند. این ویژگی ها نشان دهنده اهمیت این بخش معده در فرایندهای گوارشی سن معمولی گندم است (Mehrabadi et al., 2012).

۲۰ میلی مولار در محدوده اسیدیته ۱۲-۳ مشخص شد. مخلوط واکنش شامل: ۴۰ میکرولیتر بافر با اسیدیته مختلف، ۱۵ میکرولیتر سوبسترا و ۱۰ میکرولیتر آنزیم (مایع رونشین حاصل از سانتریفیوژ) بود. سپس جذب نوری در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. اثر دما بر فعالیت لیپاز خالص شده با استفاده از بافر یونیورسال ۲۰ میلی مولار با اسیدیته ۶ در دماهای مختلف ۷۰-۱۰ درجه سلسیوس انجام شد. برای تعیین پایداری آنزیم در اسیدیته و دمای بهینه، مخلوط واکنش در اسیدیته و دمای بهینه به مدت ۱ تا ۷۲ ساعت انکوبه شده و سپس فعالیت لیپاز سنجش شد. آزمایش های سنجش اسیدیته و دمای بهینه لیپاز در سه تکرار انجام شد.

#### تأثیر دو بازدارنده اختصاصی بر فعالیت لیپاز خالص شده سن معمولی گندم

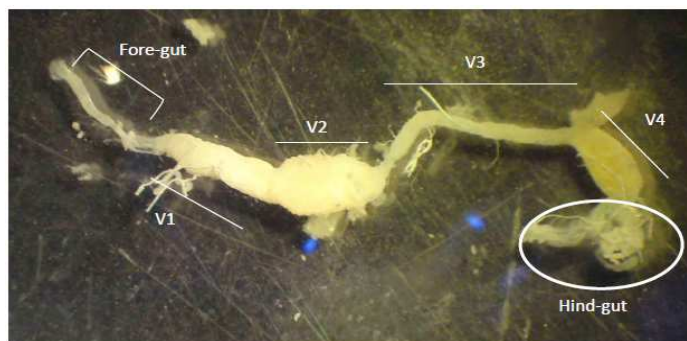
غلظت های مختلف (۰/۰۱، ۰/۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی مولار)  $PMSF^1$  و  $EDTA^2$  برای تعیین حضور اسیدهای آمینه یا یون های دو ظرفیتی در مکان فعال آنزیم استفاده شدند. مخلوط واکنش شامل ۴۰ میکرولیتر بافر یونیورسال اسیدیته ۶، ۱۵ میکرولیتر سوبسترا، ۱۰ میکرولیتر از هر غلظت بازدارنده به طور جداگانه و ۱۵ میکرولیتر آنزیم (مایع رونشین حاصل از سانتریفیوژ) خالص شده بود. بقیه مراحل آزمایش همانند فوق انجام شد. آزمایش تأثیر بازدارنده ها در سه تکرار انجام شد.

#### اندازه گیری پارامترهای آنزیمی

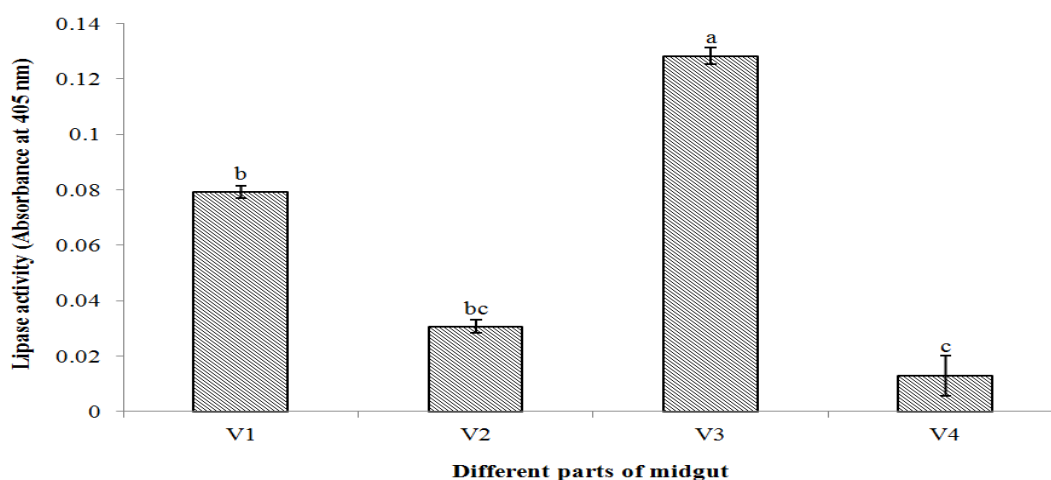
جهت تعیین مقدار پارامترهای آنزیمی لیپاز خالص سازی شده (شاهد) و غلظت  $IC_{50}$  از  $PMSF$  در غلظت های مختلف سوبسترا شامل ۱، ۲، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ میلی مولار (برای شاهد) و همان غلظت ها با مقدار  $IC_{50}$  بازدارنده انکوبه شدند. سایر اجزا و مراحل واکنش همانند فوق بود. مقادیر به دست آمده به فعالیت ویژه تبدیل شد و در نهایت کینتیک آنزیم با استفاده از نرم افزار سیگما پلات<sup>۳</sup> نسخه ۶ محاسبه شد. آزمایش سنجش

4- Ventriculus  
5- Microvillar  
6- Premicrovillar

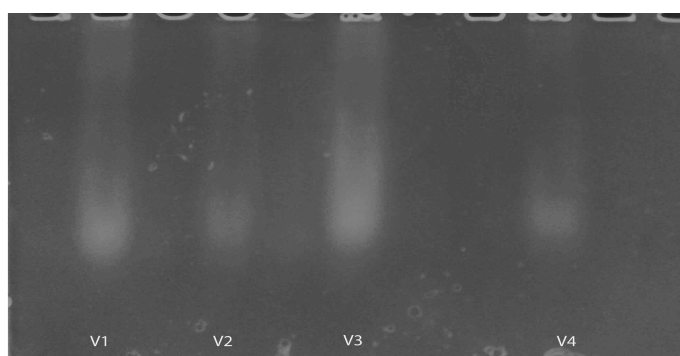
1- Phenyl methyl sulfonyl fluoride  
2- Ethylene diamine tetraacetic acid  
3- Sigma plot



شکل ۱- ریخت‌شناسی دستگاه گوارش *Eurygaster integriceps*  
 Figure 1. Morphology of digestive tract of *Eurygaster integriceps*



شکل ۲- فعالیت لیپاز در بخش‌های مختلف معده *Eurygaster integriceps*  
 حروف مختلف نشانگر تفاوت آماری میانگین‌هاست (آزمون توکی، سطح احتمال ۵ درصد)  
 Figure 2. Lipase activity in different parts of the midgut in *Eurygaster integriceps*.  
 Different letters show statistical differences among means (Tukey test,  $p \leq 0.05$ )



شکل ۳- زایموگرام فعالیت لیپاز با استفاده از سوبسترای فلورسنت در بخش‌های مختلف معده *Eurygaster integriceps*  
 Figure 3. Zymogram of lipase activity using fluorescent substrate in different parts of the midgut in *Eurygaster integriceps*

ستون سفاریل جی-۱۰۰ نشان دادند (شکل ۴). این فرکشن‌ها با هم یکی شده و مقدار پروتئین و فعالیت لیپازی آن‌ها به ترتیب ۰/۱ میلی گرم بر دسی لیتر و ۰/۰۲۵

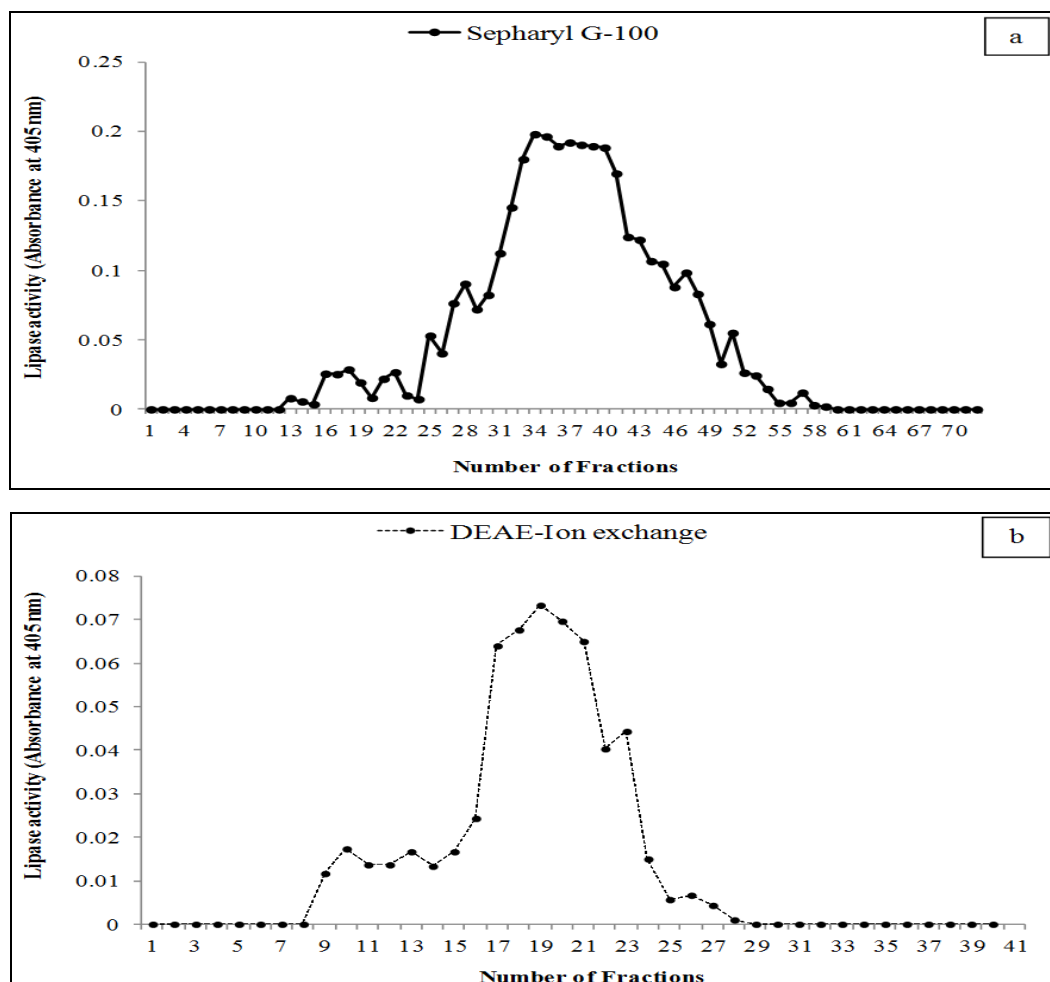
### خالص‌سازی لیپاز

فرکشن‌های ۱ تا ۳۴ تا ۴۰ بیشترین فعالیت آنزیمی را

1- Fractions

وزن مولکولی ۵۱ کیلودالتون برای آن گزارش شده است (Zibae and Fazeli-Dinan, 2012). وزن مولکولی ۲۵ کیلودالتون برای لیپاز گوارشی لاروهای کرم گلوگاه انار، *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) است (Ranjbar et al., 2015). بر اساس پژوهش روی چندین گونه از حشرات راسته های نیم بالان، سخت بالپوشان، دوبالان و بالپولکداران نتیجه گیری کردند که لیپاز حشرات ممکن است وزن مولکولی بین ۱۰۰-۲۵ کیلودالتون داشته باشند که وابسته به وضعیت مکان فعال آنزیم و دومین های<sup>۱</sup> جانی آن است (Horne et al., 2009).

میکرومول بر دقیقه تعیین شد (جدول ۱). در ستون سفادکس و با استفاده از غلظت های ۰/۰۵-۰/۵ مول کلرید سدیم، فرکشن های ۱۷-۲۱ بیشترین فعالیت لیپازی را نشان دادند (شکل ۴). در انتهای این مرحله، نسبت خالص سازی ۶۹/۷۰، بازیابی ۱۹/۵۸ درصد و فعالیت ویژه ۲/۳۷ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم بر پروتئین به دست آمد (جدول ۱). جداسازی پروتئین ها توسط الکتروفورز احیایی هم یک باند منفرد با وزن مولکولی ۲۵/۴ کیلودالتون را نشان داد (شکل ۵). لیپاز گوارشی کرم سبز برگخوار برنج، *Naranga aenescens* Moore (Lepidoptera: Noctuidae) خالص شده و



شکل ۴- کروماتوگرافی لیپاز گوارشی سن *Eurygaster integriceps* (a) ستون سفاریل جی -۱۰۰، (b) ستون تعویض یونی سفادکس

Fig.4. Chromatography of digestive lipase in *Eurygaster integriceps*. a). Sepharyl G-100. b) Ion-exchange of cephadex

جدول ۱- خالص سازی لیپاز گوارشی *Eurygaster integriceps*  
**Table 1. Purification of the digestive lipase in *Eurygaster integriceps***

Purification steps	Unit activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Protein concentration (mg)	Specific activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	Recovery (%)	Purification fold
Crude	0.097 $\pm$ 0.0023	2.83 $\pm$ 1.02	0.034 $\pm$ 0.007	100	1
Ammonium sulfate (35%)	0.08 $\pm$ 0.0016	2.39 $\pm$ 1.47	0.035 $\pm$ 0.004	82.47	1.02
Ammonium sulfate (75%)	0.058 $\pm$ 0.001	1.29 $\pm$ 0.44	0.044 $\pm$ 0.011	59.79	1.29
Sepharyl G-100	0.025 $\pm$ 0.007	0.1 $\pm$ 0.035	0.025 $\pm$ 0.008	25.77	7.35
Cephadex	0.019 $\pm$ 0.002	0.008 $\pm$ 0.001	2.378 $\pm$ 0.91	19.58	69.70



شکل ۵- الکتروفورز احیایی لیپاز خالص شده *Eurygaster integriceps* جهت تعیین خلوص و وزن مولکولی  
**Figure 5. Denaturing electrophoresis of the digestive lipase in *Eurygaster integriceps* to find purity and molecular weight**

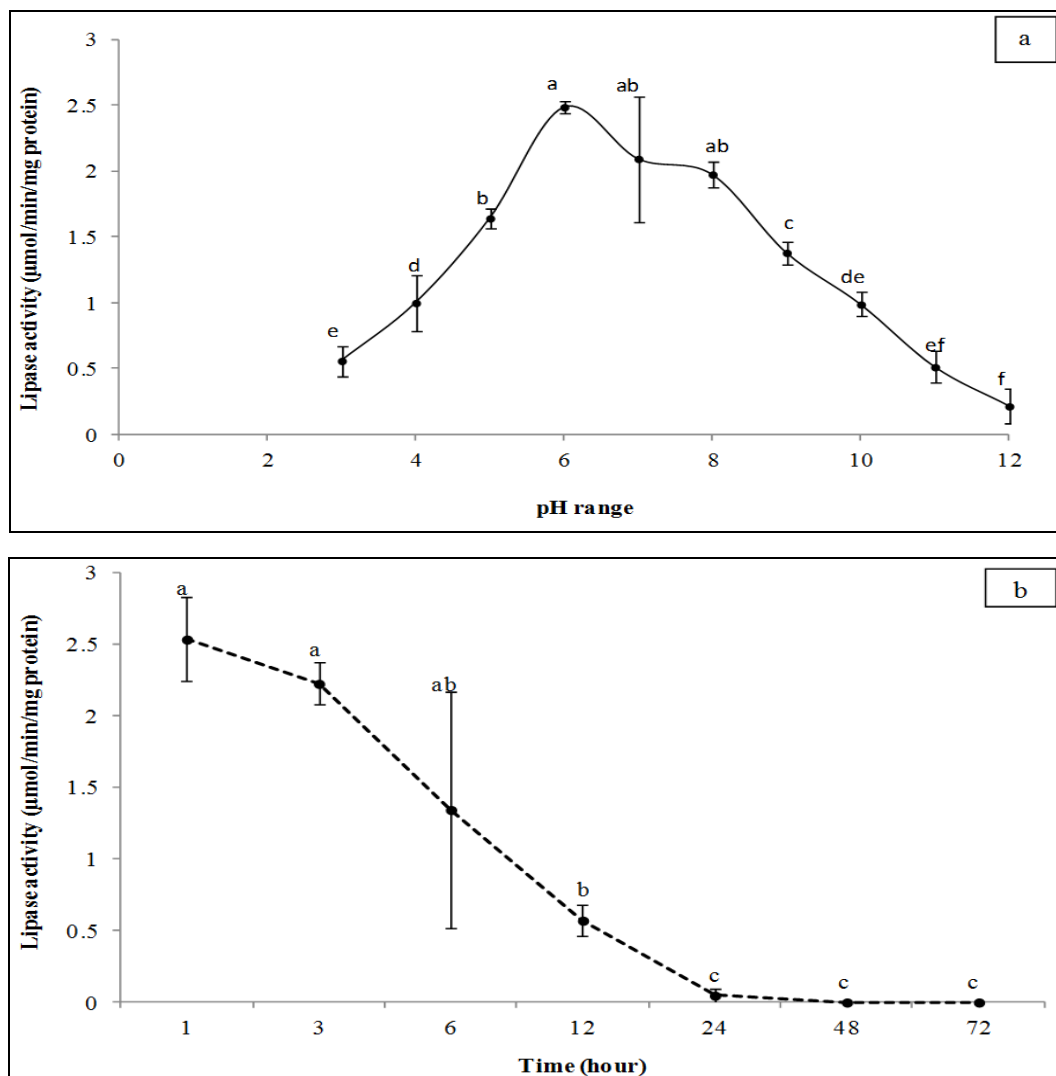
درجه سلسیوس گزارش شد (Zibae and Fazeli-Dinan, 2012). اسیدیته بهینه لیپاز محلول و متصل شده به سلول‌های پوششی معده لاروهای سفیده بزرگ کلم، *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) به ترتیب ۸ و ۱۰ گزارش شده است (Zibae, 2012). در کرم گلوگاه انار اسیدیته ۷ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به عنوان مقادیر بهینه فعالیت لیپاز گوارشی لاروها گزارش شده است (Ranjbar et al., 2015). در کرم شاخدار توتون، *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) مشاهده شد که فعالیت لیپاز با اسیدیته قلیایی معده تسریع یافت (Tsuji et al., 1989; Terra and Ferreira, 2005). از آنجایی که حشرات موجودات خونسردی هستند بنابراین دمای محیط می‌تواند بر فعالیت‌های فیزیولوژیک

#### اسیدیته و دمای بهینه لیپاز خالص شده

عوامل محیط بیوشیمیایی همچون اسیدیته و دما می‌توانند فعالیت‌های آنزیمی را تحت تأثیر قرار دهند. اسیدیته بهینه لیپاز خالص شده سن معمولی گندم ۶ به دست آمده و پایداری آنزیم در این شرایط ۳ ساعت مشاهده شد (شکل ۶). دمای بهینه هم ۲۵ درجه سلسیوس با ثبات آنزیمی ۱ ساعت تعیین شد (شکل ۷). لیپاز گوارشی سن *Rhodnius prolixus* L. (Hemiptera: Reduviidae) در اسیدیته ۷-۷/۵ بیشترین فعالیت را داشت (Grillo et al., 2007). اسیدیته و دمای بهینه لیپاز لاروهای کرم ساقه خوار نواری برنج، *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) درجه ۳۷-۴۰ و ۱۰ (Zibae et al., 2008). این مقادیر در لاروهای کرم سبز برگ‌خوار برنج ۱۰ و ۴۰-۳۵

۶ به دست آمد که مشابه اسیدیت بهینه به دست آمده برای سایر آنزیم های گوارشی سن معمولی گندم است (Mehrabadi et al., 2009). به عبارت دیگر، فعالیت بهینه آلفا-آمیلاز، آلفا- و بتا-گلوکوزیداز در محدوده اسیدیت ۵-۷ گزارش شده است. علاوه بر این، پژوهش های مولکولی دو نوع لیپاز اسیدی و خنثی را در گروه های انتخاب شده ای از حشرات مشخص نموده است که این وضعیت در نتیجه الزام حشرات به ذخیره فوری چربی های ذخیره ای است (Horne et al., 2009).

آن ها تأثیر گذارد. این دما در مقدار بهینه سبب افزایش کیفیت و کارایی فعالیت های فیزیولوژیک می شود که فعالیت آنزیمی هم جزیی از آن است. بنابراین دمای بهینه ۲۵ درجه سلسیوس می تواند بازخوردی از دمای محیطی باشد که سن معمولی گندم در آن فعالیت می کند. اسیدیت سه ناحیه ابتدایی معده سن معمولی گندم اسیدی (۵-۵/۲) اما ناحیه چهارم نیمه اسیدی (۶/۲-۶/۸) گزارش شده است (Mehrabadi et al., 2009). اسیدیت فعالیت بهینه آنزیم لیپاز خالص شده در پژوهش حاضر



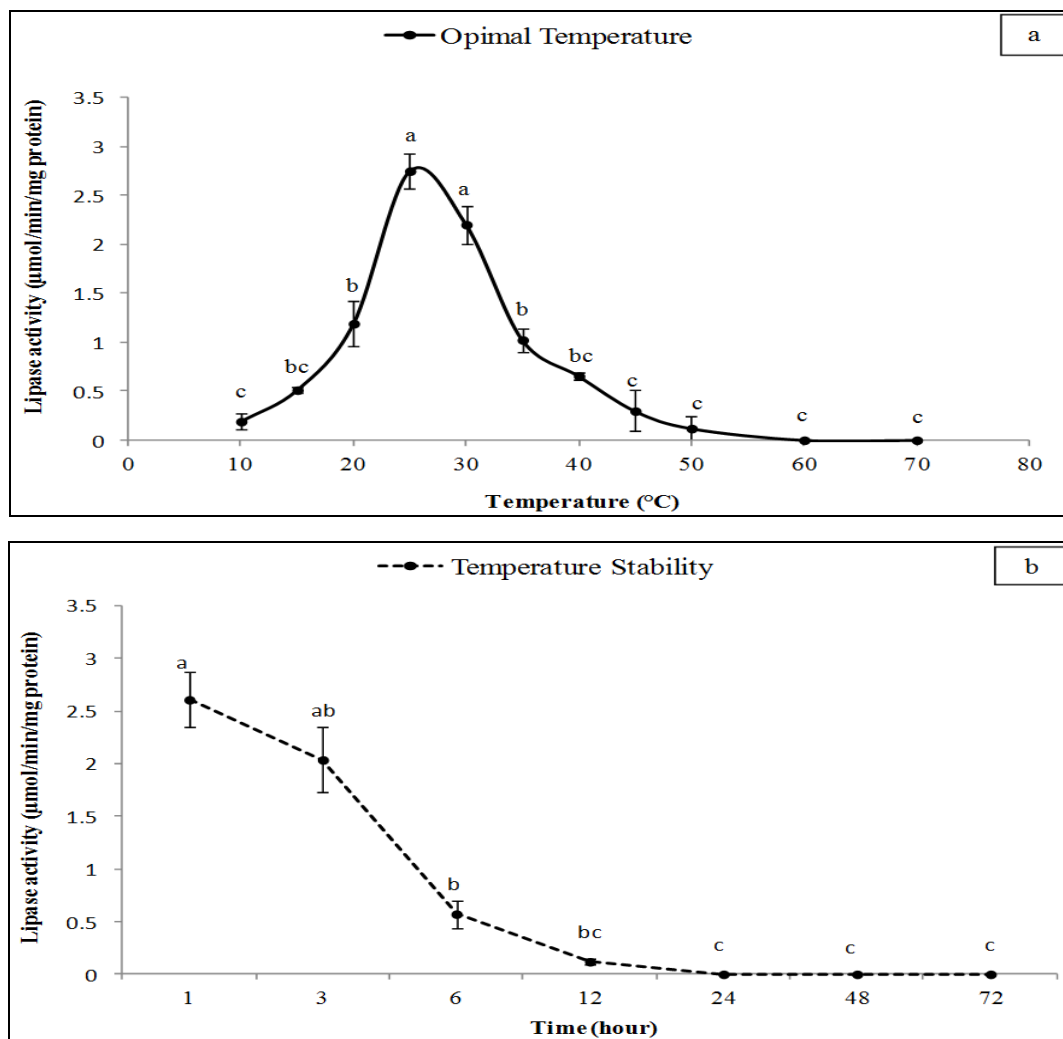
شکل ۶- اسیدیت بهینه (a) و پایداری (b) لیپاز خالص شده *Eurygaster integriceps*

حروف مختلف نشانگر تفاوت آماری میانگین هاست (آزمون توکی، سطح احتمال ۵ درصد)

Figure 6. Optimal pH (a) and stability (b) of the purified lipase in *Eurygaster integriceps*.

Different letters show statistical differences (Tukey test,  $p \leq 0.05$ )





شکل ۷- دمای بهینه (a) و پایداری (b) لیپاز خالص شده *Eurygaster integriceps*

حروف مختلف نشانگر تفاوت آماری میانگین‌هاست (آزمون توکی، سطح احتمال ۵ درصد)

Figure 7. Optimal temperature and stability of the purified lipase in *Eurygaster integriceps*.

Different letters show statistical differences (Tukey test,  $p \leq 0.05$ )

کاهش داد (شکل ۸b). در پژوهش‌های قبلی مشخص شده است که لیپازهای اسیدی و ختشی پستانداران و قارچ‌ها وابسته به تریاد، سرین، هستیدین و آسپارتیک اسید بوده است (Hide et al., 1992; Brenner, 1988). Mhetras et al., 2009 که از این نظر شباهت زیادی به آنزیم‌های هیدرولازی همچون سرین پروتازها و استیل کولین استرازاها دارد (Holmquist, 2000). Horne et al., 2009. فعالیت تریاد سبب افزایش پتانسیل هسته دوستی اکسیژن سرین در واکنش با سوپسترا می‌شود (Horne et al., 2009). با استفاده از رگرسیون خطی و نرم‌افزار POLO-PC، مقدار  $IC_{50}$

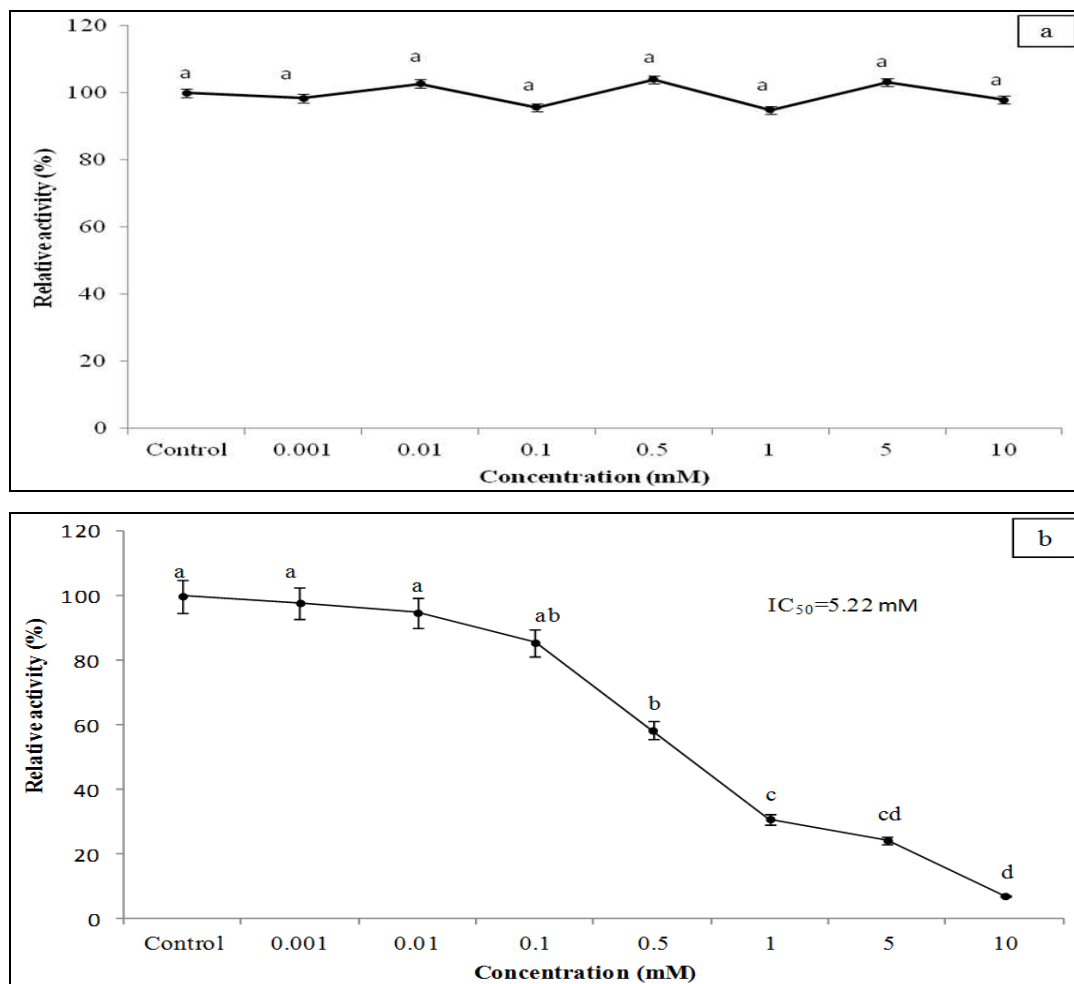
### تأثیر بازدارنده‌ها بر لیپاز خالص شده

اسیدهای آمینه و یون‌های فلزی در مکان فعال آنزیم‌ها وجود دارند. در پژوهش حاضر، غلظت‌های مختلف EDTA به‌عنوان عامل جداکننده یون‌های فلزی از مکان فعال آنزیم، تأثیر بازدارندگی بر لیپاز خالص شده سن معمولی گندم نداشت (شکل ۸a). اما غلظت‌های مختلف PMSF به‌عنوان بازدارنده اختصاصی تریاد<sup>۱</sup>، سرین<sup>۲</sup>، هستیدین<sup>۳</sup> و آسپارتیک اسید<sup>۴</sup> فعالیت لیپاز خالص شده را به ۷ درصد در برابر شاهد

- 1- Triad
- 2- Serine
- 3- Histidine
- 4- Aspartic acid

در  $K_m$  برای  $p \leq 0.00066$  و  $V_{max}$  برای  $p \leq 0.016$ ). این نوع بازدارندگی، بازدارنده همزمان با اتصال آنزیم به سوبسترا به مکان فعال متصل شده و سبب اثرات آلوستریک<sup>۴</sup> می شود. بازدارنده سبب تغییر کونفورماسیون<sup>۵</sup> ساختار آنزیم شده و اتصال سوبسترا به آنزیم مختل شده یا کاهش می یابد (Stryer, 1995). به طور کلی، اگرچه نحوه اتصال سوبسترا و سایر اجزای لیپازهای گوارشی حشرات به خوبی شناخته نشده اند اما تشابه ساختاری آن ها با هیدرولازهای موجودات دیگر می تواند نشانگر نوعی رابطه تکاملی در آن ها باشد (Horne et al., 2009).

این ترکیب (PMSF) ۵/۲۲ میلی مول تعیین شد. نمودارهای لینویر-بورک<sup>۱</sup> و میکائلیس-منتن<sup>۲</sup> مقادیر  $K_m$  و  $V_{max}$  ۲/۰۴ میکرولیتر بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین و ۵/۱۶ میلی مول را به عنوان پارامترهای کینتیک آنزیم لیپاز خالص شده سن معمولی گندم در شرایط شاهد و ۱/۸۵ میکرولیتر بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین و ۶/۷۴ میلی مول را در شرایط تیمار غلظت  $IC_{50}$  از PMSF تعیین کردند (شکل ۹). تجزیه و تحلیل آماری تفاوت های معنی داری بین مقادیر آنزیم شاهد و تیمار را نشان داد که نوعی بازدارندگی میکس<sup>۳</sup> یا مخلوط بود



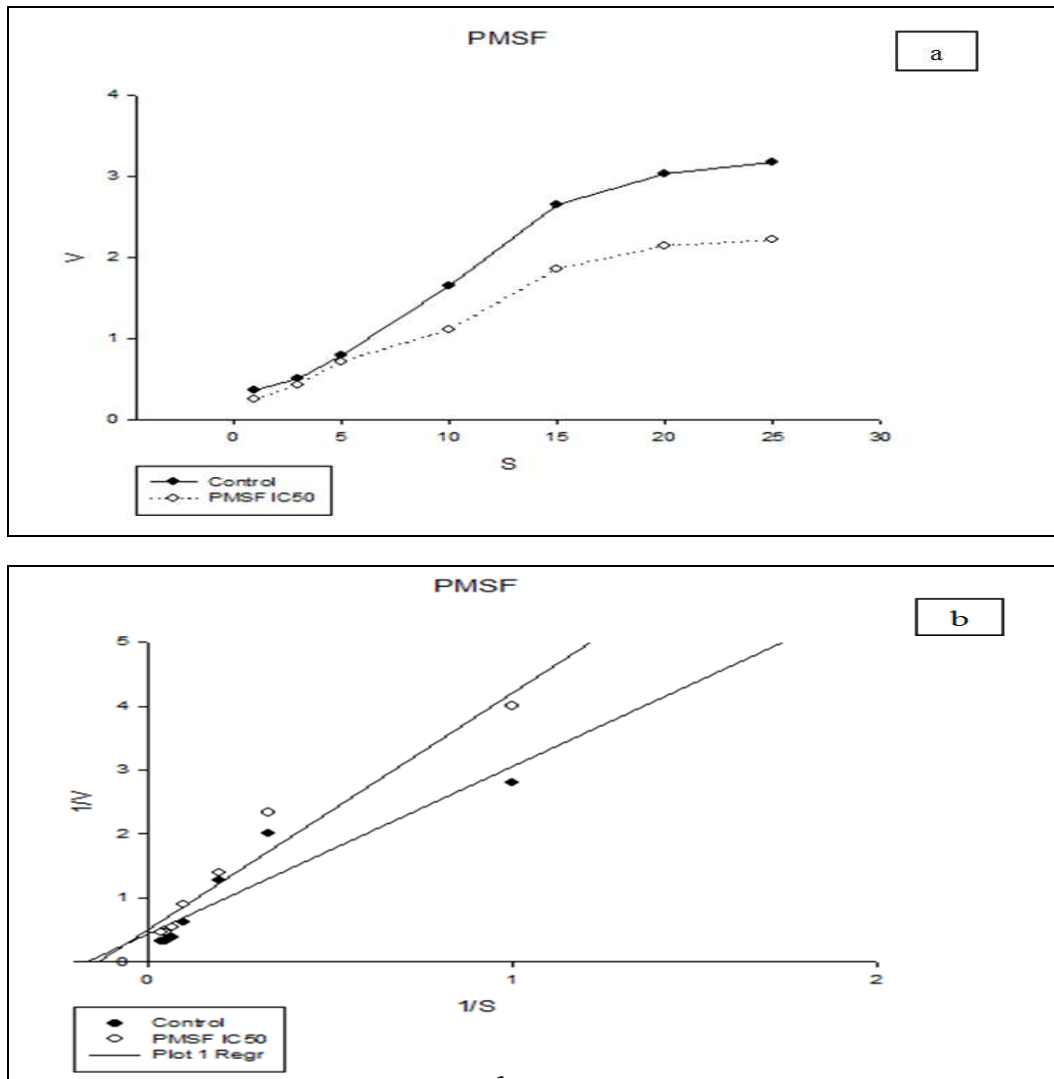
شکل ۸- تأثیر غلظت های مختلف EDTA (a) و PMSF (b) بر لیپاز خالص شده *Eurygaster integriceps*

حروف مختلف نشانگر تفاوت آماری میانگین هاست (آزمون توکی، سطح احتمال ۵ درصد)

Figure 8. Effects of different concentrations of EDTA (a) and PMSF (b) on the purified lipase of *Eurygaster integriceps*. Different letters show statistical differences (Tukey test,  $p \leq 0.05$ )

4- Allosteric  
5- Conformation

1- Linweaver-Burk  
2- Michaelis-Menten  
3- Mixed Inhibition



شکل ۹- نمودار میکائلیس-منتن (a) و لینویر-بورک (b) جهت تعیین پارامترهای کینتیک

لیپاز خالص شده *Eurygaster integriceps*

Figure 9. Michaelis-Menten (a) and Lineweaver-Burk (b) graphs to find kinetic parameters of the purified lipase in *Eurygaster integriceps*

کم مطالعه شده و درک ساختار آن‌ها می‌تواند جنبه‌هایی از فیزیولوژی گوارش حشرات را روشن کند. دوم، استفاده از گیاهان تراریخته حاوی بازدارنده به ویژه بازدارنده‌های پروتئازی می‌تواند به دلیل حضور لیپازها یا فعالیت زیاد آن‌ها در یک حشره خاص به شکست بیانجامد. بنابراین استفاده از بازدارنده‌هایی که به هیدرولیز شدن توسط لیپازها مقاوم باشند باید در نظر گرفته شوند. بررسی ساختار مولکولی و رفتار آن‌ها در محیط‌های بیوشیمیایی می‌تواند سبب موفقیت استفاده در بازدارنده‌ها علیه حشرات آفت شود.

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش، لیپاز گوارشی سن معمولی گندم خالص سازی و تعیین ویژگی شده و مشخص شد که مولکولی با وزن کم و دارای تریاد اسید آمینه‌ای در مکان فعال است. نتایج این پژوهش با تنها بررسی مولکولی لیپازهای گوارشی حشرات تطابق داشت (Horne et al., 2009). علاوه بر این مشخص شد که بازدارنده PMSF می‌تواند این آنزیم را مهار کند. مطالعه لیپازهای گوارشی حشرات به دو دلیل زیر می‌تواند مورد توجه قرار گیرند. اول، این آنزیم‌ها بسیار

**سپاس گزاری**

سبب در اختیار گذاشتن حشرات و بررسی های آزمایشگاهی

سپاس گزاری می شود.

از دکتر جلیل حاجی زاده و مهندس مهدی سلیمی به

**REFERENCES**

Aja, S., Perez, G., and Rosell, C. M. 2004. Wheat damage by *Aelia* spp. and *Eurygaster* spp.: Effects on gluten and water-soluble compounds released by gluten hydrolysis. *Journal of Cereal Science*, 39: 187-193.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Brenner, S. 1988. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature*, 334: 528-530.

Grillo, L.A., Majerowicz, D., and Gondim, K.C. 2007. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37: 579-588.

Hide, W.A., Chan, L., and Li, W.H. 1992. Structure and evolution of the lipase superfamily. *Journal of Lipid Research*, 33: 167-178.

Holmquist, M. 2000. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: Structures, functions and mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, 1: 209-235.

Horne, I., Haritos, V.S., and Oakeshott, J.G. 2009. Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39: 547-567.

Kazzazi, M. 2005. Digestive carbohydrases of *Eurygaster integriceps*. Ph. D dissertation in University of Tehran, 111 P. (In Farsi).

Kinaci, E., and Kinaci, G. 2004. Quality and yield losses due to sunn pest (Hemiptera: Scutelleridae) in different wheat types in Turkey. *Field Crop Research*, 89: 187-195.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Mehrabadi, M., Bandani, A. R., Saadati, F., and Ravan, S. 2009. Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Putton (Hemiptera: Scutelleridae), digestive  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12: 79-83.

Mehrabadi, M., Bandani, A.R., Allahyari, M., and Serrao, J.E. 2012. The sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae) digestive tract: Histology, ultrastructure and its physiological significance. *Micron*, 43: 631-637.

Mehrabadi, M., Bandani, A.R., and Kwon, O. 2011. Biochemical characterization of digestive  $\alpha$ -D-glucosidase and  $\beta$ -D-glucosidase from labial glands and midgut of wheat bug *Eurygaster maura* (Hemiptera: Scutelleridae). *Entomological Research*, 41: 81-87.

Mhetras, N.C., Bastawde, K.B., and Gokhale, D.V. 2009. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology*, 100: 1486-1490.

Nation, J.L. 2008. *Insect physiology and biochemistry*. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press, pp: 30-69.

Orselik, O., Akpınar, M.A., and Gorgun, S. 2007. Partial purification of total body lipase from *Gryllus campestris* L. (Orthoptera: Gryllidae). *Fen Bilimleri Dergisi*, 27: 1-10.

Ranjbar, M., Zibae, A., and Sendi, J. J. 2015. Purification and characterization of a digestive lipase in the midgut of *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Frontiers in Life Science*, 8: 66-74.

Saadati, F., and Bandani, A.R. 2011. Effects of serine protease inhibitors on growth and development and digestive serine proteinases of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *Journal of Insect Science*, 11: 1-14.

Sramkova, Z., Gregova, E., and Sturdika, E. 2009. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2: 115-138.

Stryer, L. 1995. *Biochemistry*. New York, W.H. Freeman and Company. 1514 pp.

Terra, W.R., and Ferreira, C. 2005. Biochemistry of digestion. In: Gilbert, L. I., Iatrou, K., Gill, S. S. (eds). *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier, San Diego, CA., pp: 171-224.

Tsujita, T., Ninomiya, H., and Okuda, H. 1989. *P*-nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, 30: 997-1004.

Zibae, A. 2012. Digestive enzymes of large cabbage white butterfly, *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) from developmental and site of activity perspectives. *Italian Journal of Zoology*, 79: 13-26.

Zibae, A., and Fazeli-Dinan, M. 2012. Purification and characterization of a digestive lipase in *Naranga aenescens* Moore (Lepidoptera: Noctuidae). *Sigpost Open Access Journal of Entomological Studies*, 1: 38-54.

Zibae, A., Bandani, A.R., and Ramzi, S. 2008. Lipase and invertase activities in midgut and salivary glands of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera, Pyralidae), rice striped stem borer. *Invertebrate Survival Journal*, 5: 180-189.

Zibae, A., Bandani, A.R., and Ramzi, S. 2009. Characterization of  $\alpha$  and  $\beta$ -glucosidases in midgut and salivary glands of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae), rice striped stem borer. *Comptes Rendus Biologies*, 332: 633-641.

## Purification and characterization of a digestive lipase in *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae)

A. Zibae\*

\***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. (arash.zibae@gmx.com)

Received: 26 December 2015

Accepted: 14 September 2016

---

### Abstract

Wheat grains contain 8-13% of lipid in their germplasm placed on molecular surface of starch increasing flour quality. Insects depend on digestive enzymes to utilize food resources. There are few studies on digestive lipases of insects with significant contribution of lipids in food molecules. In this study, a digestive lipase of *Eurygaster integriceps*, which is the major pest of wheat in Iran, was purified and characterized. The purification process revealed an enzyme with molecular weight of 25.4 kDa, recovery of 19.58, purification fold of 69.70 and specific activity of 2.37 micromol/min/mg protein. Optimal pH and temperature experiments showed the highest enzymatic activity at 6 and 25 °C, respectively. Enzyme incubation in these values revealed enzymatic stability for 1-3 hours. Different concentrations of EDTA had no effects on the enzymatic activity but PMSF significantly decreased it. Analysis of the enzymatic kinetic parameters showed mixed inhibition of PMSF on the purified lipase of the Sunn pest. Studying insect lipases is important due to their role in hydrolysis of proteinaceous inhibitors in transgenic plants so it may open a sustainable pest management via transgenic plants.

**Keywords:** *Eurygaster integriceps*, Digestive lipase, Purification, Inhibitor