جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۸۹ (۲۸۱-۲۷۱)

بررسی فعالیت گلوکوزیدآزها و آلفا آمیلاز غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات
Caucasotachea lencoranea (Stylommatophora: Helicidae)

مهدیه بی‌غم[۱]*، وحید حسینی نوه[۲]، فاطمه حسینی نوه[۳] و جاماسب نوذری[۴]
۱، ۲، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیاران پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳، مربی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولیعصر رفسنجان
(تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۱۰ - تاریخ تصویب: ۸۹/۴/۱)

چکیده

حلزون قهوه‌ای مرکبات *Caucasotachea lencoranea* Mousson یکی از آفات مرکبات در استانهای شمالی ایران می‌باشد. به منظور کنترل بهتر این حلزون و بهبود استراتژی‌های مدیریت آن، شناخت وضعیت آنزیم‌های گوارشی این جانور دارای اهمیت می‌باشد. حلزون‌ها از باغات مرکبات شمال کشور جمع‌آوری شدند و کربوهیدازهای آلفا گلوکوزیداز، بتا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز غده گوارشی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور آماده‌سازی عصاره آنزیمی از حلزون قهوه‌ای مرکبات، حلزون‌ها تشریح و غده گوارشی برداشته شد. با بررسی‌های آنزیمی صورت گرفته وجود فعالیت آلفاگلوکوزیداز، بتا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز در غده گوارشی آفت مذکور مشخص گردید. بهینه فعالیت آلفا گلوکوزیداز در pHهای ۴ و ۵، بتا گلوکوزیداز در pHهای ۵ و ۶ مشخص گردید. همچنین دمای بهینه برای آلفا گلوکوزیداز ۳۵ و برای بتاگلوکوزیداز ۴۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. مقدار pH بهینه برای فعالیت آلفا آمیلاز برابر ۲ و دمای بهینه آن ۴۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. مقدار k_m و v_{max} برای آلفا گلوکوزیداز به ترتیب ۹/۸۴ میلی‌مولار و ۰/۱۱ میلی‌مولار بر دقیقه به دست آمد. همچنین مقدار k_m و v_{max} برای بتا گلوکوزیداز حاصل از غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات به ترتیب ۱۰/۴۸ میلی‌مولار و ۰/۰۴۲ میلی‌مولار بر دقیقه محاسبه گردید.

واژه‌های کلیدی: *Caucasotachea lencoranea*، غده گوارشی، آلفا گلوکوزیداز، بتا گلوکوزیداز، آلفا آمیلاز.

مقدمه

گونه‌های مختلف نرمتنان از رده شکم پایان[۱] عامل خسارت نسبتاً زیادی روی محصولات مختلف کشاورزی و انتقال بیماری‌های انگلی به انسان و دام هستند (Mansorean, 1992). از این میان فعالیت حلزون قهوه‌ای مرکبات در شمال کشور به علت شرایط مناسب اقلیمی، حرارت معتدل و رطوبت نسبی بالا بسیار زیاد بوده و از آفات اصلی مرکبات به‌شمار می‌آید (Mierzaea, 1973). به کارگیری سموم شیمیائی در دهه‌های گذشته به منظور حفظ محصول در مقابل گونه‌های آسیب‌رسان

1. Gasteropoda

* نویسنده مسئول: مهدیه بی‌غم تلفن: ۰۹۱۳-۲۴۲۸۳۰۷
E-mail: mahdbigham@gmail.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

حلزون‌ها به دلیل اعتماد کشاورزان به طور مکرر مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده مداوم از این سموم موجب ایجاد مقاومت حلزون‌ها تأثیرات سوء آنها بر روی دشمنان طبیعی، دوام و پایداری آنها در محیط زیست و نهایتاً برهم خوردن تعادل اکوسیستم به نفع حلزون زیان‌آور گردیده است (Ahmadi & Arbabi, 2001). بعد از چندین سال تلاش در زمینه مدیریت تلفیقی این آفت بااستفاده از راهکارهائی مثل کنترل شیمیائی، فیزیکی، زراعی و بیولوژیک و عدم احراز نتیجه قابل قبول باید راهکار جدید را جستجو کرد. در این زمینه حلقه گمشده مدیریت این آفت می‌تواند استفاده از ارقام مقاوم باشد. تولید ارقام مقاوم دارای ژن‌های کدکننده مهارکننده های آنزیمی از جدیدترین راهکارهای موجود می‌باشد. هرچند ایجاد مقاومت در گیاه امری مشکل و تدریجی است ولی با پیدایش تکنیک انتقال ژن این امر تاحدی تسهیل شده است. چنانچه امروزه کاربرد گیاهان ترانس ژن شده مقاوم به آفات امری امکان‌پذیر است (Sharma *et al.*, 2000). در این میان مطالعه آنزیم‌های گوارشی این آفت اهمیت بسیار زیادی پیدا می‌کند چون می‌توانند به عنوان هدفی برای کنترل آفت مذکورمورد توجه قرار گیرند. به این منظور درک کامل فیزیولوژی دستگاه گوارش حلزون قهوه‌ای مرکبات ضروری است تا آناتومی و فیزیولوژی گوارش آن به خوبی شناخته شود.

سیستم گوارش نرمتنان راسته استیلوماتوفورا[1] به چندین قسمت تقسیم شده و دارای نقش‌های: ۱) دریافت، هدایت و ذخیره غذا؛ ۲) هضم و جذب مواد غذایی؛ ۳) تشکیل مواد دفعی می‌باشد. در واقع سیستم گوارشی در این راسته شامل کانال گوارشی[2] و قسمت‌های مرتبط با آن از جمله توده دهانی[3]، غدد بزاقی، مری، معده، غده گوارشی[4]، روده، رکتوم و مخرج می‌باشد. غده گوارشی که معمولاً به عنوان غده معده میانی و هپاتوپانکراس[5] و جگر[6] شناخته شده است، بزرگترین اندام در بدن افراد راسته استیلوماتوفورا می‌باشد که از دولب تشکیل شده است (Barker, 2001). غده گوارشی دارای حجم زیادی بوده و تقریباً تمام امعاء و احشا را فراگرفته و از دو لب قهوه‌ای رنگ یا لب‌های کبدی تشکیل شده است که توسط دو کانال هپاتوپانکراس به لوله گوارش مربوط می‌شود (Mirmoaedy, 2008). غده گوارشی در تولید آنزیم‌های گوارشی، اندوسیتوز مواد غذایی، ذخیره غذا و دفع نقش دارد. مطالعات نشان می‌دهد که اپیتلیوم غده گوارشی در شکم پایان خشکی زی از سه نوع سلول شامل سلول‌های گوارشی، سلول‌های کلسیم و سلول‌های دفعی تشکیل شده است. سلول‌های گوارشی فراوان‌ترین نوع سلول‌ها در غده گوارشی راسته استیلوماتوفورا بوده و دارای تنوع زیادی در شکلشان هستند که با عملکرد متنوع آنها در ارتباط می‌باشد بنابراین غده مذکور نقش مهمی در تولید آنزیم‌های گوارشی دارد (Barker, 2001). نیازهای غذائی این راسته به پروتئین، چربی، کربوهیدارت، ویتامین و مواد معدنی به طور دقیقی شناخته نشده است (Forming, 1954). اما به طور قطع تنوع در مقدار لیپید، کربوهیدرات، پروتئین و فیبر می‌تواند در رشد آنها نقش اساسی و مهمی داشته باشد (Jess & Markers, 1989). پس وجود آنزیم‌های گوارشی به منظور هیدرولیز کامل این گروه از موادغذایی و تبدیل آنها به مونومرها اجتناب‌ناپذیر است.

در این پژوهش با توجه به اهمیت حلزون‌های قهوه‌ای مرکبات در استانهای شمالی کشور که یکی از اصلی‌ترین کانونهای کشت مرکبات در کشور محسوب می‌گردد، سعی در بررسی ویژگی‌های بیوشیمیائی آنزیم‌های آلفا گلوکوزیداز، بتا گلوکوزیداز و همچنین آلفا آمیلاز ترشح شده توسط غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات شده است. علیرغم کارهای بسیاری که در زمینه بررسی آنزیم‌های گوارشی در حشرات انجام شده است (Baker, 2001; Ferreira *et al.*, 1999). ولی با توجه به بررسی منابع انجام شده تاکنون هیچ

1. Stylommatophora
2. Alimentary canal
3. Buccal mass
4. Digestive gland
5. Hepatopancrease
6. Liver

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مطالعه‌ای روی میزان فعالیت این آنزیم‌ها در غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات انجام نشده است و این پژوهش اولین مورد آن خواهد بود به امید اینکه بتوان در تحقیقات تکمیلی بعدی به ارقام مقاوم با اثر قابل توجه روی سیستم آنزیم‌های گوارشی آفت دست یافت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسائی حلزون قهوه‌ای مرکبات

حلزون مذکور در خردادماه از باغات مرکبات شهرستان تنکابن و صومعه‌سرا واقع در استانهای مازندران و گیلان جمع‌آوری گردید. حلزون‌های جمع‌آوری شده توسط بخش تحقیقات جانورشناسی مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی تهران شناسائی گردید.

تشریح و جداسازی غده گوارشی

به منظور تشریح جانور، پس از جداکردن صدف آن به وسیله یک قیچی قوی و تیز، درون تشتک تشریح حاوی آب مقطر سرد، غده گوارشی که در انتهای قسمت مارپیچ بدن قرارگرفته است با چند شیار عمودی جدا گردید. غده‌های گوارشی جداشده درون میکروتیوب‌هایی حاوی آب مقطر سرد ریخته شده و برای استفاده‌های بعدی، بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه عصاره آنزیمی از غده گوارشی

غدد گوارشی با یک هموژنایزر دستی شیشه‌ای در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هموژنایز گردیدند. هموژنیت‌ها با دستگاه سانتریفوژ هتیچ (مدل 32R) با سرعت ۱۶۰۰۰×g و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. بعد از این مرحله رونشین به عنوان منبع آنزیمی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز

تعیین فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز بر اساس روش Siegentaler (1977) و Low *et al.* (1986) با اندکی تغییر در آن روش‌ها انجام شد. بنابراین مقدار هیدرولیز سوبستراهای pNαG[1] برای آلفا گلوکوزیداز و pNβG[2] برای اندازه‌گیری فعالیت بتاگلوکوزیداز به دست آمد. اندازه‌گیری درون بافر استات-فسفات-بورات سدیم با حجم واکنش برابر با ۱۰۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۵ میکرولیتر سوبسترا با غلظت ۵ میلی‌مولار و ۸۵ میکرولیتر بافر با pH برابر با ۶ انجام شد. واکنش با افزایش ۱۰۰ میکرولیتر محلول یک نرمال هیدروکسید سدیم متوقف و پارانیترفنل تولید شده به وسیله دستگاه میکروپلیت ریدر مدل (Elx 808) در طول موج ۴۰۵ نانومتر و در فواصل زمانی ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. در این آزمایش از همه ترکیبات به جز آنزیم برای بلانک استفاده شد.

اندازه‌گیری pH بهینه آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز

در این آزمایش از بافر مورد نظر با مولاریته ۰/۰۴ با دامنه pH از ۲ تا ۱۲ استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۸۵ میکرولیتر بافر، ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی ۵ میلی‌مولار بود، واکنش با افزودن هیدروکسید سدیم یک مولار بعد از مدت زمان ۱۵ دقیقه متوقف گردید و جذب توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری دمای بهینه فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز

برای بررسی اثر دما بر فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز، واکنش با مقدار ۱۰ میکرولیتر آنزیم، ۸۵ میکرولیتر بافر استات-فسفات-بورات سدیم ۰/۰۴ مولار با pH برابر با ۵ برای آلفاگلوکوزیداز و pH برابر با ۶ برای بتاگلوکوزیداز در دماهای مختلف (۲۰، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. بعد از مدت ۳ دقیقه، به هر یک از تیمارها ۵ میکرولیتر سوبسترای اختصاصی آنزیم‌های آلفا و بتاگلوکوزیداز افزوده شد. ازاین لحظه به بعد، واکنش بمدت ۲۰ دقیقه در همان دما انجام گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم اضافه شده تا واکنش متوقف شود. جذب مخلوط واکنش در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

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

برای تعیین پارامترهای K_m و V_{max} آنزیم‌های مورد مطالعه از روش Bisswanger (2002) با اعمال تغییراتی

1. 4-Nitrophenyl α-D-glucopyranoside
2. 4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside

انجام شد. ابتدا غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۳، ۵، ۱۰ میلی‌مولار از سوبسترا تهیه شد. در مرحله بعد واکنش با اضافه کردن۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی به ۱۵ میکرولیتر سوبسترا با غلظت‌های تعیین شده و ۸۵ میکرولیتر بافر شروع شد. در نهایت به هر یک از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم اضافه شد و جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر در فواصل زمانی ۳ ، ۶، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ دقیقه اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری pH بهینه آنزیم‌های آلفا آمیلاز

فعالیت آلفا آمیلاز با استفاده از روش Baker (1991) با اندکی تغییر سنجیده شد. آزمایش در pHهای مختلف (۲ تا ۱۲) با بافر یونیورسال استات-فسفات-بورات سدیم انجام گرفت. بدین منظور در هر کدام از تیمارها ۱۵ میکرولیتر از آنزیم و ۵۰ میکرولیتر بافر با pH مورد نظر و ۱۵ میکرولیتر از سوبسترا (نشاسته ۱٪) مخلوط گردید. بعد از آنکه ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۳۰ درجه قرار گرفت ۸۰ میکرولیتر معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید به هر تیمار به منظور متوقف کردن واکنش اضافه گردید. تیمارها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. سپس از هر تکرار به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در پلیت ریخته و با دستگاه میکروپلیت ریدر جذب در ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری دمای بهینه آلفا آمیلاز

برای بررسی اثر دما بر روی فعالیت آلفا آمیلاز مقدار ۱۵ میکرولیتر آنزیم با ۵۰ میکرولیتر بافر مورد نظر با pH برابر با ۲ مخلوط شده و در دماهای مختلف (۲۰، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۶۰ و ۷۰) درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از طی ۳ دقیقه، به هر یک از تیمارها ۱۵ میکرولیتر محلول نشاسته یک درصد افزوده شد. از این لحظه به بعد، واکنش برای مدت ۳۰ دقیقه در همان دما قرار گرفت. سپس ۸۰ میکرولیتر دی‌نیترو سالیسیلیک اسید اضافه شده تا واکنش متوقف شود و به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. بعد از سرد شدن نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر جذب آن اندازه‌گیری شد.

تجزیه داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزارهای STATGRAPHICS، Sigmaplot، Hyper32 انجام گردید. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

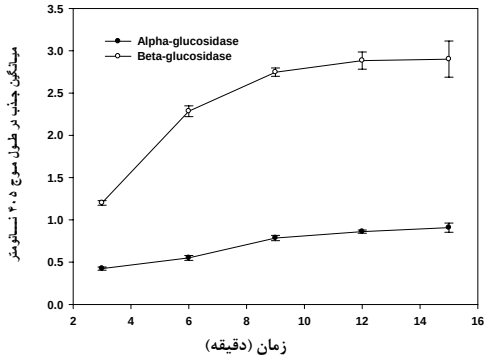
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز

فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات بر روی سوبسترای PNαG (سوبسترای اختصاصی برای آلفا گلوکوزیداز) و PNβG (سوبسترای اختصاصی برای بتا گلوکوزیداز) اندازه‌گیری شد (شکل۱). همانگونه که مشخص است سرعت اولیه فعالیت آنزیمی برروی دو سوبسترا متفاوت است. بیشترین سرعت هیدرولیز توسط عصاره آنزیمی برروی سوبسترایPNβG با سرعت اولیه (۰/۱۳۳ تغییر جذب در دقیقه) و کمترین آن روی سوبسترای PNαG با سرعت اولیه (۰/۰۴۲ تغییر جذب در دقیقه) مشاهده شد ($P<0/01$). با توجه به هیدرولیز دو سوبسترای PNαG و PNβG که به ترتیب سوبستراهای ویژه آلفا- و بتا گلوکوزیداز می‌باشند میتوان اظهار داشت که این دو آنزیم در عصاره غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات به مقدار قابل ملاحظه ای دیده می‌شوند.

آلفا گلوکوزیداز هیدرولیز باقی‌مانده α-۱ و ۴ گلوکزی از آریل گلوکوزیدها (نظیر p-nitrophenyl-α-D-glucoside، دی ساکاریدها یا الیگوساکاریدها) را کاتالیز می‌نماید. این آنزیم‌ها به فراوانی در موجودات یافت شده‌اند. در حالی که بتا گلوکوزیدازها هیدرولیز β-۴-۱ باقیمانده مونوساکاریدها از گلیکوزیدها را کاتالیز می‌نمایند (Terra *et al.*, 1994). بتاگلوکوزیدازها در همه گیاهان، جانوران، قارچ‌ها و باکتری‌ها وجود دارند (Esen, 1993). طبق مطالعات انجام شده حلزون‌های راسته استیلوماتوفورا نیز دارای گستره‌ای از آنزیم‌های گوارشی مخصوصاً کربوهیدرازها هستند، به عنوان مثال از ۳۰ نوع آنزیمی که در مجاری گوارشی خانواده Helicidae وجود دارد بیش از ۲۰ نوع از آنها جزء کربوهیدرازها می‌باشند (Barker, 2001). همچنین حلزون *Archachatina ventricosa* Gould (Stylommatophora:

(Achatinoidea در عصاره گوارشی خود دارای گروهی از گلیکوزیدازها می‌باشد. در میان این گروه از آنزیم‌ها می‌توان به سلولاز، گلوکوزیداز، فوکوزیداز، گلوکورونیداز و مانوزیداز اشاره نمود که تعداد زیادی از سوبستراهای مصنوعی و پلی ساکاریدهای گیاهی را هیدرولیز می‌کنند (Colas, 1980; Leparoux *et al.*, 1994; Leparoux *et al.*, 1997). حضور آنزیم‌های گوارشی کربوهیدرازی در *Tegula funebralis* Adams (Trochidae) که از جلبک‌ها تغذیه می‌کند نیز به اثبات رسیده است (Galli & Giese, 1959). تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره غده گوارشی *Arion alter* Linnae نیز قادر به هیدرولیز کربوهیدرات‌ها می‌باشد (Evans & Jones, 1962a). همچنین آنزیم β- ۱ و ۳- گلوکاناز که وزنی حدود ۳۸ کیلودالتون دارد، از غده گوارشی دوکفه‌ای *Patinopecten yessoensiss* Shell خالص‌سازی شده است (Kumagal *et al.*, 2008). Johnston & Freeman (2005) آنزیم بتا گلوکوزیداز و آلفا گلوکوزیداز را به ترتیب از دو سخت‌پوست *pterolisthes* و *Leptograpsus* جداسازی کردند (Kazazi, 2007).

وجود آلفا- و بتا گلوکوزیداز در دستگاه گوارش اغلب راسته‌های حشرات آفت نیز به اثبات رسیده است به طوری که این آنزیم‌ها نقش فیزیولوژیک مهمی را در روده میانی حشرات ایفا می‌کند از جمله می‌توان به وجود آنزیم‌های مذکور درسیستم گوارشی پشه *Aedes aegypti* Linne، ملخ *Abracris flavolineata* De Geer و *Eurygaster integriceps* Putan (Ferreira, 1999; Marinotli & James, 1990; Kazazi, 2007) و بسیاری دیگر از حشرات آفت اشاره کرد.



شکل ۱- فعالیت گلوکوزیدازی غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات روی دو سوبسترای ویژه آلفا و بتا گلوکوزیداز

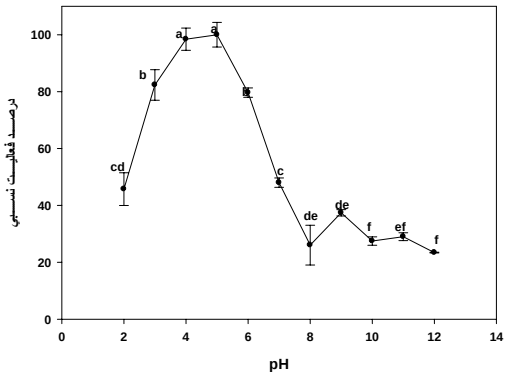
بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز

آزمایش اثر pH روی فعالیت آلفا و بتا گلوکوزیداز در طیف pH از ۲ تا ۱۲ انجام شد (شکل‌های ۲ و ۳). فعالیت آلفا گلوکوزیداز در pH برابر با ۴ و ۵ و بتا گلوکوزیداز در pH برابر با ۵ و ۶ بهینه می‌باشد. اما چنانچه در شکل مشهود است آلفا گلوکوزیداز در طیف pH ۲ تا ۷ و بتا گلوکوزیداز در طیف pH از ۳ تا ۷ فعالیت مناسبی از خود نشان می‌دهند. در آلفا گلوکوزیداز در pH برابر با ۲ و ۷ حدود ۵۰ درصد فعالیت بیشینه مشاهده می‌شود. در pHهای قلیائی ۱۰، ۱۱ و ۱۲ فعالیت آنزیمی بسیار کم و در آلفا گلوکوزیداز حدود ۳۰ درصد فعالیت بیشینه و در بتا گلوکوزیداز حدود ۱۰ درصد فعالیت بیشینه می‌باشد. این بررسی‌ها نشان می‌دهد که گلوکوزیدازها در غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات دارای فعالیت در محیط اسیدی هستند. براساس مطالعات Withaker (1994) محیط واکنش بر روی پیوندهای سوبسترا و آنزیم اثر می‌گذارد و شدت واکنش کاتالیتیکی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بنابراین هر آنزیمی با توجه به ساختار سه بعدی خود یک pH معینی را در واکنش با سوبسترا می‌پذیرد. همچنین مطالعات Zeng & Cohen (2000) نشان داد که در محیط‌های بسیار اسیدی و بسیار قلیائی عملاً آنزیم از فعالیت باز می‌ماند و به همین علت است که در pHهای خیلی بالا و پائین تأثیر آنزیم بر سوبسترا کاهش می‌یابد. از دیگر عواملی که در pH روده میانی و متعاقب آن بر فعالیت آنزیم اثر می‌گذارد، نوع غذا و pH آن می‌باشد، این عوامل ممکن است فعالیت آنزیم را تحت‌الشعاع قرار دهند. تاکنون گزارشات متنوع مبنی بر میزان pH بهینه برای فعالیت آنزیم‌های گوارشی انتشار یافته است. بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شد که فعالیت کربوهیدرازی دی گلوکزآمینیداز در دو سخت‌پوست *Euphausia superba* Dana و *Meganyctiphanes norvegica* Sars در pH بهینه حدود ۵ اتفاق می‌افتد (Spindler & Buchholz, 1988). همچنین با کاربرد سوبسترای ویژه آنزیم گلوکوآمینیداز در حلزون Linne

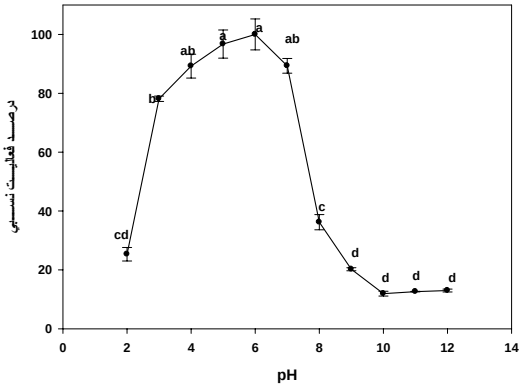
Helix pomatia حداکثر هیدرولیز در pH برابر با ۳/۵ به دست آمد (Neuberger & Rosalind, 1939). Teo & Sabapathy (1990) ثابت کردند که آلفا گلوکوزیداز در دو کفه‌ای *Perna viridis Linnaeus* دارای pH فعالیت بهینه برابر با ۵/۵ می‌باشد.

یکی از جنبه‌های آنزیم‌های آلفا- و بتا گلوکوزیداز روده میانی حشرات pH بهینه آنهاست که دارای تنوع در حشرات مختلف می‌باشد. اغلب آلفا- و بتا گلوکوزیدهای حشرات دارای pH بهینه در طیف ۵-۶/۵ می‌باشند (Terra & Ferreira, 1994). به عنوان مثال pH بهینه فعالیت آلفا گلوکوزیداز برابر ۳/۷ برای *Tenebrio molitor* Linnaeus، و یا ۵/۸ در شب‌پره *Erinnyis ello* Linnaeus، همچنین در سن *Dysdercus peruvianus* Guerin و لاروهای *Musca domestica* Linnaeus pH بهینه فعالیت آلفا گلوکوزیداز به ترتیب برابر ۵ و ۶/۶ گزارش شده است (Terra & Jorada, 1989; Silva & Ttrra, 1995; Santons *et al*., 1983; Terra *et al*., 1985).

در تحقیق دیگر بر روی فعالیت بتاگلوکوزیدازی روده میانی، pH بهینه فعالیت آنزیم مذکور در سن *Brachynema germeri* Kol، سن گندم و ملخ *A. flavolineata* برابر ۶ به دست آمد (Ramzi, 2009; Kazazi, 2007; Ferreira *et al*., 1999).



شکل ۲- اثر pHهای مختلف روی فعالیت آلفا گلوکوزیداز (با استفاده از سوبسترای PNαG) غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات. هر نقطه روی شکل نشان‌دهنده میانگین سه داده و میله‌های کوچک عمودی دو طرف هر نقطه معرف اشتباه معیار می‌باشد. با آزمون چند دامنه‌ای دانکن میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.



شکل ۳- اثر pHهای مختلف روی فعالیت بتا گلوکوزیداز (با استفاده از سوبسترای PNβG) غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات. هر نقطه روی شکل نشان دهنده میانگین سه داده و میله‌های کوچک عمودی دو طرف هر نقطه معرف اشتباه معیار می‌باشد. با آزمون چند دامنه‌ای دانکن میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

بررسی اثر دما برفعالیت آنزیم‌های آلفا و بتا گلوکوزیداز

نتیجه اثر دما بر فعالیت این آنزیم‌ها در شکل‌های ۴ و ۵ آورده شده است. چنانچه ملاحظه می‌گردد آلفاگلوکوزیداز در طیف دمائی ۳۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد و بتاگلوکوزیداز در طیف دمائی ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت مناسبی دارند. دمای بهینه آلفا گلوکوزیداز برای غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشخص شد و در طیف دمائی ۵۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد اختلاف معنی‌داری در فعالیت آلفا گلوکوزیدی مشاهده نشد. بیشترین فعالیت بتا گلوکوزیداز در غده گوارشی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد.

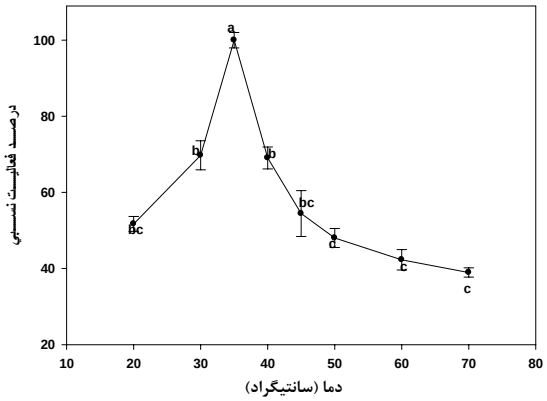
Price & Stevens (1989) اظهار داشتند که هر آنزیم دارای طیف دمائی مناسب برای فعالیت است، در دمای بالاتر از این طیف، تغییر در ترکیب ساختار به خصوص در مراکز آنزیم به وجود می‌آید که این ممکن است برگشت‌ناپذیر باشد. بنابراین تا زمانی که دما ترکیب سه بعدی آنزیم را از بین نبرده باشد، می‌تواند به عنوان یک کاتالیزور در واکنش عمل نماید و هر آنزیم برای فعالیت بهینه حد خاصی از دما را می‌پذیرد. افزایش دما باعث تغییردر ویژگی‌های سینتیکی واکنش‌دهنده‌ها

(سوبسترا و آنزیم) می‌گردد و در نتیجه شدت بالای واکنش آنزیمی و جذب انرژی بالا توسط آنزیم، ترکیب سه بعدی آن از هم گسیخته و فعالیت آن کاهش می‌یابد (Marinotti & James, 1990).

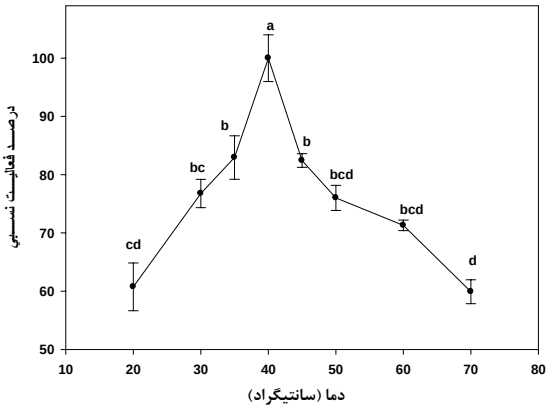
وجود آنزیم‌های کربوهیدازی کیتیناز و ان - استیل - بتا - دی گلوکوز آمینیداز در سیستم گوارشی سخت پوستان *M. norvegica* و *E. superba* ثابت شده است نتایج نشان داده است که دمای بهینه این آنزیم‌ها در هر دو گونه بین ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Spindler & Buchholz, 1988).

همچنین آنزیم‌های آلفا- و بتا گلوکوز آمینیداز از عصاره گوارشی *H. pomatica* جداسازی شده‌اند. در آزمایش تأثیر دما بر روی آنزیم گلوکوز آمینیداز در دماهای ۰، ۹، ۱۷/۵، ۲۵، ۳۷، ۵۴/۴، بعد از ۱/۵ ساعت نشان داده شد که دمای بهینه برای فعالیت این آنزیم ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Neuberger & Rosalind, 1993).

تأثیر دما بر فعالیت آنزیم‌های آلفا- و بتا گلوکوزیداز روده میانی حشرات نیز مورد مطالعه قرار گرفته است، دمای بهینه آلفا- و بتا گلوکوزیداز برای روده میانی سن سبز پسته ۳۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد در حالی که در سن گندم فعالیت آلفا گلوکوزیداز در طیف دمایی ۲۰ تا ۵۰ و برای بتا گلوکوزیداز در طیف دمایی ۲۵ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد تخمین زده شد (Bisswanger, 2002; Baker, 2001).



شکل ۴- اثر دما بر فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز در غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات



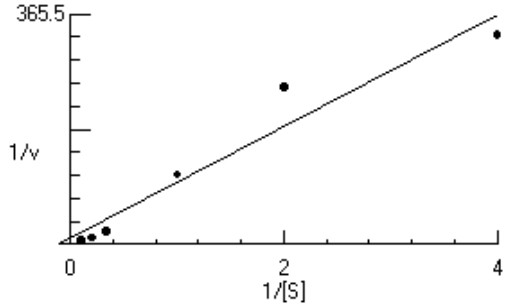
شکل ۵- اثر دما بر فعالیت آنزیم بتا گلوکوزیداز در غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات

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

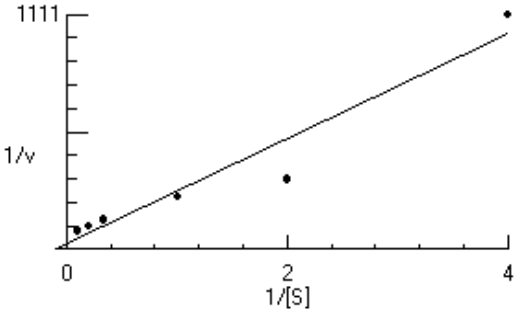
مقدار k_m برای آلفا- و بتا گلوکوزیداز حاصل از غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات به ترتیب برابر ۹/۸۴ و ۱۰/۴۸ میلی‌مولار و V_{max} نیز برابر ۰/۱۱ و ۰/۰۴۲۱ میلی‌مولار بر دقیقه می‌باشد (شکل۶ و ۷). تعیین سرعت یک واکنش آنزیمی و نحوه تغییر در باسخ به تغییرات پارامترهای آنزیم، سینتیک آنزیمی خوانده می‌شود. مهمترین عواملی که باعث تغییر در سرعت واکنش می‌گردد عبارتند از: سوبسترا، آنزیم، محصول واکنش، مهارکننده‌ها، قدرت یونی و حرارت (Farzami, 1995).

مقدار k_m برای آلفا و بتا گلوکوزیداز در حشرات بسیار متنوع می‌باشد این موضوع با توجه به نوع سوبسترا یک دامنه وسیع از k_m را به نمایش در می‌آورد. مقدار k_m برای آلفا و بتا گلوکوزیداز در سن گندم به ترتیب برابر ۱۱/۲۲ و ۲/۸۰۳ میلی‌مولار و مقدار V_{max} برابر ۱/۸۴۴ و ۰/۷۷۹ میلی‌مولار بر دقیقه محاسبه گردید. مقادیر k_m در *B. germeri* برای آنزیم‌های آلفا- و بتا گلوکوزیداز به ترتیب برابر ۲/۰۷۵ و ۴/۷۱۱ و مقدار V_{max} برابر ۰/۰۳۶۱ و ۰/۰۲۷۵ به دست آمد (Ramzi, 2009; Kazazi, 2007). همچنین مقادیر k_m در *Chilo suppressalis* Walker برای آلفا و بتا گلوکوزیداز به ترتیب ۱/۷۱ و ۰/۶۱ میلی‌مولار و مقدار V_{max} برابر ۰/۰۷

و ۰/۰۳۱ میلی‌مولار بر دقیقه به دست آمد (Sharma *et al*., 2000).



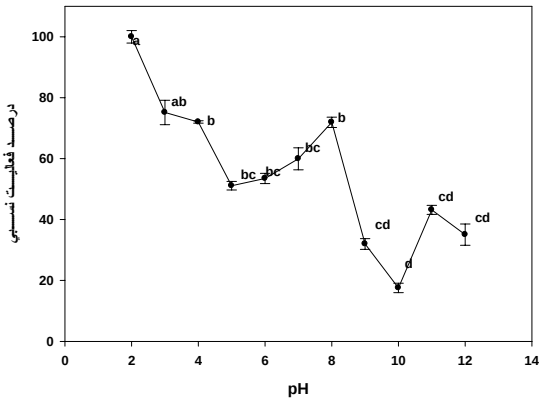
شکل ۶- پارامترهای K_m و V_{max} در شکل لینوربورک آلفا گلوکوزیداز در غده گوارشی حلزن قهوه‌ای مرکبات



شکل ۷- پارامترهای K_m و V_{max} در شکل لینوربورک بتا گلوکوزیداز در غده گوارشی حلزن قهوه‌ای مرکبات

بررسی اثر pH بر فعالیت آلفا آمیلاز

هیدرولیز سوبسترای آلفا آمیلاز در دامنه وسیعی از pH اسیدی (۲ تا ۶) و قلیائی (۷ تا ۱۲) انجام گرفت. بیشینه فعالیت آمیلازی در pH برابر ۲ مشاهده می‌شود. در pH قلیائی برابر با ۱۰ فعالیت کم و تقریباً حدود ۱۵ درصد فعالیت بیشینه است. در pHهای ۵، ۶، ۷ حدود ۵۰ درصد فعالیت بیشینه مشاهده می‌گردد (شکل ۸). این بررسی‌ها نشان می‌دهد که آلفا آمیلاز در غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات دارای فعالیت در محیط اسیدی هستند. آلفا آمیلاز جزء گلیکوزیدازها به شمار می‌رود. گلیکوزیدازها را به عنوان هیدرولیزکننده پیوندهای O- گلیکوزیل می‌شناسند. آلفا آمیلاز اتصالات 1,4-D-glacosidic را در پلی‌ساکاریدهایی که دارای ۳ یا بیشتر از ۳ واحد D-glucose متصل به α-1,4 هستند (مثل نشاسته و گلیکوژن) را هیدرولیز می‌کند (Hori, 1975). آنزیم‌ها دارای یک pH (یا دامنه pH) مطلوب می‌باشند که در آن حداکثر فعالیت را نشان داده و در pH بالاتر یا پایین‌تر از آن فعالیت آنها کاهش می‌یابد (Franco *et al*., 2000). بر طبق تحقیقات انجام شده pH بهینه برای فعالیت آلفا آمیلاز در سخت پوست *Cherax quadricarinatus* Von Martens برابر ۶ به دست آمده است (Figueiredo *et al*., 2001). همچنین Teo & Sabapathy (1990) با مطالعه آنزیم‌های غده گوارشی در دوکفه‌ای *Perna viridi* Linnaeus نشان دادند که pH بهینه فعالیت آلفا آمیلاز در این دوکفه‌ای ۵/۸ می‌باشد. Aguilar *et al.* (2000) نشان دادند که در باکتری *Lactobacillus manihotivoran* Beijerinck این آنزیم در طیف pH ۶-۵ دارای فعالیت مناسبی می‌باشد. همچنین در بررسی دیگر نشان داده شد که حداکثر فعالیت آنزیم برای آلفا آمیلاز دستگاه گوارش *Ascaris lumbricoides* Linnaeus در pH ۸/۲ می‌باشد (Zotwska, 2001). آمیلاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در هضم و متابولیسم کربوهیدارت در حشرات است که نشاسته و گلیکوژن را مورد حمله قرار می‌دهد. آنزیم آلفا-آمیلاز در هر حشره در pH خاصی فعال است. مشاهدات به عمل آمده نشان می‌دهد که آنزیم‌ها در برخی حشرات مثل راسته پروانه‌ها در pH قلیائی فعال است به عنوان مثال در پروانه *Anthrea mylitta* Hewitson فعالیت بهینه آمیلاز در pH قلیائی ۹/۲ گزارش شده است (Nagaraju & Abraham, 1995). در مورد راسته‌های دیگر از حشرات مثل سن‌ها pH کمی اسیدی و نزدیک به خنثی گزارش شده است. در مورد سن گندم و سن سبز پسته pH بهینه فعالیت به ترتیب برابر با ۶/۵ و ۵ به دست آمد (Ramzi, 2009; Kazazi, 2007). نتایج Zeng & Cohen (2000) در مورد فعالیت آلفا آمیلاز در سن‌های *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvoris و *Lygus hesperus* knigh در یک طیف pH از ۱۰-۴/۵ نشان دادکه آلفا-آمیلاز در این سن‌ها دارای pH بهینه ۶/۵ می‌باشد. چنانچه بررسی‌های بالا نشان می‌دهد سطح فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در حشرات بسیار متنوع و در عین حال وابسته به رژیم غذایی آنها است. به طوری که حشرات با رژیم غذایی غنی از نشاسته با افزایش قابل توجه در عملکرد این آنزیم روبرو هستند.



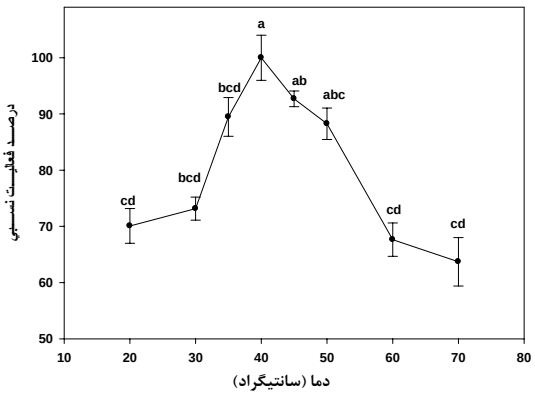
شکل ۸- اثر pHهای مختلف روی فعالیت آلفا آمیلاز (با استفاده از سوبسترای نشاسته) غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات. هر نقطه روی شکل نشان‌دهنده میانگین سه داده و میله‌های کوچک عمودی دو طرف هر نقطه معرف اشتباه معیار می‌باشد. با آزمون چند دامنه‌ای دانکن میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

تأثیر دما بر فعالیت آلفا آمیلاز

دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در حلزون قهوه‌ای مرکبات بین ۳۰ تا ۵۰ بوده و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حداکثر فعالیت آنزیم مشاهده شده است (شکل ۹). با افزایش دما در ۶۰ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت آنزیم کاسته می‌شود.

Onishi & Sonodo (1979) فعالیت آنزیم آمیلاز باکتری *Micrococcus halobius Sp. n.* راتحت تأثیر دماهای مختلف بررسی کردند و نشان دادند که فعالیت آنزیم در دماهای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد به شدت کاهش می‌یابد. بر اساس مطالعات انجام شده فعالیت آلفا آمیلاز در نماتود *Heterorhabditis bacteriophora Poinar* و نیز پایداری دمایی آن به دست آمد. نتایج مشخص کرد که دمای مناسب برای فعالیت این آنزیم ۴۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و پایداری دمایی آن به این ترتیب است که آلفا آمیلاز این نماتود به دمای بالاتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد حساس بوده، به طوری که هر گاه آنزیم مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد، ۶۲ درصد فعالیت آن از بین می‌رود و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آن به صفر خواهد رسید (Mohamad, 2004). همچنین فعالیت بهینه آلفا آمیلاز کرم آسکاریس در دمای حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که این دما همخوانی مناسب با دمای دستگاه گوارش *Sus domesticus* Linnae دارد، یعنی همانجایی که زندگی می‌کند (Zotwska, 2001).

دمای بهینه فعالیت آلفا آمیلاز برای بسیاری از حشرات از جمله لارو پروانه*Bombyx mori* Linnaeus، لارو پروانه *Spodoptera littolaris* Fab، سن سبز پسته، سن گندم برابر با ۳۵ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. مطالعات فوق بررسی‌های ما را در اثر دما بر روی فعالیت آلفا آمیلاز به طور کامل تأیید می‌نماید.



شکل ۹- اثر دما بر فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات

به طور کلی نتایج حاصله وجود فعالیت آلفاگلوکوزیداز، بتا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز را در غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات مشخص گردید. بهینه فعالیت آلفا گلوکوزیداز در pHهای اسیدی و بتا گلوکوزیداز در pHهای کمی اسیدی به دست آمد. دمای بهینه برای آلفا و بتا گلوکوزیداز ۳۵ و ۴۰ و برای آمیلاز ۴۰ درجه سلسیوس به دست آمد. نکته حائز توجه اینکه فعالیت بهینه آمیلاز در در pH بسیار قلیایی صورت میگیرد. مقدار k_m و v_{max} برای آلفا گلوکوزیداز به ترتیب ۹/۸۴ میلی‌مولار و ۰/۱۱ میلی‌مولار بر دقیقه به دست آمد. همچنین مقدار k_m و v_{max} برای بتاگلوکوزیداز حاصل از غده گوارشی حلزون قهوه‌ای مرکبات به ترتیب ۱۰/۴۸ میلی‌مولار و ۰/۰۴۲ میلی‌مولار بر دقیقه محاسبه گردید.

REFERENCES

1. Aguilar, G., Morlon-Guyot, J., Trejo-Auilar, B. & Guyot, J. P. (2000). Purification and characterization of an exteracellular α-amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme Microbial Technology*, 27, 406-413.
2. Ahmadi, A. & Arbabi, M. (2001). Implementation research project final report and efficacy study as carbaryle sprayed citrus orchard in Mazandaran Province. Pp 20. (In Farsi).
3. Barker, G. M. (2001). *The biology of terrestrial molluscs*.CABI Publishing.
4. Baker, J. E. (1991). Purification and partial characterization of alfa-amylase allozymes from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica. Insect Biochemistry*, 21(3), 303-311.
5. Bisswanger, H. (2002). *Enzyme kinetic: Principles and methods*, Wiley VCH Inc.
6. Colas, B. (1980). Kinetic studies on β-fucosidase of *Achatina balteata*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 613, 448-458.
7. Esen, A. (1993). *Beta glucosidase: Biochemistry and molecular biology*. American Chemical Society of Washington Press.
8. Evans, W. A. L. & Jones, E. G. (1962a). Carbohydrates in the alimentary tract of the slug *Arion alter* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 5, 149-166.
9. Farzami, B. (1990). *Enzymes*. Organization of Jahad-e-Daneshgahi. (In Farsi).
10. Ferreira, C., Marana, S. R., Silva, C. & Terra, W. R. (1999). Properties of digestive glycosidases and peptidases and the permeability of the peritrophic membranes of *Abracris flavolineata* (Orthopetra: Acrididae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 123, 241-250.
11. Figueiredo, M. S. R. B., Kricker, J. A. & Anderson, A. J. (2001). Digestive enzyme activities in the alimentary tract of Redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 21(2), 334-344.
12. Forming, E. (1954). *Biologie der mitteleuropaische landgastropoden*. Duncker and Humblot, Berlin.
13. Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R. & Grossi-de-Sa, M. F. (2002). Plant α- amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases, structure, function and potential for crop protection. *European Journal of Biochemistry*, 269, 397-412.
14. Galli, D. R. & Giese, A. C. (1959). Carbohydrate digestion in herbivorous snail *Tegula funebralis*. *Journal of Experimental Zoology*, 140,415-440.
15. Hori, K. (1975). Acids in the salivary gland of the bugs, *Lygus disponsi* and *Eurydema rugosum*. *Insect Biochemistry*, 5, 165-169.
16. Jess, S. & Marks, R. J. (1989). The interaction of diets and substrate on the growth of *Helix aspersa* (Muller) var. maxim. In: Henderson, I. (ed), *Slug and snails in world agriculture*. *British Crop Protection Council Monograph*, 41, 311-317.
17. Johnston, D. & Freeman, J. (2005). Dietary preference and digestive enzyme activities as indicators of trophic resources utilization by six species of crab. *Biological Bulletin*, 208, 36.
18. Kazzazi, M. (2007). *Study of digestive amylase and glucosidase in Eurygaster integriceps (Hemiptera: Scutelleridae) and of alpha-amylase inhibitor in wheat dominant*. Ph. D. dissertation. Faculty of Horticulture Science and Plant Protection, University of Tehran. Pp 142. (In Farsi).
19. Kumagal, Y., Inoue, A., Tanaca, H. & Ojima, T. (2008). Preparation of B-1, 3-glucanase from scallop mid-gut gland drips and its use for production of novel heterooligosaccharides. *Fisheries Science*, 74, 1121-1136.
20. Leparoux, S., Padrines, M., Placier, G. & Colas, B. (1997). Characterization of a strictly specific acid β-glactosidase from *Achatina achatina*. *Biochimica Biophysica Acta*, 1336, 522-532.
21. Leparoux, S., Fortun, Y. & 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.
22. Low, N. H., Vong, V. & Spornest, P. (1986). A new enzyme, β- glucosidase, in honey. *Journal of Apical Research*, 25, 178-181.
23. Mansorean, A. (1992). *Study of Iran freshwater snails*. Ph. D. dissertation. Tehran University of Medical Sciences. Pp 113. (In Farsi).
24. Marinotti, O. & James, A. A. (1990). An α-glucosidase in the salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry*, 20, 619-623.
25. Mierzaee, A. (1973). Injurious mollusca of Iran agriculture. *Journal of plant pests and diseases Research*, 68. (In Farsi).
26. Mirmoaedy, A. (2008). *Zoology and laboratry animal, laboratory dissection*. Kermanshah University Press.Pp 522. (In Farsi).

* نویسنده مسئول: مهدیه بی‌غم تلفن: ۰۹۱۳-۲۴۲۸۳۰۷ E-mail: mahdbigham@gmail.com

27. Mohamad, M. A. (2004). Purification and characterization of α-amylase from the infective jueniles of the nematode *Heterophabditis bacteriophora*. *Comperative Biochemistry and Physiology*, 139, 1-9.
28. Nagaraju, J. & Abraham, C. (1995). Purification and characterization of digestive amylase from the tasar silkworm, *Antherae mylitta* (Lepidoptera: Saturnidae). *Comperative Biochemistry and Physiology*, 110, 201-209.
29. Neuberger, A. & Rosalind, V. P. (1939). The hydrolysis of glucosaminidase by an exzyme in *Helix pomatia*. *Biochemistry Journal*, 33 (10), 1580-1590.
30. Onishi, H. & Sonodo, K. (1979). Purification and properties of an exteracellular amylase from a moderate Halo hilo, *Micrococcus halobius*. *Applied Enviromental Microbiology*, 38, 616-60.
31. Price, N. C. & Stevens, L. (1989). *Fundamentals of Enzymology*. Oxford University Press, New York. Pp 478.
32. Ramzi, S. (2009). *Study of digestive carbohydrase activity in green stink bug Brachynema germari (Hemiptera: Pentatomidae)*. M. Sc. dissertation. Faculty of Horticulture Science and Plant Protection, University of Tehran. Pp 117. (In Farsi)
33. Santons, C. D., Ferreira, C. & Terra, W. R. (1983). Consumption of food and spatial organization of digestion in the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. *Journal of Insect Physiology*, 29, 707-717.
34. Segel, I. H. (1975). *Enzyme kinetics behaviour and analysis of rapid equliberium and steady state enzyme systems*. John Wiley and Sons Inc, New York. Pp 992.
35. Sharma, H. C., Sharma, K. K., Seetharama, N. & Ortiz, R. (2000). Prospects for using transgenic resistance to insect in crop improvement. *Journal of Biotechnology*, 3, 1-20.
36. Siegentaler, U. (1977). Eine einfache & rasche methode zur bestimmung de alpha – glucosidase (saccharase) in honing. *Mitt Gebiere Lebesmittelunters Hyg*. 68, 251 – 258.
37. Silva, C. P. & Terra, W. R. (1995). An α-glucosidase from perimicrivillar membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) midgut cells, purification and properties. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25, 487-494.
38. Spindler, K. D. & Buchholz, F. (1988). Partial characterization of chitin degrading enzymes from two euphausiids, *Euphausia superba* and *Meganyctiphanes norvegica*. *Polar Biology*, 9, 115-122.
39. Teo, L. H. & Sabapathy, U. (1990). Preliminary report on the digestive enzyme present in the digestive gland of *Perna viridis*. *Marine Biology*, 106, 403 – 407.
40. Terra, W. R. & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzym properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109 (1), 1-62.
41. Terra, W. R. & Jorada, B. P. (1989). Final digestion of starch in *Musca domestica* larvae. Distribution and properties of midgut α-D-glucosidase and glucoamylase. *Insect Biochemistry*, 19, 285-292.
42. Terra, W. R., Ferreira, C. & Bastos, F. (1985). Phylogenetic consideration of insect digestion, disaccaridases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry*, 15, 443-449.
43. Withaker, J. R. (1994). *Principales of the enzymology for the food science*. Marcel Dekker, Inc, NewYork.
44. Zeng, F. & 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.
45. Zibaee, A., Bandani, A.R. & Ramzi, S. (2009). Enzymatic properties of α- and β-glucosidase extracted from midgut and salivary glands of rice striped stem borer, *Chilo suppresalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Comptes Rendus Biologies*, 332, 633-641.
46. Zoltwska, K. (2001). Purification and characterization of α-amylase the intestine and muscle of *Ascaris saum* (Nematoda). *Acta Biochimica Polonica*, 48, 763-774.