



Investigating the characteristics of α -amylase and glucosidase enzymes in the digestive gland of brown citrus snail in the vicinity of essential oils of thyme, lavender and marjoram

H. Izadi Kahkesh¹ and M. Mohadjerani^{*2}

1. M.Sc. of Biochemistry, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
2. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran (m.mohajerani@umz.ac.ir)

Received: 20 May 2024

Revised: 28 August 2024

Accepted: 11 September 2024

Abstract

Background and Objectives: The brown snail is a major pest affecting citrus orchards in Iran. Using chemical pesticides can contaminate the air, water, and nearby crops. Due to the emergence of pest resistance to chemical toxins and their harmful and destructive effects on human health and the environment, one of the methods to control snails is to evaluate the activity and inhibition of their digestive enzymes. α -amylase and α -glucosidase enzymes are key enzymes in the digestive system, and their inhibition is crucial in biotechnology. Using natural sources as inhibitors for these two enzymes is a new goal due to fewer side effects than chemical inhibitors. The purpose of this study was to use the essential oils of thyme (*Thymus vulgaris* L.), lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.), and marjoram (*Origanum vulgare* L.) plants from the mint family to inhibit these two enzymes of the digestive gland of the brown snail.

Materials and Methods: In this study, α -amylase and α -glucosidase enzymes were extracted from brown citrus snails. The digestive glands were isolated from snails in starvation conditions. The enzyme extract was prepared after homogenization and centrifugation methods at 4 °C. Kinetic parameters and activity of α -amylase and α -glucosidase measured in the enzyme extract were measured. The total amount of proteins in the crude extract was measured by the Bradford method. The essential oil was prepared using a Clevenger apparatus. The activities and kinetic parameters of α -amylase and α -glucosidase enzymes in crude extract were measured in the presence of different concentrations of the essential oils of *T. vulgaris*, *L. angustifolia* and *O. vulgare*. α -amylase enzyme activity was measured according to Bernfeld's method at a fixed concentration of the starch solution, essential oils (0.1-6 mg/ml) and 250 μ l of the enzyme extract. The total volume was 2.5 ml in each experiment. α -glucosidase enzyme activity was determined based on the method of Siegentaler and Low with a slight change. In each experiment, different amounts of the essential oils (0.25-5 mg/ml) were incubated with the enzyme extract (15 μ l) and para-nitrophenyl alpha-D-glucopyranoside (20 μ l). The total volume was 200 μ l.

Results: The amount of protein in the crude enzyme extract was 0.2 mg/ml. The α -amylase activity was obtained at 0.278 U/ml, and the specific activity was 1.39 U/mg. The K_m and V_{max} values for α -amylase were measured as 0.13 mg/ml and 0.062 mg/ml/min, respectively. The α -glucosidase activity was obtained at 0.4 U/ml, and the specific activity was 2 U/mg. The IC_{50} values for the α -amylase in the presence of essential oils of *T. vulgaris*, and *L. angustifolia*., and *O. vulgare* were obtained at 2.462, 0.2816, and 0.114

mg/ml, and for α -glucosidase was obtained at 0.741, 2.036, and 1.668/ml, respectively. The GC-MS analysis found that the main constituents of the essential oils of *T. vulgaris*, *L. angustifolia* and *O. vulgare* were Carvacrol, D-Camphor, and Terpinene-4-ol, respectively. The essential oil of *O. vulgare* acted as an α -amylase inhibitor, and the thyme essential oil acted as an α -glucosidase inhibitor. Our experiments showed that the essential oil of *L. angustifolia* competitively inhibited the α -amylase. On the other hand, *O. vulgare* essential oil can act as an effective competitive inhibitor for the α -glucosidase. Therefore, compounds of D-Camphor and Terpineol, which are the main components of *L. angustifolia* and *O. vulgare* essential oils, are effective competitive inhibitors for α -amylase and α -glucosidase of the snail.

Discussion: Citrus snail is one of the most significant pests of agricultural products, which damages all kinds of citrus cultivars in gardens and nurseries by feeding on leaves, stems, fruits, and tree bark. Iran's rich pharmaceutical plant flora contains diverse compounds, including volatile ones like essential oils, which can be explored for their medicinal, insecticidal, fungicidal, and other properties. According to the literature, the snails have more than 20 types of carbohydrases. α -amylase and glucosidase are key enzymes in carbohydrate digestion and metabolism in insects that hydrolyze starch and glycogen. Our results showed that essential oils of *T. vulgaris*, *L. angustifolia* and *O. vulgare* or their active components can be proposed as environmentally friendly, low-cost, and accessible sources for the production of effective inhibitors against α -amylase and α -glucosidase of brown citrus snail.

Keywords: *α -amylase, α -glucosidase, Brown Citrus Snail, Essential Oil, Lamiaceae*

Associate editor: S. A. Hemmati (Ph.D.)

Citation: Izadi Kakhesh, H. & Mohadjerani, M. (2024). Investigating the characteristics of α -amylase and glucosidase enzymes in the digestive gland of brown citrus snail in the vicinity of essential oils of thyme, lavender and marjoram. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 47(3), 1-22. <https://doi.org/10.22055/ppr.2024.46951.1748>



بررسی ویژگی‌های آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و گلوکوزیداز غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات در مجاورت روغن اسانس آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش

حورا ایزدی کاهکش^۱ و مریم مهاجرانی^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲- * نویسنده مسوول: دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
(m.mohajerani@umz.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۶/۰۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۳۱

چکیده

یکی از آفات مهم باغ‌های مرکبات شمال ایران حلزون قهوه‌ای می‌باشد. امروزه به دلیل پیدایش مقاومت آفت‌ها به سموم شیمیایی و اثرات زیان‌بار و مخرب آنها بر سلامت و محیط زیست بشر، یکی از راه‌های کنترل آنها ارزیابی میزان اثر بازدارنده‌ها بر آنزیم‌های گوارشی، آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه، اندازه‌گیری اثر اسانس آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش از خانواده نعنائیان، برای مهار این دو آنزیم می‌باشد. ابتدا غده گوارشی حلزون قهوه‌ای در حالت گرسنگی جداسازی و از آن عصاره آنزیمی به روش‌های هموژنیزاسیون و سانتریفیوژ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تهیه شد. پارامترهای سینتیکی و فعالیت آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز در عصاره آنزیمی اندازه‌گیری شد. اسانس‌گیری از پودر خشک هر سه گیاه به روش کلونجر انجام شد. فعالیت آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز در مجاورت اسانس هر یک از گیاهان در غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین موجود در عصاره آنزیمی استخراج شده ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. مقادیر V_{max} و K_m برای آلفا-آمیلاز به ترتیب ۰/۱۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۰/۰۶۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر دقیقه اندازه‌گیری شد. مقادیر IC_{50} برای آلفا-آمیلاز در مجاورت اسانس‌های آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش به ترتیب ۲/۴۶۲، ۰/۲۸۱۶ و ۰/۱۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز IC_{50} به ترتیب ۰/۷۴۱، ۲/۰۳۶ و ۱/۶۶۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که اسانس روغنی آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش می‌توانند آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز جداسازی شده از حلزون را مهار نموده و به عنوان منابع طبیعی، کم‌هزینه و قابل دسترس برای کاهش خسارت به مرکبات مورد توجه قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: اسانس روغنی، آلفا-آمیلاز، آلفا-گلوکوزیداز، حلزون قهوه‌ای مرکبات، نعنائیان

مقدمه

حلزون مرکبات^۱ یکی از مهمترین آفات محصولات کشاورزی و باغ‌های مرکبات بوده که با تغذیه از برگ، ساقه، میوه و پوست درختان به انواع ارقام مرکبات در باغ‌ها و نهالستان‌ها خسارت وارد می‌کند (Ahmadi & Halaji Sani, 2007). مطالعه آنزیم‌های گوارشی (پروتینازها، تریپسین، کیموتریپسین، آلفا-آمیلاز و لیپاز) برای درک مکانیسم هضم و چگونگی سازگار شدن موجودات با محیط زیست خود، ارزیابی توانایی موجودات برای هیدرولیز و جذب مواد مغذی اصلی رژیم غذایی، مورد علاقه بسیاری از محققین می‌باشد. از آنجا که آفت‌کش‌های شیمیایی می‌توانند هوا و آب را آلوده کنند یا مستقیماً روی محصولات کشاورزی قرار گیرند، استفاده از ترکیبات طبیعی برای کنترل آفات پیشنهاد می‌شود. آنزیم آلفا-آمیلاز و گلوکوزیداز به‌طور عمومی به عنوان محور اصلی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها اهمیت زیادی دارند. این آنزیم‌ها در میان شاخه‌های جانوری، گیاهی و میکروبی مورد توجه بوده و از منابع قارچی، مخمرها و باکتری‌ها قابل استخراج هستند (Gupta et al., 2003). از آنجا که حلزون جهت تغذیه از منابع غذایی خود به آنزیم آلفا-آمیلاز نیاز دارد تا از متابولیسم کربوهیدرات‌ها حداکثر بهره را به‌دست آورد، آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز از آنزیم‌های حیاتی برای حلزون محسوب می‌شوند. اکثر آنزیم‌هایی که نشاسته را تجزیه می‌کنند براساس توالی اسید آمینه‌ای به خانواده آلفا-آمیلاز تعلق دارند. اعضای خانواده آلفا-آمیلاز سرعت هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی را به قدری افزایش داده‌اند که می‌توان آنها را کارآمدترین آنزیم‌های شناخته شده دانست. مکانیسم کاتالیزگری در خانواده آلفا-آمیلاز یک مکانیسم جایگزینی دو گانه می‌باشد. که دو باقیمانده کاتالیزوری در جایگاه فعال، گلوتامیک اسید به عنوان کاتالیزور اسید/ باز و آسپاراتات به عنوان نوکلئوفیل حضور دارند (Ben et al., 2019).

آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیدازها می‌توانند تجزیه دنباله‌های آلفا-گلوکوزیل را از انتهای غیراحیاکننده‌ی سوبسترا کاتالیز کنند و باعث آزادسازی آلفا-گلوکز شوند (Withers & Aebersold, 1995). با توجه به عملکرد اختصاصی، گلوکوزیدازها سوبستراهایی مانند ساکارز، مالتوالیگوساکارید و پارانیتروفیل آلفا-دی-گلوکوپیرانوزید را ترجیح می‌دهند (Shen et al., 2015). در حال حاضر مهارکننده‌های پر مصرف برای آلفا-گلوکوزیداز شامل آکاربوز، میگلیتول و گلیبوز می‌باشند که از بین این مهارکننده‌ها آکاربوز بیشترین تاثیر را دارد (Van de Laar et al., 2005; Kalra, 2014). بسیاری از گیاهان به علت داشتن روغن فرار (اسانس‌ها) نقش بزرگی در کشاورزی و کنترل آفت‌ها ایفا می‌کنند (Rasouli et al., 2003). بسیاری از متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان از جمله اسانس‌ها در دفاع در برابر گیاهخواران، آفات و عوامل بیماری‌زا نقش دارند (Bennet & Wallsgrave, 1994; Mohadjerani & Tavakoli, 2015). از مهمترین تیره‌های دارای اسانس می‌توان به نعنائیان^۲، چتریان، کاج، برگ بو و بعضی از گیاهان خانواده روزاسه، کاسنی و غیره اشاره کرد. مهمترین اجزای فعال اسانس‌های گیاهی شامل ترپنوئیدها (مونوترپنوئیدها و سزکویی‌ترپنوئیدها)، فنیل‌پروپانوئیدها و ترکیبات متفرقه از نیتروژن، سولفید و سیانیدها هستند که در موارد زیادی در پزشکی کاربرد دارند (Mirkazemi et al., 2010; Machado et al., 2011). اسانس‌های روغنی گیاهان به‌طور کلی از افزودنی‌های خوراکی ایمن شناخته می‌شوند و به عنوان جایگزینی بی‌خطر برای داروها و ترکیبات شیمیایی با خواص ضد باکتری، ضد کرم و ضد میکروب، کاربردهای زیادی یافته‌اند (Zarezadeh et al., 2014).

آویشن^۳ روی برخی از آفات مهم محصولات کشاورزی سمیت قابل توجهی داشته است. برای مثال سمیت اسانس آویشن باغی روی شپشه ذرت، سوسک لوبیا، سوسک

3 *Thymus vulgaris* L.

1 *Caucasotachea lencoranea*

2 *Lamiacea*

آمیلاز و گلوکوزیداز استخراج شده از غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات شده است. مرور مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که اولین استراتژی در طراحی مهارکننده‌های آفت‌ها در کشاورزی، شناسایی هرچه بیشتر خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم‌های گوارشی آفات هدف می‌باشد. با وجود کارهای زیادی که در زمینه بررسی آنزیم‌های گوارشی در آفات و حشرات انجام شده است تاکنون پژوهشی در رابطه با اثر مخرب اسانس گیاهان شناخته شده‌ای نظیر آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش روی حلزون مرکبات، *Caucasotachea lencoranea* Mousson (Stylommatophora: Helicidae) در ایران و جهان انجام نشده است. لذا پژوهش حاضر با هدف معرفی اسانس این گیاهان به عنوان منبع ترکیبات ایمن و سازگار با محیط زیست برای کنترل آفت حلزون انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

اندام‌های هوایی از گیاهان مرزنگوش، آویشن و اسطوخدوس در منطقه شمال کشور از استان مازندران (روستاهای اطراف شهرستان بابلسر) در فصل بهار جمع‌آوری شدند. سپس در دمای اتاق و دور از نور خورشید، به منظور حفظ ترکیبات اسانسی گیاهان، خشک و توسط دستگاه آسیاب خانگی پودر شدند. پودر به‌دست آمده از هر گیاه قبل از استفاده به منظور ماندگاری بیشتر، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه اسانس روغنی از روش تقطیر با بخار آب (کلونجر) استفاده شد. مقدار ۶۰ گرم از پودر گیاه مورد مطالعه در بالن شیشه‌ای ریخته شد و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. پس از افزودن آب مقطر به مدت حدود ۳ ساعت حرارت داده شد. آب و اسانس روغنی در قسمت سردکننده، سرد شده و در لوله انتهایی جمع‌آوری شد. در پایان این مدت، برای جداسازی و استخراج اسانس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر حلال هگزان اضافه شد.

گرده‌خوار کلزا و شته سیب ثبت شده است (Ebadollahi et al., 2018). این گونه‌های گیاهی به دلیل خواص دارویی و بیولوژیکی، اهمیت دارویی دارند (Dauqan & Abdullah, 2017). اسانس آویشن به طور عمده از انواع ترپن‌ها ساخته شده است. فراوان ترین آن‌ها مخلوطی از فنول‌های تیمول و کارواکرول، و الکل‌های لینالول، ژرانیول و آلفا-ترپینئول می‌باشند. تیمول به عنوان ترکیب اصلی اسانس آویشن دارای خواص ضد کرم، ضد میکروب و ضد قارچ به ویژه بر روی قارچ آکتینومیکوز می‌باشد (Mohadjerani & Tavakoli, 2015). اسطوخدوس^۱ از خانواده نعنائیان می‌باشد و ترکیبات اصلی موجود در اسانس آن که به روش صنعتی معمولی استخراج شده عبارتند از: ژرانیول، آلفا-پینن، کامفور، لینالیل استات، اسید اورسالیکیک، بورنتول، فلاونوئیدهای لوتولین، اسید بوتریک، اسید والرانیکیک و لینالول (Shahbazy, 2012). اسطوخدوس در ریشه لاتین به معنای تمیزکننده و شوینده ذکر شده است. امروزه خاصیت ضد عفونی‌کنندگی، ضد نفخ و آرام‌بخشی ترکیبات این گیاه دارویی شناخته شده است (Tavakoli et al., 2021). مرزنگوش^۲ از خانواده نعنائیان گیاهی علفی و چند ساله و خودرو در ایران است. این گیاه شامل مولکول‌هایی است که فعالیت زیستی بر روی فیزیولوژی حیوان و متابولیسم آن دارد (Hajipour et al., 2016). مطالعات متعددی توصیف کرده‌اند که اسانس روغنی به‌دست آمده از این گیاه فعالیت‌های بیولوژیکی گسترده‌ای از قبیل ضد قارچ، ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد دیابتی، حشره کش و سمیت سلولی را نشان می‌دهد (Ibáñez & Blázquez, 2017).

در این پژوهش با توجه به اهمیت مدیریت حلزون قهوه‌ای مرکبات در استان‌های شمالی کشور ایران که یکی از اصلی‌ترین کانون‌های کشت مرکبات در کشور محسوب می‌گردد، سعی در بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی آلفا-

2 *Origanum vulgare* L.

1 *Lavandula angustifolia* Mill.

صدف به وسیله یک قیچی تیز، غده گوارشی که در انتهای قسمت مارپیچ بدن قرار گرفته‌است با چند شیار عمودی جدا گردید. غدد گوارشی با استفاده از دستگاه هموژنایزر و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد همراه با آب مقطر سرد هموژن گردید. سپس محلول هموژن شده با سرعت ۱۶۰۰۰g و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از این مرحله محلول رویی به عنوان منبع آنزیمی در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Bigham et al., 2011). مقدار پروتئین عصاره آنزیمی از روش برادفورد اندازه‌گیری شد و از پروتئین استاندارد BSA استفاده شد. مقدار پروتئین موجود در ۲۰ گرم غده گوارشی حلزون با استفاده از داده‌های حاصل از نمودار استاندارد آلبومین سرم گاو ($y = 61.257x + 0.3661$; $R^2 = 0.9921$)، ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

تهیه نمودار استاندارد مالتوز

در لوله‌های آزمایش به مقدار ۱۰ تا ۴۰ میکرولیتر از محلول استاندارد مالتوز (۱/۸ گرم مالتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) تا حجم ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر معرف DNSA اضافه و به مدت پنج دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به تمام نمونه‌ها در ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید و سپس جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (Pirian et al., 2018). برای شاهد از ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. نمودار استاندارد مالتوز از رسم تغییرات جذب در برابر غلظت مالتوز به‌دست آورده شد. از معادله به‌دست آمده ($y = 0.9015 X - 0.0335$; $R^2 = 0.994$) برای تعیین مقدار مالتوز در آزمایش‌ها استفاده شد. آزمایش برای هر غلظت سه بار تکرار شد.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز با اندکی تغییر به روش برنفلد انجام شد (Bernfeld, 1955). اندازه‌گیری در حجم نهایی ۲/۵ میلی‌لیتر شامل ۲۵۰ میکرولیتر نمونه آنزیمی، ۵۰۰ میکرولیتر

فاز غیرقطبی شامل اسانس با سرریز کردن از بخش قطبی که آب می‌باشد، جدا شد. برای آبیگری از سولفات سدیم استفاده شد. سپس اسانس به‌دست آمده در بطری‌های کوچک تیره داخل یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جهت آزمایش‌های بعدی نگهداری شد (Miyazawa et al., 1998). راندمان عمل استخراج اسانس با توزین اسانس به‌دست آمده و تقسیم عدد آن بر وزن گیاه پودر شده به صورت درصد محاسبه شد.

تعیین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها با دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی

جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس‌های به‌دست آمده با استفاده از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی انجام شد. هر یک از اسانس‌های استخراج شده از گیاهان در کم‌ترین مقدار ممکن از حلال متانول حل شده و برای تعیین ترکیبات تشکیل دهنده به ستون دستگاه GC-Mass تزریق شد. مشخصات دستگاه: Agilent 5975C MSD coupled to an Agilent 7890A و ستون: DB5(60m x 0.25mm I.d., film thickness 0.35µm) و گاز حامل: هلیوم (با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه) می‌باشد. برنامه‌ریزی حرارتی ستون بدین صورت انجام گرفت که در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای چهار دقیقه ثابت باشد و سپس با سرعت هفت درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد برسد و دوباره با سرعت پنج درجه سانتی‌گراد بر دقیقه به دمای ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد برسد و در این دما نیز به مدت ۱۰ دقیقه ثابت بماند. برای شناسایی ترکیبات، از مقایسه طیف جرمی آنها با طیف‌های موجود در داده‌های کتابخانه‌ای NIST, Wiley استفاده شد و از نظر نوع و مقدار آنها در اسانس‌ها مورد مقایسه قرار گرفت (Miyazawa et al., 1998).

استخراج عصاره آنزیمی

برای تهیه عصاره آنزیمی، حلزون‌ها از باغات مرکبات استان مازندران در شهرستان بابلرس جمع‌آوری شد و به مدت سه روز تحت شرایط گرسنگی قرار گرفتند تا هضم خود را کامل کنند و از پوسته‌هایشان آزاد شوند. پس از جدا کردن

اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی آلفا-آمیلاز

برای تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم ابتدا سوبسترای نشاسته (۱ درصد) (۱۰۰-۵۰۰ میکرولیتر) در لوله‌های آزمایش با مقدار لازم از بافر یونیورسال (pH=۴) به ۲۵۰ میکرولیتر نمونه‌ی آنزیمی اضافه گردید تا حجم نهایی به ۲/۵ میلی‌لیتر برسد و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در بازه‌های زمانی ۳ تا ۱۵ دقیقه با ۱ میلی‌لیتر DNSA واکنش متوقف شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. سپس تغییرات سرعت واکنش نسبت به غلظت سوبسترا رسم و مقدار پارامترهای سینتیکی از نمودار لاینیور-برک^۱ بدست آورده شد (Mohadjerani & Sanaei, 2022).

اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی آلفا-گلوکوزیداز

برای تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم، ابتدا غلظت‌های (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱) میلی‌مولار از سوبسترا (pNαG) در لوله‌های نمونه ریخته و به آنها ۱۵ میکرولیتر نمونه‌ی آنزیمی افزوده و مقداری از بافر با اسیدیتیه برابر ۲ اضافه شد تا به حجم ۱۰۰ میکرولیتر برسند. لوله‌های مخلوط واکنش در هر یک از غلظت‌های ذکر شده‌ی سوبسترا در بازه‌های زمانی ۳ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید یک نرمال برای توقف واکنش به لوله‌ها اضافه شد و تغییرات مقدار جذب در هر غلظت در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bisswanger, 2017).

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در مجاورت اسانس

آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش

ابتدا غلظت‌های مختلف اسانس روغنی با نسبت ۱ به ۵۰ در اتانول (۱۰٪) رقیق شدند و در حجم‌های ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکرولیتر برای گیاه آویشن و حجم‌های ۱۰ تا ۵۰ میکرولیتر برای اسطوخدوس و مرزنگوش، با ۲۵۰ میکرولیتر نمونه‌ی آنزیمی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس بافر یونیورسال و ۵۰۰ میکرولیتر نشاسته ۱٪ به

سوبسترا (نشاسته ۱٪) و ۷۵۰ میکرولیتر بافر یونیورسال با pH=۴ انجام شد (Britton & Robinson, 1931). مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. بعد از مدت زمان انکوباسیون یک میلی‌لیتر معرف رنگی DNSA به منظور متوقف کردن واکنش به هر نمونه اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه همه نمونه‌ها در حمام آب جوش قرار داده شدند. سپس از هر نمونه به اندازه ۳۰۰ میکرولیتر برداشته و در پلیت ریخته و جذب آن‌ها با دستگاه میکروپلیت ریدر در ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. فعالیت آلفا-آمیلاز از معادله ۱ محاسبه شد. مخلوط شاهد برای تصحیح جذب نمونه مورد استفاده قرار گرفت که در آن از بافر به جای آنزیم استفاده شد.

$$\text{معادله ۱} = \frac{\text{حجم کل} \times \text{غلظت مالتوز}}{\text{حجم آنزیم} \times \text{زمان انکوباسیون}} = \text{فعالیت آنزیم}$$

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

تعیین فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز بر اساس روش مرسوم (Siegentaler, 1977; Low et al., 1986) با اندکی تغییرات انجام شد. ابتدا ۱۵ میکرولیتر نمونه‌ی آنزیمی با ۶۵ میکرولیتر بافر یونیورسال (pH=۶) مخلوط و ۲۰ میکرولیتر سوبسترا (pNαG) با غلظت ۱۰ میلی‌مولار به آن اضافه گردید و ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. واکنش در نمونه‌ها پس از هر ۳ دقیقه با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید ۱ نرمال متوقف گردید و جذب نمونه‌ها در دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شد. در این آزمایش برای شاهد از همه‌ی ترکیبات و بدون آنزیم استفاده شد. فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز از معادله ۲ محاسبه شد (ضریب خاموشی: $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1} \times 18/5$ ضریب رقت: ۱، حجم کل: ۰/۲ میلی‌لیتر، طول عبور نور: ۰/۵ سانتی‌متر، حجم آنزیم برابر ۱۵ میکرولیتر).

$$\text{معادله ۲} = \frac{\text{ضریب رقت} \times \text{حجم کل} \times \text{تغییرات جذب}}{\text{طول عبور نور} \times \text{حجم آنزیم} \times \text{ضریب خاموشی}} = \text{فعالیت آنزیم}$$

اولتراسونیک برای انحلال کامل قرار داده شد. جهت بررسی اثر آکاربوز از پنج حجم ۲۵ تا ۴۰۰ میکرولیتر استفاده شد. پس از افزودن ۲۵۰ میکرولیتر نمونه‌ی آنزیمی و ۵۰۰ میکرولیتر نشاسته ۱٪ تمامی نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از انکوباسیون به تمامی لوله‌ها یک میلی‌لیتر DNSA افزوده شد و به مدت پنج دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. مقدار جذب نمونه‌ها پس از سرد شدن در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از معادله خط استاندارد مالتوز درصد مهار در مورد آکاربوز محاسبه شد (Mohadjerani & Sanaei, 2022).

اثر آکاربوز بر آلفا-گلوکوزیداز

جهت بررسی اثر آکاربوز پنج حجم ۲/۵ تا ۴۰ میکرولیتر با سه تکرار انجام شد. پس از افزودن ۱۵ میکرولیتر نمونه‌ی آنزیمی، بافر به مقدار لازم و ۲۰ میکرولیتر سوبسترا (pNαG) تمامی نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از انکوباسیون ۱۰۰ میکرولیتر محلول سدیم هیدروکسید ۱ نرمال به هر نمونه اضافه شد تا واکنش متوقف شود. سپس مقدار جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد (Yilmazer-Musa et al., 2012).

اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی آلفا-آمیلاز در مجاورت اسانس آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش

مقدار ۲۵۲ میکرولیتر از استوک اسانس روغنی گیاه آویشن برداشته و با ۲۵۰ میکرولیتر نمونه‌ی آنزیمی آلفا-آمیلاز به مدت پنج دقیقه انکوبه و حجم‌های مختلف از محلول نشاسته به آن‌ها اضافه و با بافر به حجم ۱/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط واکنش برای هر غلظت نشاسته در پنج زمان مختلف انکوبه گردید و یک میلی‌لیتر DNSA به آن اضافه شد و سپس به مدت پنج دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. تغییرات جذب در هر غلظت در بازه‌های زمانی ۳ تا ۱۵ دقیقه در طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. سپس تغییرات سرعت واکنش نسبت به غلظت سوبسترا رسم

لوله‌های آزمایش اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه انکوباسیون صورت گرفت. سپس ۱ میلی‌لیتر محلول DNSA به هر لوله اضافه شد و در حمام آب جوش قرار گرفتند تا واکنش متوقف شود. پس از افزودن ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به هر لوله (حجم کل ۲/۵ میلی‌لیتر) و سرد شدن نمونه‌ها، مقدار جذب آنها در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Pirian et al., 2018). هر تست سه بار تکرار شد. عدد جذب بلانک از جذب نمونه‌ها کسر شد و با استفاده از معادله استاندارد مالتوز عدد میانگین مالتوز در نمونه و کنترل تعیین و مقدار درصد مهار برای هر اسانس (معادله ۳) محاسبه شد.

$$\text{معادله ۳} \quad 100 \times \frac{\text{میانگین مالتوز در نمونه}}{\text{میانگین مالتوز در کنترل}} = \text{درصد واکنش}$$

$$\text{درصد واکنش} = 100 - \text{درصد مهار}$$

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در مجاورت اسانس آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش

غلظت‌های مختلف اسانس روغنی با نسبت ۱ به ۵۰ در اتانول (۱۰٪) و بافر فسفات رقیق شدند و در حجم‌های ۲ تا ۱۴ میکرولیتر از اسانس آویشن و حجم‌های ۵ تا ۳۰ میکرولیتر از اسانس اسطوخدوس و مرزنگوش، با ۱۵ میکرولیتر نمونه‌ی آنزیمی به مدت ۱۰ تا ۱۲ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر سوبسترا (pNαG) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه دوباره نمونه‌ها انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول سدیم هیدروکسید یک نرمال به هر لوله اضافه شد و مقدار جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bigham et al., 2011). هر تست با سه تکرار انجام شد و جذب بلانک از جذب نمونه‌ها کم شد. حجم نهایی در این تست ۲۰۰ میکرولیتر می‌باشد. درصد مهار آنزیم از طریق معادله ۴ در هر مرحله بدست آورده شد.

$$\text{معادله ۴} \quad 100 \times \frac{\text{جذب نمونه - جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} = \text{درصد مهار}$$

اثر آکاربوز بر آلفا-آمیلاز

محلول ۱/۵ میلی‌مولار آکاربوز در دو میلی‌لیتر حلال DMF حل و سه میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و در حمام

از گیاهان آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش در جدول ۱ آورده شده‌اند. در این جدول، ۱۸ ترکیب شیمیایی شناسایی شده در اسانس گیاه آویشن نشان داده شده‌اند که از فراوان‌ترین آنها می‌توان به کارواکرون، لینالول و تیمول اشاره کرد که هر کدام از این ترکیبات به ترتیب ۴۲/۹۹، ۲۱/۸۵ و ۱۸/۱۲ درصد از اسانس استخراج شده را تشکیل می‌دهند. در اسانس گیاه اسطوخدوس ۱۱ ترکیب شناسایی شده که فراوان‌ترین آنها D-کامفور به میزان ۶۹/۸۵٪ نتیجه‌گیری شد. در گیاه مرزنگوش نیز ۲۰ ترکیب شیمیایی شناسایی شد که از فراوان‌ترین آن‌ها می‌توان از ترکیب‌های ۴-تریپنول، گاما-تریپنن و آلفا-تریپنن نام برد که به ترتیب ۳۲/۹۷، ۱۸/۹۳ و ۱۴/۶۹ درصد از اسانس استخراج شده را تشکیل می‌دهند.

نتیجه سنجش فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز

پس از ثبت تغییرات جذب نمونه‌های آماده شده به روش برنفلد فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در غلظت ثابت از نشاسته و با استفاده از رسم نمودار استاندارد مالتوز اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم ۰/۲۷۸ U/ml و مقدار فعالیت ویژه آنزیم U/mg ۱/۳۹ به‌دست آورده شد.

اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی آنزیم آلفا-آمیلاز

نمودار ۱ رفتار سینتیکی آنزیم آلفا-آمیلاز در حلزون قهوه‌ای را نشان می‌دهد. نمودار معکوس دوگانه (لاینیور-برک) بر اساس سرعت واکنش نسبت به تغییرات غلظت سوبسترا رسم گردید. مقدار V_{max} برای آنزیم آلفا-آمیلاز برابر با ۰/۰۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دقیقه و مقدار K_m برای آن ۰/۱۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

سنجش فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز

تعیین فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز بر اساس روش سیگنر و لوو با اندکی تغییر در آن روش‌ها انجام شد. فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در غلظت ثابت از سوبسترا (pNaG) اندازه‌گیری و مقدار فعالیت آنزیم U/ml ۰/۴ و فعالیت ویژه آن U/mg ۲ به‌دست آورده شد.

و مقدار پارامترهای سینتیکی در مقادیر مختلف هر یک از اسانس‌ها از نمودار لاینیور-برک به‌دست آورده شد. حجم نهایی در این تست ۲/۵ میلی‌لیتر می‌باشد. این روش برای هر سه اسانس روغنی یکسان می‌باشد با این تفاوت که حجم مصرفی برای اسانس گیاه اسطوخدوس ۲۷/۶ میکرولیتر و برای اسانس گیاه مرزنگوش ۱۱/۱ میکرولیتر برداشته شد (Mohadjerani & Sanaei, 2022).

اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی آلفا-گلوکوزیداز در مجاورت اسانس آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش

مقدار شش میکرولیتر از استوک اسانس روغنی گیاه آویشن با ۱۵ میکرولیتر نمونه‌ی آنزیمی آلفا-گلوکوزیداز به مدت پنج دقیقه انکوبه و غلظت‌های مختلف سوبسترا (pNaG) به آن‌ها اضافه و با بافر به حجم ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد، در هر کدام از غلظت‌های سوبسترا در بازه‌های زمانی ۳ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکسید افزوده و واکنش متوقف شد (حجم نهایی در این تست ۲۰۰ میکرولیتر می‌باشد). تغییرات جذب در هر غلظت در بازه‌های زمانی ۳ تا ۱۵ دقیقه در طول موج ۴۰۵ نانومتر ثبت شد. سپس تغییرات سرعت واکنش نسبت به غلظت سوبسترا رسم و مقدار پارامترهای سینتیکی در مجاورت هر یک از اسانس‌ها از نمودار لاینیور-برک به‌دست آورده شد (Kazzazi et al., 2014).

نتایج

بازده عمل استخراج اسانس‌ها

بازده اسانس روغنی استخراج شده از هر گیاه نسبت به ۱۰۰ گرم پودر خشک گیاه محاسبه و برای آویشن ۱/۹۳، اسطوخدوس ۰/۱۱۱ و مرزنگوش برابر ۰/۳۶۶ گرم به‌دست آورده شد.

تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی GC-Mass

طبق نتایج به‌دست آمده از این تجزیه و تحلیل ترکیبات موجود در هر یک از اسانس‌های استخراج شده

اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز
 شکل ۲ رفتار سینتیکی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز حلزون
 قهوه‌ای را نشان می‌دهد. بعد از رسم نمودار لاینویور-
 برک مقدار V_{max} برای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز برابر با
 ۰/۰۲۸ میلی‌مولار بر دقیقه و مقدار K_m ۱/۵ میلی‌مولار
 محاسبه شد.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس استخراج شده از آویشن، اسطوخودوس و مرزنگوش به‌وسیله کروماتوگرافی گازی-طیف
 سنجی جرمی

Table 1. Identified compounds in essential oils of *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia* and *Origanum vulgare* by GC/Mass

Compound	Value (%)		
	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Origanum vulgare</i>
Carvacrol	42.99	2.41	2.16
Linalool	21.85	2.75	
Thymol	18.12		2.12
Para-cymene	3.93		
D-camphor	2.86	69.85	
Caryophyllene	1.78		1.73
Thymyl methyl ether	1.75		
Gamma-terpinene	1.61		18.93
Caryophyllene oxide	0.70		
Linalool oxide	0.61		
Alpha-pinene	0.56		
Sepathulenol	0.50		0.57
Cis-linaloloxide	0.49		
1,8-cineole	0.48		
Terpinene-4-ol	0.42		32.97
Beta-myrcene	0.38		0.59
Alpha-terpinene	0.38		14.69
Aromadendrene	0.35		
Beta-eudesmol		4.96	
Ortho-acetyl-para-cresol		2.52	
Borneol		2.27	
Beta-ocimene		2.22	
Alloaromadendrene		1.69	
Cuminaldehyde		1.54	
Camphene		1.01	
1R-alpha-pinene		0.78	
(+)-4-carene			5.94
Alpha-terpineol			4.82
Cis-beta-terpineol			4.13
Beta-phellandrene			2.75
Beta-thujene			2.29
1R-alpha-pinene			2.06
Trans-para-2-menthen			1.60
Dihydrocarveol			1.25
Linalyl anthranilate			0.80
Bicyclogermacrene			0.69
Alpha-phellandrene			0.62
(z)-piperitol			0.53

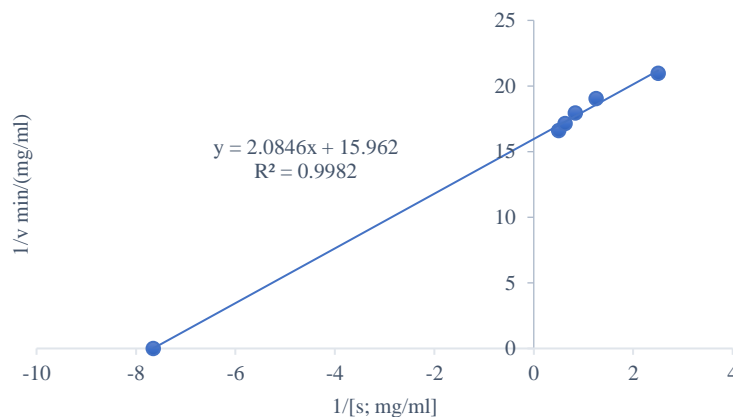
میلی گرم بر میلی لیتر نتیجه گیری شد. بنابراین اسانس مرزنگوش تاثیر بیشتری بر آنزیم نشان داده است.

بررسی اثر اسانس روغنی گیاهان آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش بر آلفا-گلوکوزیداز

فعالیت آنزیم در مجاورت اسانس روغنی هر یک از گیاهان در دامنه‌ای از غلظت بررسی شد و مهار آنزیم که با کاهش مقدار جذب همراه بود مورد سنجش قرار گرفت و نتایج به صورت درصد مهار محاسبه و با رسم نمودار گزارش شد (شکل ۳). با توجه به معادله خطها در نمودارهای شکل ۳ مقادیر IC_{50} برای آنزیم آلفا-آمیلاز در مجاورت اسانس آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش به ترتیب ۲/۴۶۲، ۰/۲۸۱۶ و ۰/۱۱۴

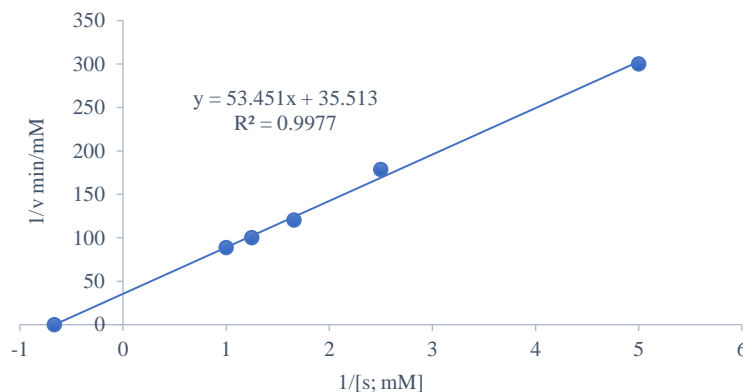
بررسی اثر اسانس روغنی گیاهان آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش بر آلفا-آمیلاز

فعالیت آنزیم پس از انکوبه شدن با اسانس روغنی هر یک از گیاهان اندازه گیری شد و مهار آنزیم که با کاهش مقدار جذب همراه بود مورد سنجش قرار گرفت و نتایج به صورت درصد مهار محاسبه و با رسم نمودار گزارش شد (شکل ۳). با توجه به معادله خطها در نمودارهای شکل ۳ مقادیر IC_{50} برای آنزیم آلفا-آمیلاز در مجاورت اسانس آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش به ترتیب ۲/۴۶۲، ۰/۲۸۱۶ و ۰/۱۱۴



شکل ۱- نمودار لاینویور-برک، نشان دهنده رفتار سینتیکی آلفا-آمیلاز. (S؛ نشاسته)

Figure 1. The Lineweaver-Burk plot for the kinetic behavior of alpha-amylase. (S; starch)



شکل ۲- نمودار لاینویور-برک برای رفتار سینتیکی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز. (S؛ پارانیتروفنیل آلفا-دی-گلوکوپیرانوزید)

Figure 2. The Lineweaver-Burk plot for the kinetic behavior of alpha-glucosidase enzyme, (S; 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside)

بررسی رفتار سینتیکی آنزیم آلفا-آمیلاز در مجاورت

اسانس روغنی آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش

به منظور به دست آوردن پارامترهای سینتیکی آنزیم در زمان‌های مختلف انکوباسیون و در غلظت‌های مختلف سوبسترا بر اساس اندازه‌گیری‌های انجام‌شده نمودار لاینیور-برک برای هر گیاه رسم و در شکل ۶ نشان داده شده است.

به کمک معادله خط‌های به دست آمده مقادیر V_{max} و K_m برای آنزیم بدون اسانس، آنزیم در مجاورت اسانس روغنی آویشن؛ آنزیم در مجاورت اسانس روغنی اسطوخدوس؛ آنزیم در مجاورت اسانس روغنی مرزنگوش محاسبه گردید. با توجه به این که هم شیب و هم عرض از مبدا و هم طول از مبدا در مجاورت گیاهان آویشن و مرزنگوش نسبت به آنزیم تنها تغییر کرده است، نتایج در جدول ۲ نشان می‌دهد که این گیاهان با آنزیم آلفا-آمیلاز از طریق مکانیسم مهار مختلط و غیر رقابتی میان‌کنش می‌دهند. در مورد اسانس اسطوخدوس افزایش K_m و عدم تغییر در V_{max} ($P > 0.05$) مکانیسم مهار در مورد این گیاه از نوع رقابتی نتیجه‌گیری شد.

با بررسی معادله خط در نمودارهای شکل ۴ مقادیر IC_{50}

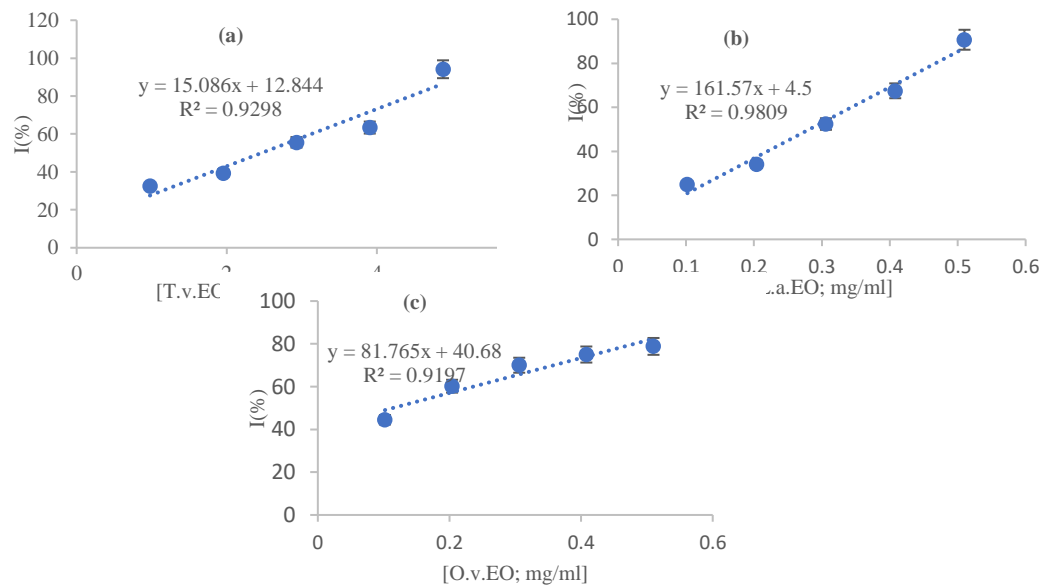
برای اسانس آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش به ترتیب 0.0741 ، 0.036 و 0.668 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد که با توجه به این مقادیر به دست آمده اسانس آویشن اثر بیشتری برای مهار آنزیم آلفا-گلوکوزیداز نشان داده است.

بررسی اثر آکاربوز بر آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز

برای حل کردن آکاربوز از حلال DMF استفاده شد.

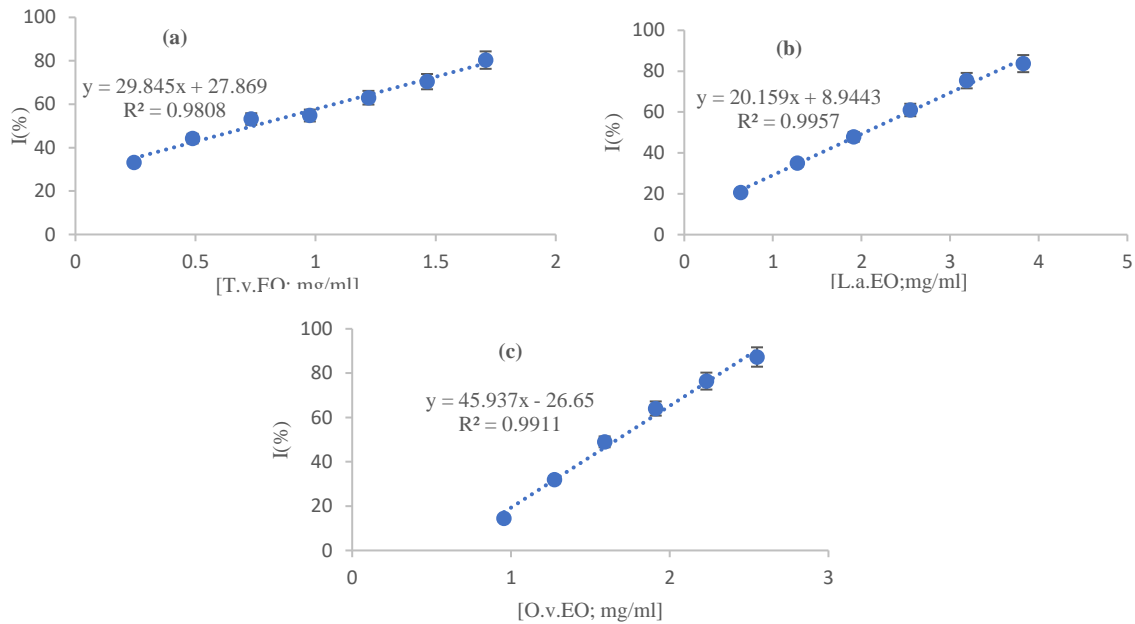
آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز با غلظت‌های مختلف آکاربوز انکوبه شدند و مهار آنزیم اندازه‌گیری و نتایج به صورت درصد مهار گزارش گردید (شکل ۵).

با توجه به معادله خط در نمودارهای شکل ۵ مقادیر IC_{50} آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز در مجاورت آکاربوز به ترتیب برابر با 0.0115 و 0.0084 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. با توجه به این مقادیر، تاثیر آکاربوز بر آنزیم آلفا گلوکوزیداز بیشتر از آلفا-آمیلاز بوده است. اما به هر حال همانطور که در سایر مطالعات هم گزارش شده است بر روی هر دو آنزیم اثر بازدارندگی دارد.



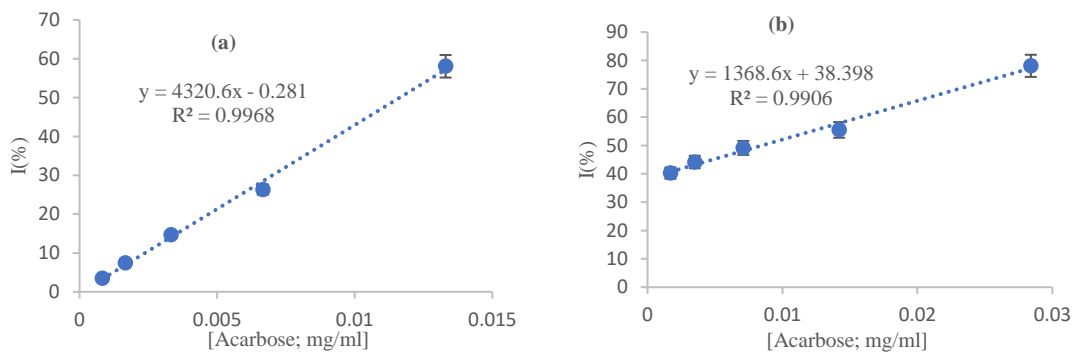
شکل ۳- اثر مهار آنزیم آلفا-آمیلاز به وسیله روغن اسانسی: آویشن (a)، اسطوخدوس (b) و مرزنگوش (c).

Figure 3. The inhibition effect on the alpha amylase by the essential oils of: (a) *Thymus.vulgaris* (T.vEO); (b) *Lavandula.angustifolia* (L.aEO); (c) *Origanum.vulgare* (O.vEO)



شکل ۴- اثر مهار آنزیم آلفا-آمیلاز به وسیله روغن اسانس: آویشن (a)، اسطوخدوس (b) و مرزنگوش (c).

Figure 4. The inhibition effect on the alpha glucosidase enzyme by the essential oils of: (a) *Thymus.vulgaris* (*T.vEO*); (b) *Lavandula.angustifolia* (*L.aEO*); (c) *Origanum.vulgare* (*O.vEO*)



شکل ۵- اثر مهارکنندگی آکاربوز بر آنزیم‌ها: (a) آنزیم آلفا-آمیلاز و (b) آنزیم آلفا-گلوکوزیداز.

Figure 5. The inhibitory effect of acarbose on the enzymes: (a) alpha-amylase; (b) alpha-glucosidase

به کمک معادله خط در نمودارهای شکل ۷ مقادیر K_m و V_{max} برای آنزیم بدون مهارکننده؛ آنزیم در مجاورت اسانس روغنی آویشن؛ آنزیم در مجاورت اسانس روغنی اسطوخدوس؛ آنزیم در مجاورت اسانس روغنی مرزنگوش محاسبه گردید. با توجه به این که در مجاورت اسانس گیاه اسطوخدوس کاهش در K_m و V_{max} مشاهده شد (جدول ۲) می‌توان نتیجه‌گیری کرد که

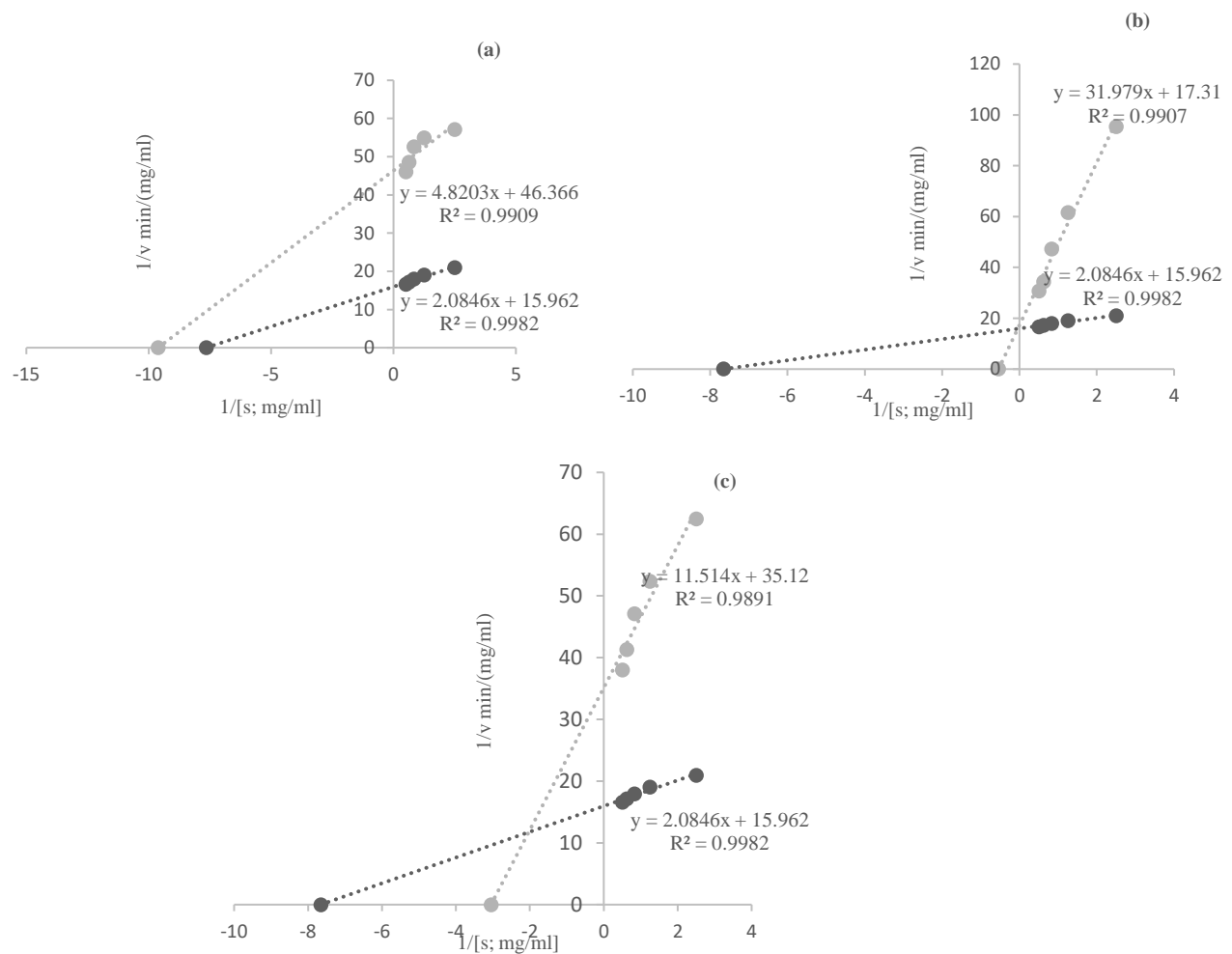
بررسی سینتیک آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در مجاورت اسانس روغنی آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش به منظور به دست آوردن نمودار لاینویور-برک در زمان‌های مختلف انکوباسیون و در غلظت‌های مختلف سویسترا اندازه‌گیری‌ها انجام و در شکل ۷ نشان داده شده‌اند.

و متابولیسم کربوهیدرات در حشره‌ها شناخته شده‌اند که می‌توانند نشاسته و گلیکوژن را هیدرولیز نمایند. طبق مطالعات انجام شده حلزون‌های راسته ستون‌چشم‌داران¹ دارای گستره‌ای از آنزیم‌های گوارشی مخصوصا کربوهیدرازها هستند. به طوری که بیش از ۲۰ نوع از ۳۰ نوع آنزیمی که در مجاری گوارشی خانواده حلزون قهوه‌ای (Stylommatophora: Helicidae) وجود دارند، جزء کربوهیدرازها می‌باشند (Barker, 2004).

این گیاه با آنزیم آلفا-گلوکوزیداز از طریق مکانیسم مهار نارقابتی میان‌کنش می‌دهد. در رابطه با گیاهان آویشن و مرزنگوش تغییر K_m و تغییر جزئی در V_{max} ($P > 0.05$) نشان داد که مکانیسم مهار در این دو گیاه از نوع رقابتی می‌باشد.

بحث

آلفا-آمیلاز و گلوکوزیداز به‌عنوان آنزیم‌های کلیدی در هضم

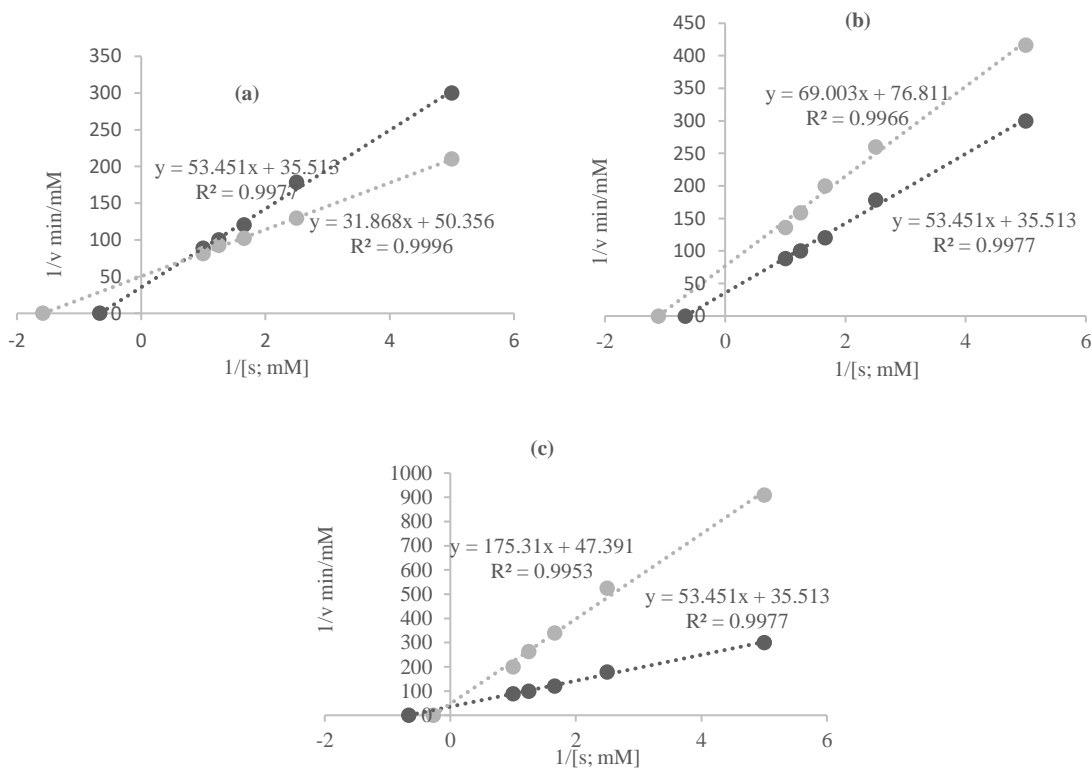


شکل ۶- نمودار لاینویور- برک برای رفتار سینتیکی آنزیم آلفا-آمیلاز در مجاورت اسانس آویشن (a)، اسطوخدوس (b) و مرزنگوش (c). (سیاه برای بدون اسانس و خاکستری اتکوبه شده با اسانس).

Figure 6. Lineweaver-Burk graph for the kinetic behavior of alpha-amylase enzyme in the vicinity of the essential oil of (a) *Thymus vulgaris*; (b) *Lavandula angustifolia*; (c) *Origanum vulgare* (Black: without EO and Gray: with EO).

میکائیلوس-منتن ($K_m=0/113$) از طریق رسم نمودار دوتایی معکوس لاینویور-برک برای آلفا-آمیلاز در مجاورت سوبسترای نشاسته اندازه گیری شد (Nagaraju & Abraham, 1995). در مطالعات قبلی، آنزیم آلفا-آمیلاز از دو گونه مگس و *Drosophila virilis* S. (Diptera: Drosophilidae) و *Drosophila repleta* W. استخراج شده و مقدار پارامترهای سینتیکی آنزیم، K_m و V_{max} به ترتیب در حدود ۰/۰۶ و ۱۴-۴۶ واحد آنزیم بر میلی گرم پروتئین گزارش شده است. به این ترتیب مقدار پارامترهای سینتیکی آنزیم برای گونه های مختلف این حشره متفاوت بدست آورده شد.

در این پژوهش آنزیم آلفا-آمیلاز و گلوکوزیداز از غده گوارشی حلزون قهوه ای مرکبات مورد مطالعه قرار گرفت. مقدار K_m و V_{max} برای آنزیم آلفا-آمیلاز به ترتیب ۰/۱۳ میلی گرم بر میلی لیتر و ۰/۰۶۲ میلی گرم بر میلی لیتر در دقیقه به دست آمد، همچنین مقدار فعالیت این آنزیم ۰/۲۷۸ واحد آنزیمی بر میلی لیتر و مقدار فعالیت ویژه ۱/۳۹ واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین گزارش شد. آنزیم گوارشی آلفا-آمیلاز در لارو کرم ابریشم هندی، *Antheraea mylitta*، به روش سولفات آمونیوم، رسوب گیری و سپس با ژل فیلتراسیون استخراج شد. مقدار ثابت



شکل ۷- نمودار لاینویور-برک برای رفتار سینتیکی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در مجاورت اسانس آویشن (a)، اسطوخودوس (b) و مرزنگوش (c). (سیاه برای بدون اسانس و خاکستری انکوبه شده با اسانس).

Figure 7. Lineweaver-Burke graph for the kinetic behavior of alpha-glucosidase enzyme in the vicinity of the essential oil of (a) *Thymus vulgaris*; (b) *Lavandula angustifolia*; (C) *Origanum vulgare* (Black: without EO and Gray: with EO).

مقدار K_m برای آلفا-گلوکوزیداز سن گندم *Eurygaster integriceps* P. (Hemiptera: Scutelleridae) برابر با ۱۱/۲۲ میلی‌مولار و مقدار V_{max} برابر با ۱/۸۴۴ میلی‌مولار بر دقیقه گزارش شده است که مقدار هر دو پارامتر بیشتر از مقادیری است که در پژوهش حاضر به دست آمد. اما از طرفی در مطالعه دیگری روی آفت حشره سبز پسته *Brachynema germarii* K. (Hemiptera: Pentatomidae) از خانواده سن‌های بدبو^۱ و متعلق به راسته نیم‌بالان^۲ مقادیر K_m و V_{max} برای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز به ترتیب برابر با ۲/۰۷۵ میلی‌مولار و ۰/۰۳۶۱ میلی‌مولار بر دقیقه گزارش شده که به مقادیر به دست آمده ما نزدیک است (Kazzazi, 2007; Shirai et al., 2008).
 همینطور در شیره گوارشی حلزون *Limicolaria flammea* M. (Stylommatophora: Achatinidae) از خانواده Achatinidae متعلق به راسته ستون چشم‌داران مقدار K_m و V_{max} به ترتیب ۲/۱۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۵۱ میلی‌گرم بر دقیقه برای این آنزیم گزارش شده است (Justin et al., 2014).

از بررسی و مقایسه مقدار پارامترهای سینتیکی آمیلاز در گونه‌های مختلف مقادیر متفاوتی گزارش شده است. در آزمایش‌ها بسته به نوع سوبسترای بکار رفته نظیر نشاسته، گلیکوژن و یا آمیلوپکتین، نتایج اندازه‌گیری‌ها متفاوت بدست آمده است، به طوری که برای گونه‌های مختلف قابل پیش بینی نمی باشند (Prigent et al., 1998). برای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز هم با توجه به نوع سوبسترای بکار رفته در سنجش‌ها، مقدار K_m بسیار متنوع گزارش شده است. در مطالعه حاضر مقدار K_m و V_{max} برای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز به ترتیب ۱/۵ میلی‌مولار و ۰/۰۲۸ میلی‌مولار بر دقیقه و فعالیت آنزیم برای سوبسترایش (پارانیتروفنیل آلفا-دی-گلوکوپیرانوزید) ۰/۴ واحد آنزیمی در هر میلی‌لیتر و فعالیت ویژه آن ۲ واحد آنزیمی در هر میلی‌گرم عصاره آنزیمی محاسبه شد. اما در مطالعه دیگری برای این آنزیم پس از جداسازی عصاره آنزیمی از غده گوارشی حلزون قهوه‌ای با همان سوبسترا، مقدار K_m برابر ۹/۸۴ میلی‌مولار و V_{max} برابر ۰/۱۱ میلی‌مولار بر دقیقه گزارش شد (Bigham et al., 2011). در مطالعات گذشته

جدول ۲- مقایسه مقدار پارامترهای سینتیکی آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز به دست آورده شده در مجاورت اسانس‌های روغنی مورد مطالعه

Table 2. Comparison of kinetic parameters of the alpha-amylase and glucosidase enzymes in the presence of the essential oils

	K_m (mg/ml)	V_{max} ((mg/ml)/min)	Type of Inhibition
α -amylase			
- EO	0.13	0.062	
+TvEO	0.104	0.021	Noncompetitive & Mixed
+LaEO	1.848	0.057	Competitive
+OvEO	0.327	0.028	Noncompetitive & Mixed
α -glucosidase			
No EO	1.5	0.028	-
+TvEO	0.632	0.019	Competitive
+LaEO	0.898	0.013	Uncompetitive
+OvEO	3.7	0.021	Competitive

- EO: without essential oil; T.v: *Thymus vulgaris*; L.a: *Lavendula angustifolia*; O.v: *Origanum vulgare*.

غلظت ۲۵/۸۶ میکرولیتر بر لیتر توانست ۵۰ درصد جمعیت سوسک زیان آور غلات *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae) را از بین ببرد (Ebadollahi et al., 2018). در تحقیقاتی که بر روی اسانس گیاه اسطوخودوس انجام شد از هر ۱۰۰ گرم پودر گیاه حدود ۰/۴ میلی لیتر اسانس خالص به دست آمد که در آن جمعا ۱۸ ترکیب شناسایی گردید که ۸۰/۸ درصد از کل اسانس را تشکیل دادند و مهمترین ترکیبات به ترتیب عبارتند از: او۱-۸- سینتول به میزان ۲۹ درصد، کافور به میزان ۲۸/۱ درصد، ایزوبورنئول ۱۴/۵ درصد و کریپتون به میزان ۸/۴ درصد. کافور از مهمترین ترکیبات اسطوخودوس است که هم در اسانس کامل گیاه به میزان ۲۰ درصد، در اسانس ساقه ۴ درصد و در عرق کامل گیاه ۲۸ درصد وجود دارد (Shahbazy, 2012). در جدول ۱، ۱۱ ترکیب شناسایی شده در اسانس گیاه اسطوخودوس آورده شده‌اند که دی-کافور فراوانترین ترکیب با خواص ضد میکروبی و سمیت برای حشرات از جمله سوسک، پشه و مورچه قرمز می‌باشد (Fu et al., 2015). در سال ۲۰۱۷، تحقیقات انجام شده بر روی اسانس روغنی دو گیاه مرزنگوش و پونه کوهی نشان داد که ۷۷ ترکیب با استفاده از طیف سنجی جرمی-کروماتوگرافی گازی شناسایی شدند که به ترتیب ۹۷/۳٪ و ۹۹/۴٪ از کل اسانس‌ها را تشکیل می‌دهند. کارواکروول (۰/۰۷٪ ± ۶۰/۴۲)، p-سیمن (۰/۰۲٪ ± ۱۵/۵۲) و گاما-ترپنین (۰/۰۲ ± ۵/۱۹) ترکیبات اصلی در اسانس روغنی گیاه پونه کوهی بودند، در حالی که مقادیر زیادی او۱-۸-سینتول (۰/۸۵ ± ۵۹/۵۹)، لینالول (۰/۰۴ ± ۱۳/۰۵) و آلفا-ترپینول (۰/۱۰ ± ۳/۰۳۶) درصد در اسانس کل گیاه مرزنگوش یافت شد (Ibáñez & Blázquez, 2017). تیمول و لینالول دو ترکیب اصلی در اسانس روغنی گیاه مرزنگوش، علاوه بر خواص ضد میکروبی و ضد قارچی همچنین مهارکننده‌ای قوی برای آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز، استیل کولین استراز و تیروزیناز معرفی شدند (Sarikurkcu et al., 2015). طبق نتایج به دست آمده توسط محققین دیگر، تعداد ۲۰ ترکیب

مهمترین عواملی که باعث تغییر در سرعت واکنش می‌گردد عبارتند از: سویسترا، آنزیم، محصول واکنش، مهارکننده‌ها، قدرت یونی و حرارت. همانطور که بررسی‌های ذکر شده نشان می‌دهند سطح فعالیت آنزیم‌ها در حشرات بسیار متنوع و در عین حال وابسته به رژیم غذایی آنها است. به طوری که حشرات با رژیم غذایی غنی از نشاسته افزایش قابل توجهی در عملکرد آنزیم آمیلاز نشان می‌دهند (Bigham et al., 2011). در مطالعه‌ای ده گونه آویشن ایرانی اسانس‌گیری شده و محتوای آنها مورد مقایسه قرار گرفت. در این مقاله آویشن ایرانی به چهار گروه تقسیم شد که از این میان تیمول و کارواکروول اجزای تشکیل دهنده اصلی تعیین کننده کیفیت گونه آویشن گزارش شد (Tohidi et al., 2017). طی تحقیقات انجام شده بر روی اسانس روغنی گیاه آویشن مشاهده شد که ۳۰ ترکیب با استفاده از طیف سنجی جرمی-کروماتوگرافی گازی شناسایی شدند که ۱۰۰٪ اسانس را تشکیل می‌دهند. اجزا اصلی به دست آمده شامل تیمول (۰/۴۶/۲)، گاما ترپنین (۰/۱۴/۱)، p-سیمن (۰/۹/۹)، لینالول (۰/۴)، میرسین (۰/۳/۵)، آلفا-پینن (۰/۳) و آلفا-توژن (۰/۲/۸) بودند که تیمول با ۴۶/۲ درصد بیشترین جز تشکیل دهنده گزارش شد (Ozcan & Chalchat, 2004). از طرفی گزارش شده که اسانس آویشن باغی اردبیل دارای آلفا-پینن و آلفا-ترپنین به ترتیب برابر ۰/۷۲ و ۰/۲۹ درصد می‌باشد. کارواکروول، منوترپنئوئید غیر حلقوی و لینالول و تیمول از ترپنئوئیدهای فنولی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدحشره تایید شده هستند (Dauqan & Abdullah, 2017). علاوه بر مقدار، نوع ترکیباتی که در اسانس یک گیاه از مناطق مختلف گزارش می‌شود تفاوت‌هایی دیده می‌شود که احتمالاً به دلیل تغییرات عوامل فصلی و جغرافیایی و محتوای ژنتیکی گیاهان و مرحله زیستی آنها و روش استخراج اسانس‌ها باشد. اثرات زیستی اسانس‌های گیاهی ارتباط مستقیمی با ترکیبات عمده موجود در این اسانس‌ها و اثرات هم‌افزایی آنها با سایر اجزا دارد. اسانس آویشن باغی علاوه بر خاصیت ضدقارچی، با

در غلظت ۳/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۸۷ و ۸۳ درصد فعالیت آلفا-گلوکوزیداز را کاهش دادند. نتایج آزمایش‌های ما نشان داد که اسانس گیاه اسطوخدوس آنزیم آلفا-آمیلاز غده گوارشی حلزون را به صورت رقابتی مهار می‌کند. از طرفی اسانس گیاه مرزنگوش می‌تواند برای آنزیم آلفا-گلوکوزیداز به عنوان یک مهارکننده رقابتی موثر بر آن عمل کند. بنابراین ترکیب‌های D-کافور و ترپینول که از اجزای اصلی اسانس اسطوخدوس و مرزنگوش هستند، می‌توانند به عنوان مهارکننده‌های رقابتی موثر برای آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز حلزون در این تحقیق نتیجه‌گیری شوند.

در اسانس روغنی گیاهان مورد مطالعه ما تعداد محدودی از ترکیبات با محتوای بالا شناسایی شدند. بنابراین احتمالاً همین ترکیبات می‌توانند عامل اصلی در مهار آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز باشند، که هر دو از آنزیم‌های مهم در سیستم گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات هستند. نتایج نشان دادند که اسانس روغنی گیاه مرزنگوش و آویشن می‌توانند به ترتیب به عنوان مهارکننده‌های آنزیم آلفا-آمیلاز و آنزیم آلفا-گلوکوزیداز عمل نمایند. به طور کلی و با توجه به اینکه اسانس‌ها ترکیبات طبیعی و زیست‌سازگار هستند، نتایج این مطالعه برای تحقیقات بیشتر و همچنین ارائه فرمولاسیون مناسب برای ترکیبات اصلی این اسانس‌ها پیشنهاد می‌گردد که می‌تواند به عنوان روشی کاربردی به منظور جایگزینی حلزون‌کش‌های شیمیایی مورد توجه قرار گیرد.

سپاس‌گزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر تقدیر و تشکر می‌شود.

شیمیایی در اسانس گیاه مرزنگوش شناسایی شد که از فراوان‌ترین آنها می‌توان به ترکیب‌های ۴-ترپینول، با خاصیت ضدقارچی، گاما-ترپینن و آلفا-ترپینن که دارای اثرات ضد میکروبی روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی همچنین اثرات ضدقارچی هستند اشاره کرد (An et al., 2019). ترکیبات اصلی شناسایی شده در اسانس نعنا وحشی شامل: ۸-سینئول، لینالول، منتون، ترانس-پیپریتون اکسید، پولگون و پیپریتون اکسید گزارش شده است که از بین آن‌ها مونوترپن‌های اکسیژنه هم خواص آنتی‌اکسیدانی داشته و هم عامل اصلی مهار برخی آنزیم‌های مهم هستند (Asghari et al., 2018). در گزارشی دیگر نتیجه‌گیری شده که اسانس روغنی گیاه مرزنگوش و عصاره متانولی استخراج‌شده از این گیاه پتانسیل بالایی برای تخریب جایگاه نشاسته در آنزیم آلفا-آمیلاز را نشان دادند (Béjaoui et al., 2013). فعالیت آنزیم‌های آلفا-آمیلاز و آلفا-گلوکوزیداز استخراج‌شده از حلزون قهوه‌ای با اسانس روغنی هر یک از گیاهان تیمار شد و مهار آنزیم‌ها با کاهش مقدار جذب قطعی شد. نتایج مطالعه حاضر برای آنزیم آلفا-آمیلاز و گلوکوزیداز در شرایط انکوباسیون با اسانس گیاه‌های آویشن، اسطوخدوس و مرزنگوش نشان داد که اسانس گیاه آویشن در غلظت ۴/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانست تا ۹۴ درصد فعالیت آنزیم را مهار کند. همچنین، اسانس گیاه‌های مرزنگوش و اسطوخدوس در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۷۸ و ۹۰ درصد فعالیت آلفا-آمیلاز را مهار کردند. از سوی دیگر، اسانس گیاه آویشن در غلظت ۱/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانست تا ۸۰ درصد فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز را مهار کند. اسانس گیاه مرزنگوش در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و اسطوخدوس

References

Ahmadi, E., & Halaji Sani, M. F. (2007). An investigation on effectiveness of copper barrier against *Caucasotachea lencoranea* (Mouss.) in citrus orchards of Mazandaran province. *Pajouhesh-va-Sazandegi*, 97-102. <https://sid.ir/paper/19079/en>

- An, P., Yang, X., Yu, J., Qi, J., Ren, X., & Kong, Q. (2019). α -terpineol and terpene-4-ol, the critical components of tea tree oil, exert antifungal activities in vitro and in vivo against *Aspergillus niger* in grapes by inducing morphous damage and metabolic changes of fungus. *Food Control*. 98, 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.013>
- Asghari, B., Zengin, G., Bahadori, M. B., Abbas-Mohammadi, M., & Dinparast, L. (2018). Amylase, glucosidase, tyrosinase, and cholinesterases inhibitory, antioxidant effects, and GC-MS analysis of wild mint (*Mentha longifolia* var. *calliantha*) essential oil: A natural remedy. *European Journal of Integrative Medicine*. 22, 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2018.08.004>
- Barker, G. M. (2004). The biology of terrestrial molluscs. *Commonwealth Agricultural Bureaux International*, New York, USA. pp. 1-24.
- Béjaoui, A., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013) Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. from Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7, 2429-2435. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5043>
- Ben, E. E., Asuquo, A. E., & Owu, D. U. (2019) The Role of Serum Alpha-Amylase and Glycogen Synthase in the Anti-Diabetic Potential of *Terminalia catappa* Aqueous Leaf Extract in Diabetic Wistar Rats. *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*. 6, 1-11. <https://doi.org/10.9734/AJRIMPS/2019/v6i230096>
- Bennett, R. N., & Wallsgrave, R. M. (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. 127, 617-633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Bernfeld, P. (1955) Amylase, α and β . *Methods in Enzymology*. 1, 149-158. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Bigham, M.; Hoseininaveh, V.; Nowzari, J.; & Hoseininaveh, F. (2011) A Study of the Digestive Gland's Glucosidases and α -Amylase in Citrus Brown Snail, *Caucasotachea leucoranea* (Stylommatophora: Helicidae). *Iranian Journal of Plant Protection Science*. 41, 271-281. (in persian). https://ijpps.ut.ac.ir/article_22362_4b692cec16636c6efd1d72d54ae7fe6e.pdf?lang=en
- Bisswanger, H. (2017). *Enzyme kinetics: principles and methods*, John Wiley & Sons. pp. 10-26. <http://utsavbali.com/wp-content/uploads/2014/06/Enzyme-Kinetics-Principles-and-Methods.pdf>
- Britton, H. T. S., & Robinson, R. A. (1931). CXC VIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society*. 1456-1462. <https://doi.org/10.1039/JR9310001456>
- Dauqan, E. M., & Abdullah, A. (2017) Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.) herb. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 5, 17-22. https://jabonline.a2hosted.com/jab_php/admin/php/uploads/188_pdf.pdf
- Ebadollahi, A., Taghinezhad, E., & Davari, M. (2018) Optimization of antifungal and insecticidal effects of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil through response surface methodology. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*. 7, 1-19. https://jbiocontrol.ut.ac.ir/article_67163_14c2fc12a76b2f8ab0087e40040c2b08.pdf?lang=en
- Fu, J. T., Tang, L., Li, W. S., Wang, K., Cheng, D. M., & Zhang, Z. X. (2015). Fumigant toxicity and repellence activity of camphor essential oil from *Cinnamomum camphora* Siebold against *Solenopsis invicta* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Insect Science*. 15(1), 129 <https://doi.org/10.1093/jisesa/iev112>.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003) Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38, 1599-1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)

Hajipour Dehbalaei, S., Afsharmanesh, M., & Sami, M. (2016) Effect of essential oils of thyme, oregano and their combination on quality of quail meat in comparison with virginiamycin. *Food Hygiene*, 5, 45-54. (in persian). <https://sid.ir/paper/222936/en>

Ibáñez, M. D., & Blázquez, M. A. (2017). Herbicidal value of essential oils from oregano-like flavour species. *Food and Agricultural Immunology*, 28, 1168-1180. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1332010>

Justin, S. S., Bernard, S. T., Mathias, K.K., Renel, S. R., Aboutous, K. K. R. A., Kore, D. J. (2014). Purification and physicochemical characterization of the α -glucosidase of the digestive juice of the snail *Limicolaria flammea* (Müller 1774). *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 4, 376-388. <https://doi.org/10.15671/HJBC.2018.256>

Kalra, S. (2014). Alpha glucosidase inhibitors. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, 64, 474-476. PMID: 24864650

Kazzazi, M. (2007) Study of digestive amylase and glucosidase in *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) and of alpha-amylase inhibitor in wheat dominant. Ph.D. thesis, University of Tehran. Pp 142. (In Farsi).

Kazzazi, M., Dehghanikhah, F., Madadi, H., & Hosseininaveh, V. (2014). Biochemical characterisation of α -glucosidase and β -glucosidase in the alimentary canal of larval *Leptinotarsa decemlineata* SAY, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae). *Polish Journal of Entomology*, 83(4), 281-294. <https://doi.org/10.2478/pjen-2014-0022>

Low, N. H., Va Vong, K., Sporns, P. (1986). A new enzyme, β -glucosidase, in honey. *Journal of Apicultural Research*, 25, 178-181. <https://doi.org/10.1080/00218839.1986.11100713>

Machado, M., Dinis, A. M., Salgueiro, L., Custódio, J.B., Cavaleiro, C., & Sousa, M.C. (2011). Anti-Giardia activity of *Syzygium aromaticum* essential oil and eugenol: effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Experimental Parasitology*, 127(4), 732-739. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.01.011>

Mirkazemi, F., Bandani, A., Sabahi, G. (2010) Fumigant Toxicity of Essential Oils from Five Official Plants Against Two Stored Product Insects: Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) and Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 32(2), 37-54. https://plantprotection.scu.ac.ir/article_10229_c215becd51e77f6ca2b3febe414014c2.pdf

Miyazawa, M., Watanabe, H., Umamoto, K., & Kameoka, H. (1998). Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oils of *Mentha* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3431-3434. <https://doi.org/10.1021/jf9707041>

Mohadjerani, M., & Sanaei, Z. (2022). Evaluation of Kinetic Parameters of α -Amylase in the Presence of the Flavonoid Rich-Extract of *Ficus carica* L., an In-vitro Study: Kinetic Parameters of α -Amylase in the Presence of Fig Flavonoids. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(4), 316-325. <https://doi.org/10.22037/ijps.v18.43101>

Mohadjerani, M., & Tavakoli, R. (2015). *The constituents of medicinal plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine*. (pp. 145-170). Press: University of Mazandaran. (in Farsi)

- Nagaraju, J., & Abraham, E. G. (1995). Purification and characterization of digestive amylase from the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* (Lepidoptera: Saturniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 110(1), 201-209. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)00121-A](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)00121-A)
- Ozcan, M., Chalchat, J. C. (2004). Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30, 68-73. http://www.bio21.bas.bg/ipp/gapbfiles/v-30/04_3-4_68-73.pdf
- Prigent, S., Matoub, M., Rouland, C., & Cariou, M. L. (1998). Metabolic evolution in α -amylases from *Drosophila virilis* and *D. repleta*, two species with different ecological niches. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 119(2), 407-412. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00367-2](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00367-2)
- Pirian K., Moein, S., Sohrabipour, J., Rabeie, R., & Piri, K. (2018). Evaluation of antioxidant and α -amylase inhibitory activity of two species *Sargassum angustifolium* and *Palisada perforate*. *Cellular and Molecular Research*, 13(2), 158-171. <https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832738.1397.31.2.4.2>.
- Rasouli, I., Rezaei, M. B., kamrani, A., & Zarpak, B. (2003) Comparison of Antibacterial Activities of Essential Oils of Thymus x-Portlock and Ampicillin In-vitro. *Avicenna Journal of Clinical Medicine*, 9 (4), 23-30. <http://sjh.umsha.ac.ir/article-1-779-en.html>.
- Sarikurcu, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., & Aktumsek, A. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. vulgare and subsp. hirtum) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.030>
- Shahbazy, S. (2012). Isolation and identification of essential oil compounds, sweat from *Lavandula angustifolia*. *The Application of Chemistry in Environment*, 3(12), 49-55. (in Farsi). <https://sid.ir/paper/236310/en>
- Shen, X., Saburi, W., Gai, Z., Kato, K., Ojima-Kato, T., Yu, J., Komoda, K., Kido, Y., Matsui, H., Mori, H., & Yao, M. (2015). Structural analysis of the α -glucosidase HaG provides new insights into substrate specificity and catalytic mechanism. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71, 1382-1391. <https://doi.org/10.1107/S139900471500721X>
- Shirai, T., Hung, V. S., Morinaka, K., Kobayashi, T., & Ito, S. (2008). Crystal structure of GH13 α -glucosidase GSJ from one of the deepest sea bacteria. *Proteins*, 73, 126-133. <https://doi.org/10.1002/prot.22044>
- Siegentaler, U. (1977). Eine einfache und rasche methode zur bestimmung der alpha-glucosidase (saccharase) im honig. *Mitteilung aus Gebiete Lebesmitelluntersuchung und Hygiene*, 68, 251-258.
- Svensson, B. (1988) Regional distant sequence homology between amylases, α -glucosidases and transglucanoylases. *FEBS letters*, 230, 72-76. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80644-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80644-6)
- Tavakoli, M. M., Davari, B., Nasirian, H., Salehzadeh, A., Moradkhani, S., & Zahirnia, A. H. (2021). Investigation of insecticidal properties of Rosmarinus officinalis L. and *Lavandula angustifolia* Mill. essential oils against German cockroach in laboratory. *Feyz*, 25(3), 994-1002. <http://feyz.kaums.ac.ir/article-1-4254-en.html>
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., Arzani, A. (2017). Essential oil composition, total phenolic and flavonoid contents, and antioxidant activity of Thymus species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 220, 153-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.203>.

Van de Laar, F. A., Lucassen, P. L., Akkermans, R. P., Van de Lisdonk, E. H., Rutten, G. E., & Van Weel, C. (2005). Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003639.pub2>

Van der Maarel, M. J. E. C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of biotechnology*, *94*, 137-155. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00407-2).

Withers, S. G., & Aebersold, R. (1995). Approaches to labeling and identification of active site residues in glycosidases. *Protein Science*, *4*, 361-372. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040302>

Yilmazer-Musa, M., Griffith, A. M., Michels, A. J., Schneider, E., & Frei, B. (2012). Grape Seed and Tea Extracts and Catechin 3-Gallates Are Potent Inhibitors of α -Amylase and α -Glucosidase Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(36), 8924-8929. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf301147n>.

Zarezadeh, A., Mirhossaini, A., Mirza, M., & Arabzadeh, M. R. (2014) Extraction and qualitative and quantitative analysis of the essential oil of Thymus species cultivated in Yazd. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, *30*(4),634-649. <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2014.9845>.



© 2024 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).