بررسی ویژگی‌های آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در دستگاه گوارشی *Agriolimax agrestis* L. (Stylommatophora: Limacidae)

محبوبه شریفی[۲] و محمد قدمیاری[۱]*

۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

۲*- **نویسنده مسؤول:** استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان (ghadamyari@guilan.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۱۲

چکیده

راب خاکستری مزرعه‌ای یکی از آفات مهم سبزیجات در استان‌های شمالی کشور است. آنزیم‌های گوارشی آفات اهداف بسیار خوبی برای عوامل آفت‌کش مانند بازدارنده‌ها می‌باشد. بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به آفات استفاده می‌شوند. برای رسیدن به این هدف بایستی ماهیت و ویژگی-های آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه قرار گیرد. در این مطالعه ویژگی‌های بیوشیمیایی آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش این آفت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت ویژه بتا گلوکوزیداز در روده بالاتر از فعالیت آن در غدد گوارشی می باشد. مقدار pH بهینه فعالیت آلفا-گلوکوزیداز در قسمت جلویی دستگاه گوارش (مری و حفره دهانی) ٦، در روده ٥ تا ٦ و در غدد گوارشی ٦ تا ٧ به‌دست آمد. همچنین pH بهینه برای بتا-گلوکوزیداز موجود در قسمت جلویی دستگاه گوارش ٥، در روده ٦ و در غدد گوارشی ٤ تا ٦ بود. بالاترین دما برای فعالیت آلفا-گلوکوزیداز در تمام سه قسمت دستگاه گوارش ٦٠ درجه سلسیوس به‌دست آمد. در حالی‌که دمای بهینه برای فعالیت بتا-گلوکوزیداز در قسمت جلویی دستگاه گوارش ٤٠، در روده ٥٠ تا ٦٠ و در غدد گوارشی ٥٠ درجه سلسیوس بود. تخمین پارامترهای سینتیکی نشان داد که میزان K_m آلفا-گلوکوزیداز در قسمت جلویی دستگاه گوارش ٢/٤٤، در روده ١/٤٤ و در غدد گوارشی ٣/٢٨ میلی مولار بود. همچنین K_m آنزیم بتا-گلوکوزیداز در قسمت جلویی دستگاه گوارش ١/٢٤، در روده ١/١٧ و در غدد گوارشی ٠/٩٤ میلی مولار به‌دست آمد. نتایج زایموگرام نشان داد که آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز غدد گوارشی به ترتیب دارای یک و دو ایزوفرم بود.

کلید واژه ها: راب خاکستری مزرعه‌ای، آلفا- گلوکوزیداز، بتا- گلوکوزیداز، غدد گوارشی و روده

مقدمه

گلوکوزیدازها شامل آنزیم‌هایی می‌باشند که الیگوساکاریدها و دی‌ساکاریدها را هیدرولیز می‌کنند. گلیکوزیدازها معمولاً بر اساس منوساکاریدها نام‌گذاری می‌شوند و گلوکز حاصل از عمل آنزیم و شکست باندهای آنها از ناحیه آلفا یا بتا گلوکوزید حاصل می شود. آلفا-گلوکوزیدازها (EC 3.2.1.20) هیدرولیز باقیمانده α-۱و۴ گلوکزی از آریل گلوکوزیدها (نظیر p-nitrophenyl- α- D-glucoside، دی ساکاریدها یا الیگوساکاریدها) را کاتالیز می نمایند. این آنزیم‌ها به فراوانی درموجودات یافت می‌شوند (ترا و فریرا[1]، ۱۹۹۴). آلفا-گلوکوزیدازها در دستگاه گوارش تعدادی از حلزون ها و راب‌ها یافت می‌شوند و تاکنون تحقیقات کمی در این زمینه انجام شده و

1 - Terra & Ferreira

ویژگی‌های این آنزیم در سیستم گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات (*Caucasotachea lencoranea* (Stylommatophora: Helicidae))، راب سیاه اروپایی (*Arion ater* L. (Gastropoda: Arionidae)) و راب *Incilaria bilineata* (Gastropoda: Philomycidae) مورد بررسی قرار گرفته است و pH بهینه برای این آنزیم در شرایط اسیدی گزارش شده است (بی‌غم و همکاران، ۱۳۸۹؛ اوانس و جونز[1]، ۱۹۶۲؛ یاماساکی و کونو[2]، ۱۹۹۸).

بتا-گلوکوزیداز دارای نام‌های دیگری شامل جنتوبیوز و سلوبیوز نیز می باشد. بتاگلوکوزیداز در همه گیاهان، جانوران، قارچ ها و باکتری ها وجود دارد (اسن، ۱۹۹۳[3]). در حلزون ها و راب‌ها، بتا-گلوکوزیداز از گونه‌های مختلف مانند حلزون بزرگ غنایی (*Achatina achatina* (Stylommatophora: Achatinidae))، *A. fulica* و *A. ater*، حلزون سیب (*Pila ovata* Olivier (Architaenioglossa: Ampullariidae))، (*Lymnaea natalensis* (Hygrophila: Lymnaeidae))، (*Biomphalaria sudanica* (Hygrophila: Planorbidae))، (*Bulinus africanus* (Hygrophila: Planorbidae)) و *B. nasutus* (یومزوریک[4]، ۱۹۷۶؛ هو و همکاران[5]، ۲۰۰۷؛ اوانس و جونز، ۱۹۶۲؛ کولس[6]، ۱۹۶۹). گزارش شده و مورد مطالعه قرار گرفته است. بتاگلوکوزیدازها هیدرولیز β-۱-۴ باقیمانده منوساکاریدها از گلیکوزیدها را کاتالیز می نماید. از این رو با توجه به منوساکاریدی که از زنجیره جدا می شود، بتاگلوکوزیداز نام‌گذاری می شود (ترا و فریرا، ۱۹۹۴).

تاکنون تحقیقات زیادی در زمینه بیوشیمی آنزیم‌های گوارشی حشرات آفت صورت گرفته یا در حال انجام است. اما در زمینه آنزیم‌های گوارشی نرمتنان آفت تحقیقات بسیار کمی انجام شده است. هدف از این تحقیقات مشخص نمودن ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم-های گوارشی راب *Agriolimax agrestis* L. می-باشد. آنزیم‌های گوارشی در تغذیه و جذب مواد غذایی در طول مراحل مختلف زندگی نقش حیاتی را بر عهده دارند و از این طریق در حفظ بقا و تولیدمثل مؤثر واقع می شوند (جورج و همکاران[7]، ۲۰۰۸). یکی از روش-های مؤثر کنترل آفات در برنامه های مدیریت تلفیقی، استفاده از ارقام مقاوم و گیاهان تراریخته می باشد. ارقام مقاوم به طرق مختلف روی زندگی آفت و یا ارتباط متقابل گیاه-جانور تاثیر گذاشته و از شدت خسارت می کاهند. یکی از موارد بسیار حیاتی در این ارتباط تغذیه از میزبان می باشد. غذایی که آفت دریافت می کند، می تواند این ارتباط را با استفاده از گیاهان مقاوم به آفات به شدت تحت تاثیر قرار دهد. اولین قدم در ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به آفات شناخت آنزیم‌های گوارشی، میزان فعالیت و بیوشیمی این آنزیم‌ها می‌باشد. پس از شناخت این آنزیم‌ها و بررسی مهارکننده‌های گیاهی روی آن، می توان با وارد کردن ژن های بیان کننده بازدارنده‌های آنزیمی حشرات به گیاه مورد نظر و بیان ژن های مذکور در گیاه باعث تولید مهار کننده های این آنزیم‌ها در گیاه شده و گیاهان مقاوم تولید

1 - Evans & Jones
2 - Yamasaki & konno
3 - Esen
4 - Umezurike
5 - Hu *et al.*
6 - Coles
7 - George *et al.*

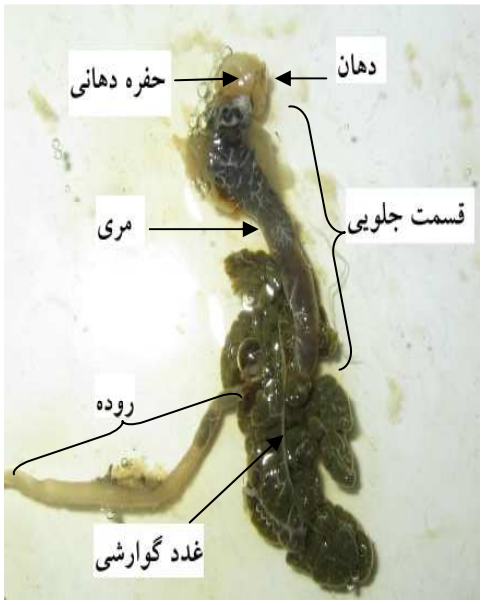
کرد. ضمن تغذیه حشره از گیاهان تراریخته، مهار کننده ها وارد بدن حشره شده و منجر به بلوکه کردن آنزیم های هدف می شوند (شارما و ارتیز[1]، ۲۰۰۰).

راب خاکستری مزرعه‌ای *A. agrestis* از آفات مهم گیاهان سبزی و جالیز در شمال ایران می باشد. تا کنون روش های مختلفی برای کنترل این آفت از جمله کنترل شیمیایی با استفاده از کاربارل و متالدهید بکار برده شده است. با توجه به وضعیت بارندگی در شمال کشور، استفاده از طعمه های مسموم و سم پاشی با کاربارل، با مشکلاتی همراه است و استفاده از سموم شیمیایی برای کنترل این آفت نه تنها باعث آلودگی محیط زیست می‌شود، بلکه باعث از بین رفتن دشمنان طبیعی و مقاومت به آفت کش‌ها می‌گردد. یکی از روش‌های رایج در مدیریت تلفیقی آفات (IPM) استفاده از گیاهان تراریخته است که نقش مهمی در IPM دارد. امروزه گیاهان تراریخته ای تولید شده‌اند که ماده سمی دلتا اندوتوکسین و بازدارنده‌های گیاهی تولید نموده و مقاوم به آفات می‌باشند. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای بیان ژن‌های مهارکننده آنزیم‌های گوارشی در گیاهان به منظور مقاوم نمودن گیاهان به آفات انجام گرفته است. به همین دلیل در این تحقیق شکل شناسی سیستم گوارشی و ویژگی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز راب خاکستری مزرعه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. امید است نتایج حاصل از این تحقیق بتواند به ارتقای دانش ما در مورد فیزیولوژی سیستم گوارشی رابها کمک نماید.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه

راب‌های بالغ *A. agrestis* از روی گیاه ترب واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان جمع آوری شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا جانوران بالغ روی یخ قرار داده شده تا بی حس شوند. برای جداسازی دستگاه گوارشی به کمک پنس انتهای بدن جانور نگه داشته شد و با پنس دیگر قسمت میانی بدن جانور شکافته شد. قسمت جلویی لوله گوارش، غدد گوارشی و قسمت عقبی لوله گوارش (شکل ۱) جدا شد و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.



شکل ۱- بخش‌های مختلف دستگاه گوارشی راب خاکستری مزرعه ای *Agriolimax agrestis*

تهیه عصاره آنزیمی

برای استخراج آنزیم ها از بخش های مختلف لوله گوارش و غدد گوارشی، نمونه ها با استفاده از هموژنایزر دستی هموژنایز شدند. نمونه ها در دمای ۴+ درجه سلسیوس در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس رونشین جدا شد و به عنوان منبع آنزیمی استفاده گردید.

1 - Sharma & Ortiz

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز:

تعیین فعالیت آنزیم‌های گلوکوزیداز بر اساس روش سیگن تالر[1] (۱۹۷۷)، با اندکی تغییرات انجام شد (قدمیاری و همکارن[2]، ۲۰۱۰) برای اندازه گیری فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا- گلوکوزیداز به ترتیب از سوبستراهای p-nitrophenol α-D-glucopyranosid و p-nitrophenol ß-D-glucopyranosid استفاده شد. اندازه گیری فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در بافر گلایسین- فسفات- استات ۰/۰۴ مولار با حجم واکنش برابر ۱۷۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۴۵ میکرولیتر سوبسترا و۱۱۵ میکرولیتر بافر انجام شد. پس از مدت ۲۰ دقیقه، واکنش با افزایش ۶۰۰ میکرولیتر محلول هیدروکسید سدیم ۰/۲۵ نرمال متوقف شد و پس از ۱۰ دقیقه پی- نیتروفنل تولید شده به وسیله دستگاه میکروپلیت مدل Microplate reader Stat Fax 3200 در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. بلانک فاقد آنزیم بود و به جای آنزیم از آب مقطر استفاده شد. برای تعیین یک واحد فعالیت گلوکوزیداز، نیاز به مقدار آنزیمی است که بتواند یک میلی مول پارانیتروفنل را در یک میلی لیتر و در مدت یک دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تولید نماید. برای اندازه گیری فعالیت ویژه، مقدار عددی فعالیت آنزیم بر حسب میلی مول پارانیتروفنل بر مقدار پروتئین در نمونه تقسیم گردید. جهت تعیین فعالیت آنزیم از منحنی کالیبراسیون پارا نیتروفنل استفاده شد. برای تهیه این منحنی از غلظت های ۰/۱۵۶ ، ۰/۳۱۲ ، ۰/۶۲۵ ، ۱/۲۵ ، ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ میلی مولار استفاده شد.

اندازه گیری pH بهینه آنزیم آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

در این آزمایش از بافر فسفات- گلایسین- استات ۰/۰۴ مولار با طیف pH از ۳ تا ۱۲ استفاده شد. پس از تهیه بافر، ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی با ۱۱۵ میکرولیتر بافر با دامنه pH ۳-۱۲ مخلوط شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از طی ۳ دقیقه، به هر یک از تیمارها ۴۵ میکرولیتر سوبسترای ۲۵ میلی مولار اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس واکنش با ۶۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۰/۲۵ مولار متوقف شد. در نهایت جذب نمونه ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد.

اندازه گیری دمای بهینه آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز:

برای بررسی اثر دما روی فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز مقدار ۱۰ میکرولیتر آنزیم با ۱۱۵ میکرولیتر بافر ۰/۰۴ مولار با pH =۵ (pH بهینه) مخلوط شد و در دماهای مختلف(۱۵، ۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵) درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از طی ۳ دقیقه ، به هر یک از تیمارها ۴۵ میکرولیترسوبسترای اختصاصی افزوده شد. سپس، میکروتیوب‌های حاوی آنزیم ، بافر و سوبسترا برای مدت ۲۰ دقیقه در دماهای مورد نظر قرار داده شدند.پس از سپری شدن زمان واکنش، همانند روش تعیین pH بهینه فعالیت آنزیم اندازه گیری شد.

1 - Siegentaler
2 - Ghadamyari *et al.*

تعیین پارامترهای سینتیکی (K_m و V_{max})

برای تعیین پارامترهای سینتیکی (K_m و V_{max}) آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا- گلوکوزیداز، ابتدا غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی مولار از سوبستراهای اختصاصی هر کدام از آنزیم‌ها تهیه شد. سپس در هریک از میکروتیوب‌ها ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۴۵ میکرولیتر سوبسترا با غلظت‌های تعیین شده و ۱۱۵ میکرولیتر بافر با pH= ۶ اضافه شد. سپس در زمان های ۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ دقیقه پس از واکنش، با اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم ۰/۲۵ مولار واکنش متوقف شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد. مقدار سرعت اولیه(V_o) آنزیم در غلظت‌های مختلف با استفاده از نرم افزار اکسل و مقدار K_m و V_{max} با استفاده از نرم افزار هایپر(ورژن۱/۰۲، ۱۹۹۳) اندازه گیری شد.

الکتروفورز native-PAGE آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

برای انجام این کار از روش دیویس[1] (۱۹۶۴) و توکودا و همکاران[2] (۲۰۰۲) با اندکی تغییر استفاده شد. برای الکتروفورز آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز، نمونه ها با بافر نمونه مخلوط شدند و داخل چاهک ژل (ژل بالا ۴٪ و ژل پایین ۱۰٪) بارگذاری شدند. الکتروفورز در ۱۰۰ ولت و در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام شد. سپس ژل به سوبسترای فلورسانت دار تهیه شده در بافر استات سدیم ۰/۱ مولار (pH=۶/۵) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق منتقل شد. از 4-methylumbelliferyl-ß-D-glucopyranoside (4-MUßG) و 4-methylumbelliferyl-α-D-glucopyranoside (4-MUαG) با غلظت ۳ میلی مولار به ترتیب برای مشخص نمودن باندهای بتا-گلوکوزیداز و آلفا-گلوکوزیداز استفاده شد. باندهای فلورسنت زیر نور UV مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری پروتئین

اندازه گیری میزان پروتئین نمونه ها با استفاده از روش برادفورد[3] (۱۹۷۶) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد انجام شد.

نتایج و بحث

شکل شناسی دستگاه گوارش

سیستم گوارشی راب‌ها از دهان شروع و به مخرج ختم می شود و شامل دهان، حفره دهانی[4]، مری، غدد گوارشی و روده می باشد. در این تحقیق دستگاه گوارش *A. agrestis* به سه قسمت تقسیم شد، این قسمت‌ها تحت عنوان قسمت جلویی، غدد گوارشی و روده نامگذاری شدند (شکل ۱). که در این پژوهش سه قسمت دهان، حفره دهانی و مری[5] در قسمت جلویی واقع شده است. غدد گوارشی که در نرمتنان تحت عنوان غدد معدی[6]، هپاتوپانکراس و یا کبد نامیده می شود، بزرگترین اندام در Stylommatophora است. این اندام در تولید آنزیم‌های گوارشی، جذب مواد غذایی، ذخیره ماده غذایی و دفع نقش دارد (دیمیتریادیس[7]، ۲۰۰۲).

1 - Davis
2 - Tokuda *et al.*
3 - Bradford
4 - Buccal bulb
5 - Oesophagus
6 - Midgut gland
7 - Dimitriadis

فعالیت ویژه آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش

مقایسه فعالیت ویژه آنزیمی در این سه قسمت نشان داد که فعالیت ویژه آلفا-گلوکوزیداز در قسمت جلویی بیشتر از فعالیت آن در روده و غدد گوارشی بود. همچنین فعالیت ویژه بتاگلوکوزیداز در قسمت جلویی بیشتر از روده و در روده بیشتر از غدد گوارشی بود. کمترین فعالیت ویژه گلوکوزیدازها مربوط به غدد گوارشی بود (جدول ۱). نشان داده شده است که عمده ترین آنزیم‌های گوارشی موجود در سیستم گوارشی حلزون‌های راسته استیلوماتوفورا کربوهیدرازها هستند. به عنوان مثال از ۳۰ نوع آنزیم گوارش موجود در دستگاه گوارشی خانواده Helicidae بیشتر از ۲۰ نوع آن متعلق به کربوهیدرازها بود (بیکر[1]، ۲۰۰۱). حلزون *Archachatina ventricosa* (Stylommatophora: Achatinoidea) در دستگاه گوارشی دارای تعدادی از گلیکوزیدازها مانند گلوکوزیداز، مانوزیداز، سلولاز، فوکوزیداز و گلوکورونیداز است که می تواند تعداد زیادی از سوبستراهای مصنوعی و پلی ساکاریدهای گیاهی را هیدرولیز کند (کولاس[2]، ۱۹۸۰؛ لپارکس و همکاران[3]، ۱۹۹۷ و ۱۹۹۴).

فعالیت های کربوهیدرازی در لوله گوارشی حلزون (*Helix lucorum* L. (Stylommatophora: Helicidae)) مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت کربوهیدرازی در مری، چینه دان[4]، معده، روده و غدد گوارشی بود. این جانور قادر به تجزیه اکثر سوبستراهای سنتزی الیگوساکاریدی و پلی ساکاریدها می‌باشد (فلری و چاریر[5]، ۱۹۹۲). فعالیت کربوهیدرازی در طی یک دوره ۲۴ ساعته و طی اولین روزهای گرسنگی در حلزون های بالغ و جوان *H. lucorum* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غدد گوارشی در ترشح اغلب آنزیم‌های کربوهیدرازی مورد آزمون نقش غالب و مهمی داشت. غدد براقی ترشح کننده برخی از آنزیم‌های گوارشی بود، اما مقدار آنزیم ترشح شده توسط غدد گوارشی بیشتر از غدد براقی بود. در طی اولین ساعات گوارش و همچنین پس از خالی شدن لوله گوارش، فعالیت آنزیم دستخوش نوسان می‌باشد (فلری و لازاریدو-دیمیتریادو[6]، ۱۹۹۶). گزارش شده است که غدد براقی *A. ater* در مقایسه با عصاره چینه دان و غدد گوارشی طیف باریکتری از سوبستراهای کربوهیدراتی را هیدرولیز می‌کند و در عصاره چینه‌دان که به وسیله غدد گوارشی ترشح می-شود، آنزیم‌های آمیلاز، ۱و۴-بتا-پلی گلوکوسیداز، آلفا-گلوکوزیداز، تره‌هالاز، بتا-گلوکوزیداز، آلفا-گالاکتوزیداز و بتا- گالاکتوزیداز وجود داشت. مقدار pH لوله گوارش این راب حدود ۶±۰/۱ بود. که برای هضم سوبستراهای دارای پیوند α مناسب‌تر از سوبستراهای دارای پیوند β بود (اوانس و جونز، ۱۹۶۲). خصوصیات آنزیم بتاگلوکوزیداز در حلزون *A. fulica* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز در این حلزون ۰/۲۶ میکرومول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین بود (هو و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج ما نشان داد که فعالیت ویژه آنزیم بتاگلوکوزیداز *A. agrestis* به مراتب بیشتر از *A. fulica* بود. چون سلولز یک منبع عمده کربوهبدرات برای حلزون *A. achatina* می باشد، بنابراین دور از ذهن نیست که بتاگلوکوزیداز که همیشه همراه سلولز وجود دارد در لوله گوارش این جانور به میزان زیاد وجود داشته باشد. به نظر می رسد که این آنزیم نقش مهمی برای فراهم نمودن گلوکز مورد استفاده برای فرایندهای متابولیکی ایفا نماید (هو و همکاران، ۲۰۰۷).

1 - Baker
2 - Colas
3 - Leparoux *et al.*
4 - Crop
5 - Flari & Charrier
6 - Flari & Lazaridou-Dimitriadou

جدول ۱- میانگین فعالیت ویژه آنزیم‌های آلفا- گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در سیستم گوارشی راب خاکستری مزرعه‌ای *Agriolimax agrestis* (اشتباه معیار ± میانگین)

بافت	آلفا-گلوکوزیداز (µmol/min/mg protein)	بتا-گلوکوزیداز (µmol/min/mg protein)
قسمت جلویی دستگاه گوارش	۳/۰۴± ۰/۱**a**	۵/۱۸±۰/۱۲**a**
غدد گوارشی	۱/۴۲±۰/۰۸**b**	۱/۶۹±۰/۰۲**c**
روده	۱/۶۹±۰/۰۳**b**	۴/۱۶±۰/۰۲**b**

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵ ٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی)

تاثیر pH و دما بر فعالیت آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

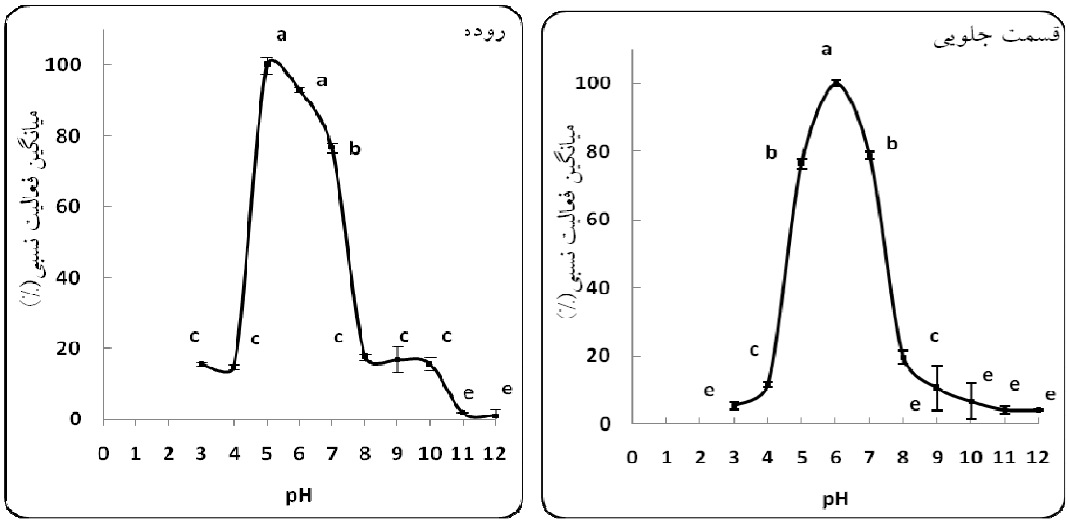
در این آزمایش pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا- گلوکوزیداز در قسمت جلویی ۶، در روده ۵ - ۶ و در غدد گوارشی ۶ -۷ به‌دست آمد (شکل ۲). همچنین pH بهینه برای فعالیت بتا-گلوکوزیداز موجود در قسمت جلویی ۵، روده ۶ و غدد گوارشی برابر۴ تا۶ محاسبه شد (شکل ۳). بهینه فعالیت آلفا-گلوکوزیداز در غدد گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات در pH های ۴ و ۵ و بتا گلوکوزیداز در pH های ۵ و ۶ محاسبه شده است (بی‌غم و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین در دو کفه ای *Perna viridis Linnaeus* آلفا-گلوکوزیداز دارای pH بهینه برابر با ۵/۵ بود (تئو و ساباپاتی[1]، ۱۹۹۰) که با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق هم‌خوانی دارد.

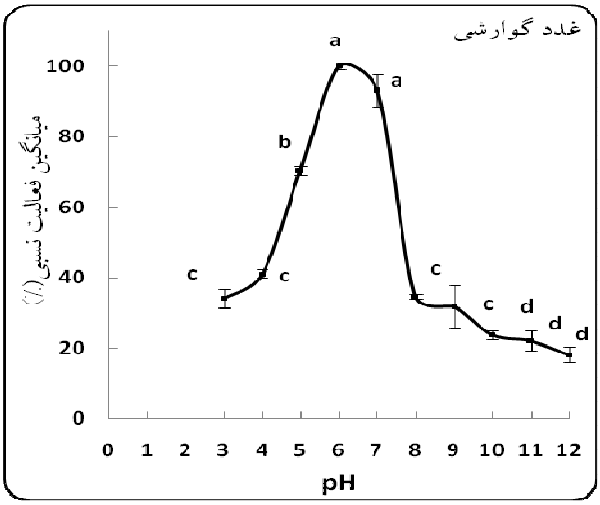
دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا- گلوکوزیداز در تمام قسمت‌های سیستم گوارشی ۶۰ درجه سلسیوس بود (شکل ۴). همچنین دمای بهینه آنزیم بتا-گلوکوزیداز در قسمت جلویی ۴۰ درجه سلسیوس، در روده ۵۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس و در غدد گوارشی ۵۰ درجه سلسیوس بدست آمد (شکل ۵). اگر چه واکنش‌ها توسط آنزیم-های پروتئینی انجام می‌شوند، هر آنزیم در دماهای متفاوتی ساختار سه بعدی خود را از دست می‌دهد. بنابراین واکنش‌های بیولوژیکی با افزایش دما سریع‌تر انجام می‌شوند تا در نقطه‌ای که آنزیم در آن از شکل اصلی خود خارج می‌شود و در آن نقطه فعالیت آنزیم به سرعت کاهش می‌یابد (زنگ و کوهن[2]، ۲۰۰۰).

مقدار pH و دمای بهینه برای آنزیم بتا-گلوکوزیداز حلزون *A. fulica* به ترتیب ۵/۵ و ۵۵ درجه سلسیوس گزارش شده است (هو و همکاران، ۲۰۰۸). همچنین در حلزون قهوه‌ای مرکبات آلفا-گلوکوزیداز درطیف دمایی ۳۰ تا ۴۵ درجه سلسیوس و بتا-گلوکوزیداز در طیف دمایی ۳۰ تا ۵۰ درجه سلسیوس فعالیت مناسبی از خود نشان دادند. دمای بهینه آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در غده گوارشی حلزون قهوه ای به ترتیب ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس گزارش شده است (بی‌غم و همکاران، ۱۳۸۹). سه نوع آلفا-گلوکوزیداز در کل بدن راب *Iolaus bilineata* وجود داشت و pH بهینه برای این سه نوع آلفا-گلوکوزیداز ۴/۵ تا ۵/۵ بود. همچنین دمای بهینه برای آلفا-گلوکوزیداز این راب ۵۵ و ۴۵ درجه سلسیوس به‌دست آمده است. در بین دماهای مختلف تا ۴۵ و ۵۵ درجه سلسیوس این آنزیم‌ها پایدار بودند. همچنین هر سه نوع آلفا-گلوکوزیداز در بین سوبستراهای مورد آزمون، مالتوز و مالتو-

1 - Teo & Sabapathy

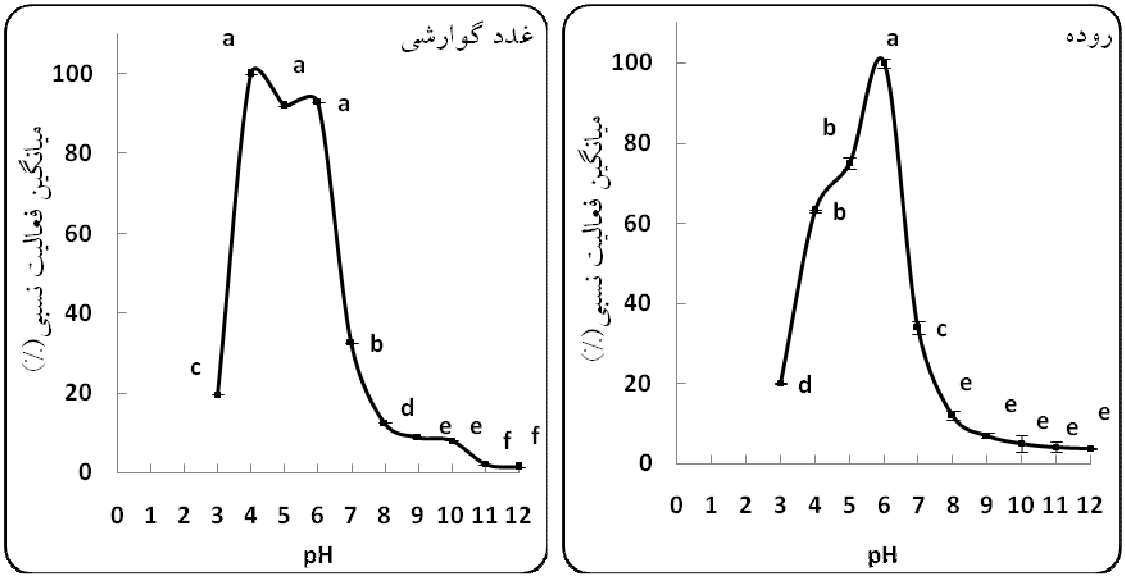
2 - Zeng & Cohen

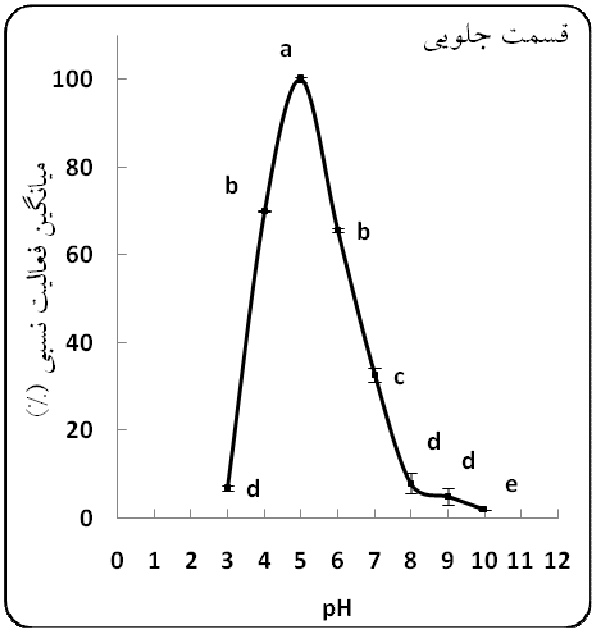




شکل ۲- اثر pH **روی میانگین فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوزیداز قسمت جلویی، غدد گوارشی و روده راب خاکستری مزرعه‌ای** *Agriolimax agrestis*

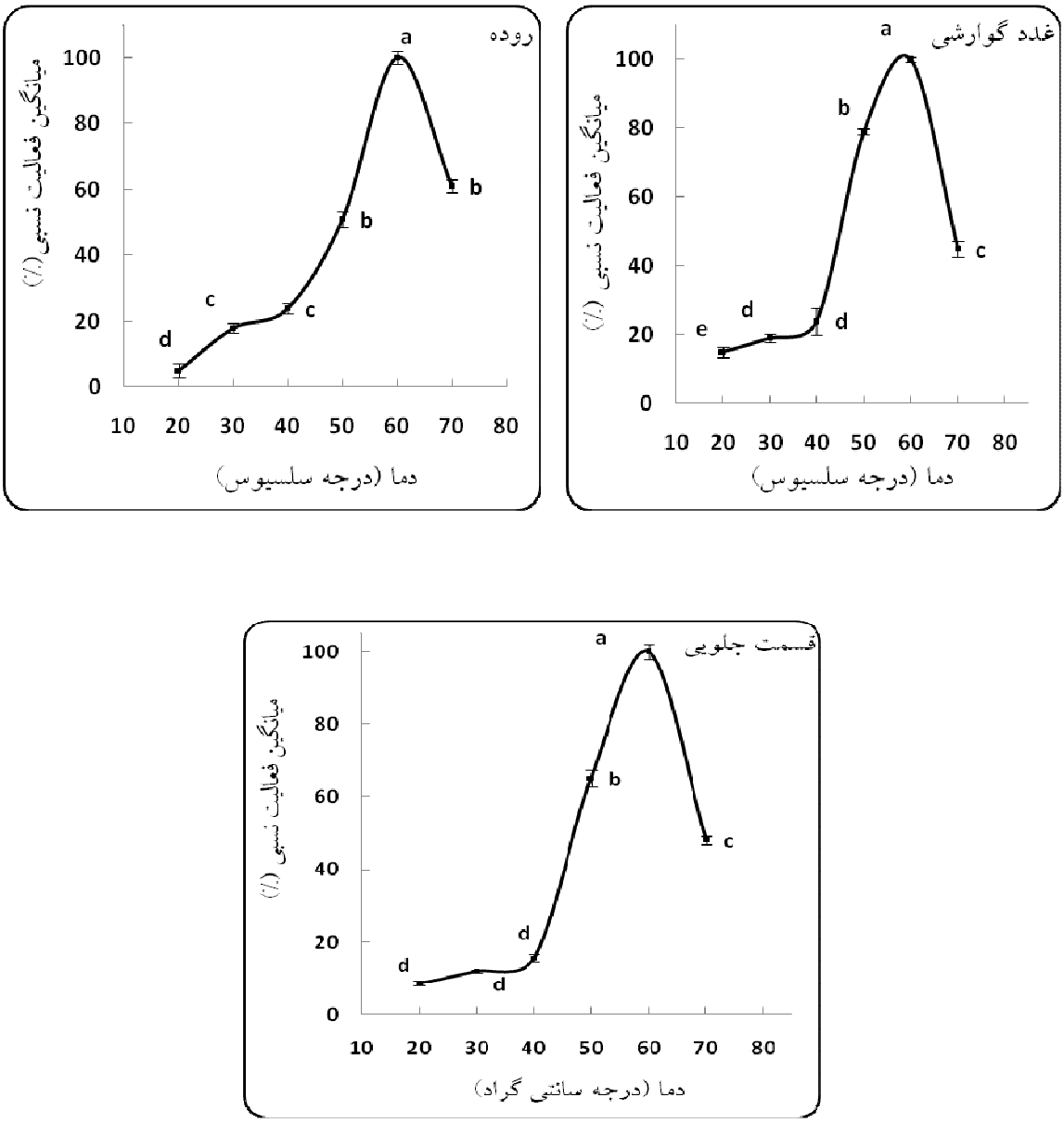
میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵ ٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی)





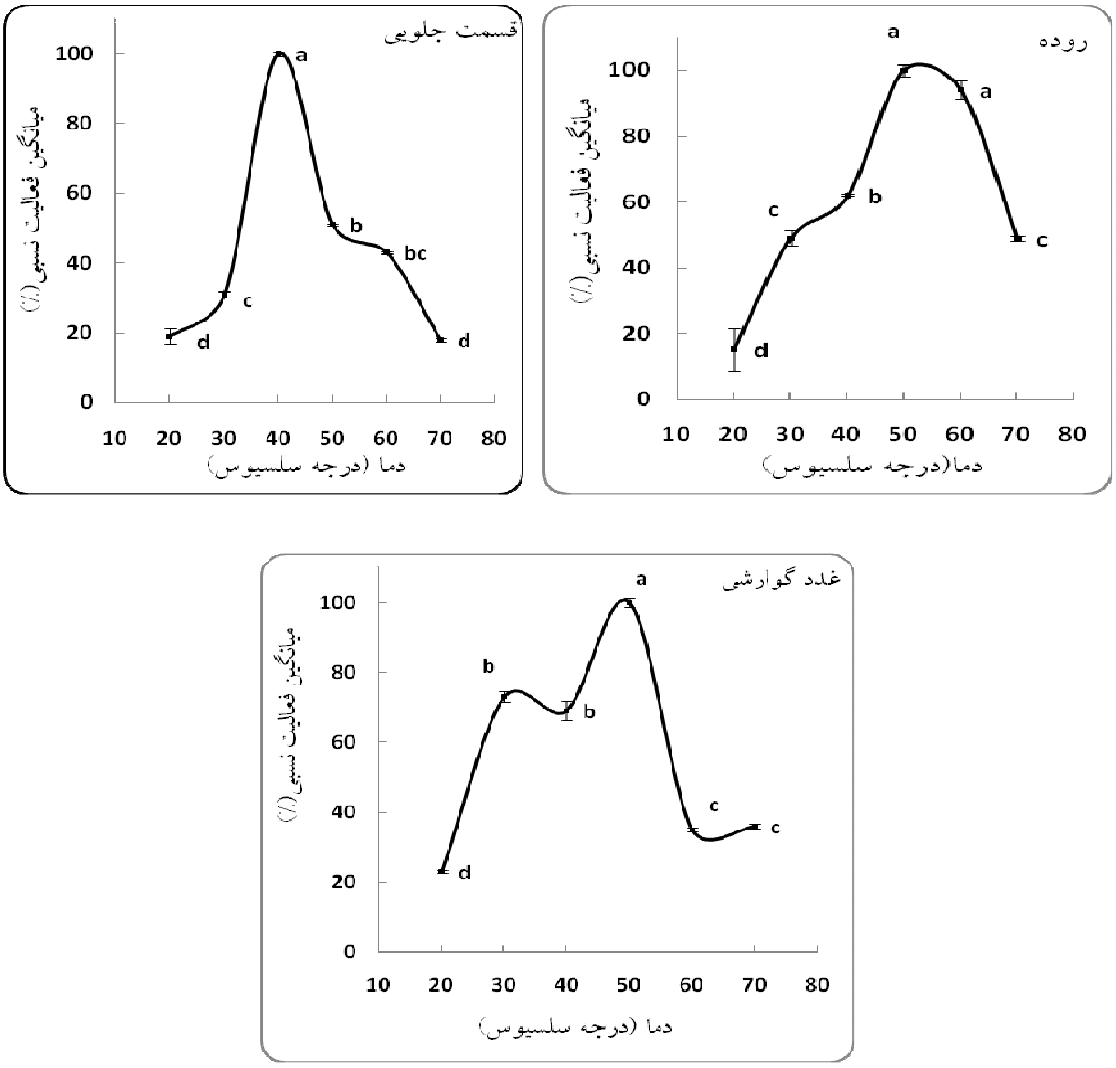
شکل ۳- اثر pH **روی میانگین فعالیت آنزیم بتا-گلوکوزیداز قسمت جلویی، غدد گوارشی و روده راب خاکستری مزرعه‌ای** *Agriolimax agrestis*

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی)



شکل ٤- اثر دما روی میانگین فعالیت آنزیم آلفا- گلوکوزیداز قسمت جلویی، غدد گوارشی و روده راب خاکستری مزرعه‌ای *Agriolimax agrestis*

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی)



شکل ۵- اثر دما روی میانگین فعالیت آنزیم بتا- گلوکوزیداز قسمت جلویی، غدد گوارشی و روده راب خاکستری مزرعه‌ای *Agriolimax agrestis*

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی)

الیگوساکاریدها را به آسانی هیدرولیز کردند، در حالی که ایزومالتوز را به طور ضعیف هیدرولیز نمودند. اثر pH روی آنزیم‌های آمیلاز، کیتیناز و سلولاز موجود در چینه دان و غدد بزاقی حلزون موز (*Ariolimax columbianus* (Stylommatophora: Arionidae)) و حلزون *A. ater* بررسی شد و نتایج نشان داد که بتاگلوکاناز (سلیولاز، سلولاز و کیتیناز) و آلفا-گلوکاناز (آمیلاز) این حلزون تحت شرایط اسیدی (pH بین ۵ تا ۷) بیشترین فعالیت را داشت. همچنین فعالیت ویژه این آنزیم‌ها در *A. ater* بیشتر از فعالیت آنها در *A. columbianus* بود (جیمز و همکاران[1]، ۱۹۹۷).

مقدار pH بهینه و دمای بهینه آنزیم گلوکوزیداز خالص شده از *A. fulica* به ترتیب ۵ و ۵۰ درجه سلسیوس گزارش شده است (هو و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین pH و دمای بهینه برای آنزیم بتاگلوکوزیداز

1 - James *et al.*

حلزون *A. fulica* ۵/۵ و ۵۵ درجه سلسیوس بدست آمده است (هو و همکاران، ۲۰۰۸).

اندازه‌گیری پارامترهای K_m و V_{max} آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

مقدار K_m و V_{max} آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در قسمت‌های مختلف سیستم گوارشی در جدول ۲ آمده است. نتایج این تحقیق نشان داد که مقدار K_m آنزیم آلفا- گلوکوزیداز در قسمت‌های جلویی دستگاه گوارش، غدد گوارشی و روده اختلاف معنی داری با یکدیگر نشان ندادند. در حالی که میزان K_m بتا-گلوکوزیداز غدد گوارشی بالاتر از K_m بتا-گلوکوزیداز قسمت جلویی و روده بود. این نشان دهنده این نکته است که میزان گیرایی بتا-گلوکوزیداز موجود در غدد گوارشی نسبت به سوبسترای p-nitrophenol ß-D- glucopyranosid کمتر از بتا-گلوکوزیداز موجود در قسمت جلویی و روده بود. همچنین نتایج نشان داد که آلفا-گلوکوزیداز این آفت در مقایسه با بتاگلوکوزیداز گیرایی بیشتری به سوبسترای خود نشان داد (جدول ۲). اندازه‌گیری پارامترهای سینتیکی آنزیم بتا-گلوکوزیداز حلزون بزرگ آفریقایی (*A. achatina*) با استفاده از غلظت‌های ۰/۰۴ تا ۰/۲ میلی مولار سوبسترای پی نیتروفنل-دی-گلوکوپیرانوزید نشان داد که K_m این آنزیم ۰/۲ میلی مولار بود (اکپون و اوموه[1]، ۲۰۰۴). همچنین میزان K_m گزارش شده برای این حلزون با استفاده از سوبسترای ارتو-نیتروفنل بتا-دی-گلوکوپیرانوزید (محاسبه شده با استفاده از غلظتهای ۰/۱ تا ۱۰ میلی مول) ۷ میلی مول بود. مقدار K_m بدست آمده برای *A. fulica* با استفاده از سوبسترای پی-نیتروفنیل بتا دی- گلوکوپیرانوزید، ۰/۲۲۴ میلی مولار گزارش شده است (هو و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج ما نشان داد که میزان K_m آنزیم بتا-گلوکوزیداز در راب *A. agrestis* و *A. fulica* بیشتر از حلزون بزرگ آفریقایی بود. مقدار K_m و V_{max} برای آلفا-گلوکوزیداز حلزون قهوه‌ای مرکبات به ترتیب ۹/۸۴ میلی مولار و ۰/۱۱ میلی مولار بر دقیقه گزارش شده است. همچنین مقدار K_m و V_{max} برای بتاگلوکوزیداز غده گوارشی این آفت به ترتیب ۱۰/۴۸ میلی مولار و ۰/۰۴۲ میلی مولار بر دقیقه بدست آمده است (بی‌غم و همکاران، ۱۳۸۹) که مقادیر این پارامترها بالاتر از K_m آنزیم‌های آلفا-گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز غدد گوارشی راب *A. agrestis* بود که این تفاوت می تواند ناشی از تفاوت گونه و ایزوفرمها باشد. نسبت V_{max}/K_m آلفا-گلوکوزیداز غدد گوارشی بالاتر از قسمت جلویی و روده بود که نشان دهنده کاراتر بودن این آنزیم در غدد گوارشی است. همچنین نسبت V_{max}/K_m آنزیم بتا-گلوکوزیداز در قسمت جلویی بالاتر از غدد گوارشی و روده به‌دست آمد.

آنالیز زایموگرامی آلفا- گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز

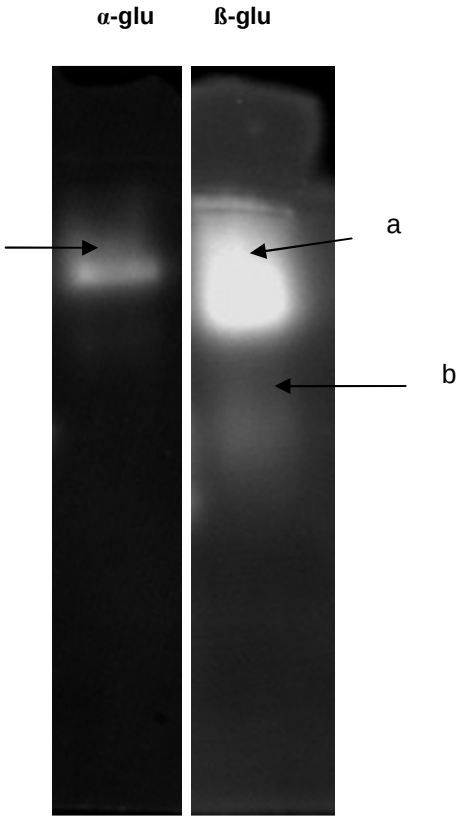
نتایج زایموگرام نشان داد که دو ایزوفرم از آنزیم-های بتا گلوکوزیداز در سه قسمت جلویی، غدد گوارشی و روده راب *A. agrestis* وجود داشت که یکی از ایزوفرم‌ها بسیار فعال‌تر از ایزوفرم دیگر بود. همچنین نتایج زایموگرام نشان داد که یک ایزوفرم از آلفا-گلوکوزیداز در سیستم گوارشی راب *A. agrestis* موجود بود (شکل ۶). نشان داده شده‌است

1 - Akpon & Umoh

جدول ۲- پارامترهای سینتیکی آنزیم‌های آلفا- گلوکوزیداز و بتا-گلوکوزیداز در قسمت‌های مختلف سیستم گوارشی راب خاکستری مزرعه‌ای *Agriolimax agrestis*

	آلفا-گلوکوزیداز			بتا-گلوکوزیداز		
	K_m (mM)	V_{max} (µmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m	K_m (mM)	V_{max} (µmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m
قسمت جلویی دستگاه گوارش	۲/۴۴±۰/ ۱ b	۴/۴۶±۰/۰۹ a	۱/۸۲	۱/۲۴±۰/۰۵ a	۵/۶±۰/۱ a	۴/۵۱
غدد گوارشی	۳/۲۸±۰/۱۵ a	۶/۶۲±۱/۲ b	۲/۰۱	۰/۹۴±۰/۰۳ a	۲/۹۱±۰/۰۸ b	۲/۲۳
روده	۱/۴۴±۰/۰۶ c	۱/۲۹±۰/۰۲ c	۰/۸۹	۱/۱۷±۰/۰۷ a	۳±۰/۰۶ c	۲/۵۶

میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون توکی).



شکل ٦- آنالیز زایموگرام آنزیم‌های آلفا- گلوکوزیداز (α-glu) و بتا- گلوکوزیداز (ß-glu) غدد گوارشی راب خاکستری مزرعه‌ای *Agriolimax agrestis* .

در هر چاهک ۱/۹۲ میلی گرم پروتئین بر میلی لیتر بار گذاری شد.

که آنزیم بتا-گلوکوزیداز در سیستم گوارشی *A. achatina* به صورت ۲ فرم (بتا-گلوکوزیداز C با وزن ملکولی ۸۲۰۰۰ و بتا-گلوکوزیداز D با وزن ملکولی ۴۱۰۰۰ دالتون) وجود داشت. این فرم‌های آنزیمی دارای pH بهینه ۵-۵/۶ بودند. ثابت میکائیلیس و پایداری این آنزیم‌ها با افزایش پیچیدگی ملکولی نیز افزایش یافت (اومزوریک، ۱۹۷۶). دو نوع بتا-گلوکوزیداز در دستگاه گوارش حلزون‌های فعال *A. achatina* یکی با وزن ملکولی ۸۲۰۰۰ و دیگری با وزن ملکولی ۴۱۰۰۰ دالتون شناسایی شده است، در حالی که در دستگاه گوارش حلزون های تابستان گذران[1] فقط گلوکوزیداز با وزن ملکولی پایین وجود داشت (اومزوریک، ۱۹۷۶).

بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که آلفا-گلوکوزیداز و بتا گلوکوزیداز در قسمت‌های جلویی دستگاه گوارش، غدد گوارشی و روده راب *A. agrestis* وجود داشت. بهینه فعالیت آلفا- گلوکوزیداز و بتا- گلوکوزیداز در pHهای کمی اسیدی تا خنثی بدست آمد. آلفا-گلوکوزیداز و بتا- گلوکوزیدازهای دستگاه گوارشی دارای دمای بهینه ۴۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس بودند. مقدار $\mathbf{K_m}$ آنزیم آلفا- گلوکوزیداز در قسمت‌های جلویی دستگاه گوارش، غدد گوارشی و روده اختلاف معنی داری با یکدیگر نشان نمی‌دهد. با توجه به اینکه در آزمون‌های زایموگرام نشان داده شده بود که یک ایزوفرم از آلفا-گلوکوزیداز در دستگاه غدد گوارشی این جانور وجود داشت، نتایج این تحقیق نشان داد که این آنزیم به احتمال زیاد در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش دارای یک ایزوفرم بود. در حالی که میزان K_m بتا-گلوکوزیداز غدد گوارشی بالاتر از K_m بتا-گلوکوزیداز قسمت جلویی و روده بود و دلیل این اختلاف شاید ناشی از این باشد که دو ایزوفرم از این آنزیم در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش وجود داشت و شاید بخشی از این اختلاف مربوط به این ایزوفرم‌ها باشد. نتایج زایموگرام نشان داد که آلفا-گلوکوزیداز و بتا- گلوکوزیداز غدد گوارشی به ترتیب دارای یک و دو ایزوفرم بود. با توجه به اینکه این دو آنزیم در راب *A. agrestis* وجود داشت و از فعالیت نسبتا بالایی برخوردار بودند، بنابراین به نظر می رسد که این آنزیم‌ها اهداف خوبی برای بررسی بازدارنده های کربوهیدرازی به منظور تولید گیاهان مقاوم به این آفت باشند.

سپاس گزاری

از سرکار خانم دکتر احمدی عضو هیات علمی موسسه گیاهپزشکی کشور جهت شناسایی نمونه‌ها تشکر و قدردانی می‌شود.

1 - Aestivating snails

منابع

۱. بی‌غم، م.، حسینی نوه، و.، حسینی نوه، ف. و نوذری، ج. ۱۳۸۹. بررسی فعالیت گلوکوزیدآزها وآلفا- آمیلاز غده گوارشی حلزون قهوه ای مرکبات *Caucasotachea lencoranea* (Stylommatophora: Helicidae). مجله دانش گیاهپزشکی. ۴۱(۲): ۲۷۱-۲۸۱.

2. Akpon, E.J., and Umoh, I.B. 2004. Inhibitory activity of seed extract from *Picralima nitida*, (Staph) on ß-D-glucosidase. Biokemistri, 16(2): 72-78.

3. Barker, G.M. 2001. The biology of terrestrial molluscus. Cromwell Press, pp: 558

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

5. Colas, B. 1980. Kinetic studies on β- fucosidase of *Achatina balteata*. Biochimica et Biophysica Acta, 613: 448-458.

6. Coles, G.C. 1969. Isoenzymes of snail livers-I. Hydrolysing enzymes and peroxidase. Comparative Biochemistry and Physiology, 29(1): 403-411.

7. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences, 12: 404- 427.

8. Dimitriadis, V.K. 2001. Structure and function of the digestive system in Stylommatophora. In Barker, G.M. (ed), The biology of terrestrial molluscs. CABI Publishing. pp: 237-258.

9. Esen, A. 1993. Beta glucosidase: biochemistry and molecular biology. American Chemical Society of Washington Press. pp: 250.

10. Evans W.A.L., and Jones**,** E.G. 1962**.** Carbohydrates in the alimentary tract of the slug *Arion ater* L. Comparative Biochemistry and Physiology, 5(3): 149-160.

11. Flari, V., and Charrier, M. 1992. Contribution to the study of carbohydrases in the digestive tract of the edible snail *Helix lucorum* L. (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) in relation to its age and its physiological state. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 102 (2): 363-372.

12. Flari, V., and Lazaridou-Dimitriadou, M. 1996. Evolution of digestion of carbohydrates in the separate parts of the digestive tract of the edible snail *Helix lucorum* (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) during a complete 24-hour cycle and the first days of starvation. Journal of Comparative Physiology B, 165(7): 580-591.

13. George, F., Back, E.J., and Gatehouse A.M.R. 2008. Characterisation of midgut digestive proteases from the maize stem borer *Busseola fusca* Derick. Pest Management Science, 64:1151–1158.

14. Ghadamyari, M., Hosseininaveh, V., and Sharifi, M. 2010. Partial biochemical characterization of alpha and beta glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.: Pyralidae). Comptes Rendus Biologies, 333(3):197- 204.

15. Hu, Y., Luana, H., Hao, D., Xiao, H., Yang, S., and Yang, L. 2007. Purification and characterization of a novel ginsenoside-hydrolyzing ß-D-glucosidase from the China white jade snail (*Achatina fulica*). Enzyme and Microbial Technology, 40: 1358–1366.

16. Hu, Y., Luan, H., Zhou, K., Ge, G., Yang, S., and Yang, L. 2008. Purification and characterization of a novel glycosidase from the china white jade snail (*Achatina fulica*) showing transglycosylation activity. Enzyme and Microbial Technology, 43: 35–42.

17. James, R., Nguyen, T., Arthur, W., Levine, K., and Williams, D.C. 1997. Hydrolase (β-glucanase, α-glucanase and protease) activity in *Ariolimax columbianus* (banana slug) and *Arion ater* (garden slug). Comparative Biochemistry and Physiology B, 118: 275–283.

18. Leparoux, S., Padrines, M., Placier, G., and Colas, B. 1997. Characterization of a strictly specific acid β- galactosidase from *Achatina achatina*. Biochimica Biophysica Acta, 1336: 522-532.

19. Leparoux, S., Fortun, Y., and Colas, B. 1994. Synthesis of β-galactosyl– (hydroxy amino acid) derivatives usings β–galactosidase acivity of *Achatina achatina* digestive juice. Biotechnology Letters, 16: 677-682.

20. Sharma, H.C., and Ortiz, R. 2000. Transgenics, pest management, and the environment. Current Science, 79: 421–437.

21. Siegentaler, U. 1977. Eine einfache & rasche methode zur bestimmung de alpha–glucosidase (saccharase) in honing. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-untersuchung un Hygiene, 68: 251– 258.

22. Teo, L.H., and Sabapathy, U. 1990. Preliminary report on the digestive enzyme present in the digestive gland of *Perna viridis*. Marine Biology, 106: 403– 407.

23. Terra, W.R., and Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzym properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology, 109(1): 1-62.

24. Tokuda, G., Saito, H., and Watanabe, H. 2002. A digestive β-glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes koshunensis* (Shiraki): distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by *5*'- and *3*'-RACE amplifications with degenerate primers. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 32(12): 1681- 1689.

25. Umezurike, G.M. 1976. The beta-glucosidase in the gut contents of the snail *Achatina achatina*. Biochemical Journal, 157(2): 381-387.

26. Yamasaki, Y., and Konno, H. 1998. Purification and properties of α- glucosidase fom slugs. Bulletin of the Research Institute for Bioresources Okayama University, 5: 121-127.

27. Zeng, F., and Cohen. A.C. 2000. Partial characterization of α-amylase in the salivary glands of *lygus hesperus* and *L. Lineolaris*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 126: 9-16.