آنزیم‌های گوارشی ونقش آن‌ها در کنترل آفات (حشرات)

Digestive enzyme and role to pest control (insects)

بهروز کوچکی

behroozen@gmail.com

کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی، نمایندگی گلستان- منطقه گالیکش، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

بخش مهمی از غذای حشرات را ماکرومولکول‌هایی نظیر پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند. البته لیپیدها نیز به شکل گلیسیریدها، فسفولیپیدها، گلیکولیپیدها، در غذای حشرات دیده می‌شوند و به طور عمومی به عنوان یک مولکول کوچک، قابلیت انتقال به بافت هدف را در بدن دارند، در حالی که مولکول‌های بزرگ این ویژگی را نداشته و لازم است قبل از جذب به ترکیبات کوچک‌تر شکسته شوند. آنزیم‌های مربوط در معده و بزاق این کار را انجام می‌دهند (چاپمن، ۱۹۹۸). نیازهای ضروری غذایی حشرات آن‌هایی هستند که در اغلب مهره‌داران وجود دارد (هاوس[1]،۱۹۷۴).

پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، لیپیدها سه گروه اصلی تغذیه‌ای در حشرات هستند که قبل از جذب بوسیله معده میانی حشرات باید مورد گوارش قرار گیرند و به ترتیب بوسیله پروتئازها، آمیلاز و لیپازها تجزیه شوند که سه گروه عمده آنزیم‌های گوارشی در حشرات می‌باشند (آپلبام[2] ۱۹۶۱).

آنزیم‌های گوارشی در حشرات:

هیدرولازها آنزیم‌های گوارشی محسوب می‌شوند که بوسیله کمیته بین‌المللی بیوشیمی و بیولوژی مولکولی رده‌بندی و نامگذاری آن‌ها صورت پذیرفته است. در این میان آنزیم‌های گوارشی، آنزیم‌هایی که مسئولیت هیدرولیز کامل پروتئین‌ها و تبدیل آن‌ها به اسیدآمینه را دارند، پروتئاز (پپتید هیدرولاز EC 3.4) نامیده می‌شوند. پروتئازها روی پیوندهای پپتیدی عمل کرده و خود پروتئازها شامل اندوپپتیداز(EC 3.4.21-24) و اگزوپپتیداز (EC3.2.4.11-19) می‌باشند. پروتئازها بر اساس مکانیسم کاتالیتیکی به این دو دسته تقسیم می‌شوند. آنزیم‌هایی که باعث هیدرولیز کامل کربوهیدرات‌ها و تبدیل آن‌ها به منوساکاریدها می‌شوند، کربوهیدراز می‌نامند. کربوهیدرازها براساس سوبسترا اختصاصی‌شان رده‌بندی می‌شوند و در دو گروه قرار می‌گیرند.

گروه اول Despolymerases می‌باشند این گروه شامل آنزیم‌هایی است که باعث شکستن پیوندهای داخلی در پلی ساکاریدها می‌شوند و بر اساس سوبستراهایشان نامگذاری می‌شوند. از مهم‌ترین اعضا این گروه می‌توان به آمیلاز اشاره کرد. البته آنزیم‌هایی چون سلولاز، پکتیناز و کیتیناز نیز در این گروه قرار می‌گیرند. آمیلاز خود با توجه به پیوندی که می‌شکند به نام آلفا و بتا آمیلاز نامیده می‌شود (تررا[3]و همکاران، ۱۹۹۶).

آلفا-آمیلاز (D- ,α 1,4- گلوکان گلوکانوهیدرولاز E.C.3.2.1.1) شکستن پیوندهای گلوکوزید داخلی نشاسته و الیگوساکارید و پلی‌ساکاریدهای مشابه را کاتالیز می‌کند، این آنزیم در اغلب گیاهان، جانوران، حشرات و میکروارگانیسم‌های دیگر وجود دارد (کارن و مالاسینکی[4]

---

1 Haves

2 Applabaum

3 Terra

4 Karen and Malasinky

۱۹۷۸). آلفا-آمیلاز اولین بار در سوسک *Tenebrio molitor* خالص‌سازی و ویژگی‌های آنزیمی آن تعیین شد (آپلبام، ۱۹۶۴). از گروه آنزیم‌هایی که در حشرات بر روی زنجیره، ۱و۴ گلوکان نظیر نشاسته و یا گلیکوژن عمل می‌کند، فقط آلفا -آمیلاز گزارش شده است (ترا و فریرا، ۱۹۹۶).

گروه دوم Glycosidase می‌باشند این گروه شامل آنزیم‌هایی است که الیگوساکاریدها و دی‌ساکاریدها را هیدرولیز می‌کند. گلیکوزیدازها را بر اساس منوساکاریدها که با کاهش پیوند گلیکوزیدی روی α یا β است، نامگذاری می‌کنند. بنابراین گلوکز حاصل از عمل آنزیم و شکست پیوندهای آن‌ها از ناحیه α یا β -گلوکوزید حاصل می‌شود. یک سوبسترا ممکن است بوسیله آنزیم‌های مختلف شکسته شود. البته استثناء نیز وجود دارد. به عنوان مثال دی‌ساکارید ترهالوز اگرچه یک α-گلوکوزید است اما آلفا گلوکوزیداز قادر به شکستن آن نیست و فقط تری‌هالوز یک آنزیم اختصاصی است که قادر به شکستن آن می‌باشد. آنزیم‌های β -α -گلوکوزیداز و β -α -گالاکتوزیداز نیز جزء این گروه می‌باشند (ترا و همکاران، ۱۹۹۶).

ویژگی‌های آنزیمی:

pH

فعالیت و پایداری آنزیم‌های پروتئینی وابسته به ترکیب سه بعدی و ساختمان مولکول‌های اسیدآمینه آن‌ها است. یک تغییر کوچک در این ترکیب، به ویژه در مرکز فعالیت آن ممکن است شدت واکنش کاتالیزوری را به طور مؤثری تغییر دهد. دما و pH از عوامل اصلی در تغییر ساختار سه بعدی آنزیم‌ها هستند (پرایس و استیونس[5] ۱۹۸۹).

pH یکی از خواص مهم داخل معده است که روی آنزیم‌های گوارشی تأثیر می‌گذارد و تاکنون گزارش‌های زیادی مبنی بر میزان pH معده و اثر pH روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی انتشار یافته است. به طور کلی آنزیم‌ها در طیف خاصی از pH فعالیت می‌کنند (دیکسون و وب[6] ۱۹۷۹).

بر طبق مطالعات ویتاکر (۱۹۹۴)، اثر pH روی شدت واکنش آنزیمی را می‌توان به دو گروه تقسیم‌بندی کرد:

۱- اثر روی پایداری آنزیم

۲- اثر روی پیوندهای سوبسترا و تحت تأثیر قرار گرفتن شدت واکنش کاتالیتیکی

پایداری آنزیم‌ها به توانایی آن در برگشت به ساختار سه بعدی و بهبود بخشیدن به فعالیت بهینه مربوط می‌شود (پرایس و استیونس، ۱۹۸۹؛ ویتاکر[7] ۱۹۹۴). اثر pH روی پیوندهای سوبسترا و شدت واکنش کاتالیتیکی مربوط به یونیزه شدن گروه‌های یونیزه‌کننده در مراکز فعالیت مربوط می‌شود. اثر pH روی فعالیت آنزیمی را به طور معمول به یونیزاسیون گروه‌های زنجیر جانبی پروتئین نسبت می‌دهند و چنین به نظر می‌رسد که تغییر فعالیت آنزیمی نسبت به pH به واسطه یونیزاسیون دو گروه خاص زیر باشد:

الف- گروه تشکیل دهنده پیوند با سوبسترا

ب- گروه‌هایی که عمل کاتالیزوری را بر عهده دارند

اثر دما:

کئیت[8] و پترمن[9] (۱۹۷۹) نشان دادند که به طورکلی اثر دما روی فعالیت آنزیمی به این طریق است که در طیف حرارتی

5 Praise and Stivens

6 Dickson and Web

7 Vitaker

8 Kaeit

9 Peterman

پایین تا حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد عمل فعال شدن به طور آهسته انجام می‌شود و در بیشتر موارد این طیف دمایی اثری بر شدت واکنش ندارد. در دمای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم‌ها با افزایش دما رو به کاهش است، همچنین اگر در دمای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود باز هم کاهش در فعالیت آنزیمی مشاهده خواهد شد. دمای بهینه و پایداری دمایی آنزیم‌ها به طور معمول وابسته به منشأ تولید آن‌ها است (فلر[1]، ۱۹۹۲). فعالیت آنزیم‌ها به طور معمول با افزایش دما از صفر تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد، دمای بهینه آمیلازهای مقاوم به دما بیش از ۴۰ درجه سانتی‌گراد است. در محدوده دمایی ۶۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد کاهش سریع در فعالیت آنزیمی رخ می‌دهد که این به واسطه افزایش آشفتگی مولکول‌های آنزیم و سوبسترا، و افزایش آهسته دناتوراسیون دمایی آنزیم‌ها می‌باشد (بیرد و هوبکینز[2]، ۱۹۵۴). مندیولا[3] و همکاران (۲۰۰۰)، میزان دما بهینه برای آلفا آمیلاز *P. truncates* را ۳۰ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد محاسبه کردند و نشان دادند در دمای بالاتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنزیم کاهش یافته و بالاتر از ۶۰ درجه سانتی‌گراد آنزیم فعالیتی نداشت.

اثر یون‌ها:

حضور مولکول‌های مختلف در محیط آنزیمی می‌تواند فعالیت آن را به طور برگشت پذیر یا برگشت‌ناپذیر تحت تأثیر قرار دهد، داروها و سموم می‌توانند از این دسته از مولکول‌ها محسوب شوند. این مولکول‌ها ممکن است فعالیت آنزیم را کم یا زیاد کنند. در این صورت به ترتیب مهارکنند ه[13] یا فعال‌کنند ه[14] نامیده می‌شوند. روبیت[15] و همکاران (۱۹۸۴) ثابت کردند که آلفا آمیلازهای حیوانی مانند آلفا آمیلاز پانکراس و بزاق برای بیشترین فعالیت خود علاوه بر یون کلسیم به یون کلراید نیز نیاز دارند.

تحقیقات زانگ و کوهن[16] (۲۰۰۰)، نشان داد که EDTA و SDS روی فعالیت آلفا-آمیلاز غدد بزاقی سن‌های دو گونه از جنس *Lygus* اثرات منفی شدیدی دارد. کوهن و هندریکس[17] (۱۹۹۴)، ضمن اینکه اثر بازدارندگی EDTA و SDS را روی آلفا آمیلاز غدد بزاقی این دو سن بررسی کردند، اظهار داشتند با افزایش زمان انکوباسیون آنزیم با این مواد، مقدار بازدارندگی نیز افزایش می‌یابد. آن‌ها همچنین علت این موضوع را تخریب و یا حذف کاتیونی نظیر Ca^{2+} از پیکره آنزیم اعلام کردند. همچنین مشخص شده است که Cl^- یک فعال‌کننده مناسب برای فعالیت آمیلازهای پستانداران است، آمیلاز حاصل از معده میانی *Tenebrio molitor* به صورت ضعیف توسط Cl^- فعال‌تر می‌شود.

باتوجه به آثار مخرب سموم شیمیایی روی محیط زیست و مقاومت آفات به آفت‌کش‌ها، امروزه روش‌های جدید در کنترل آفات بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند که برای این منظور آگاهی داشتن از فیزیولوژی و بیوشیمی آنزیم‌های گوارشی حشرات دارای اهمیت است. این آنزیم‌ها در تغذیه و جذب مواد غذایی در طول مراحل مختلف زندگی حشره

1 Feler 0
1 Bird and Hobkinz 1
1 Mendiola 2

1 Inhibitor 3
1 ativator 4
1 Robit 5
1 Zheng and Cohen 6
1 Hendrix 7

نقش حیاتی برعهده دارند و از این طریق در حفظ بقاء و تولیدمثل حشره مؤثر واقع می‌شوند (جورج و همکاران[18] ۲۰۰۸). گیاهان با استفاده از بازدارنده‌های آنزیمی و مهار آنزیم‌های موجود در دستگاه گوارش حشرات و جلوگیری از هضم و جذب مواد غذایی از خود دفاع می‌کنند (کوگیول و همکاران[19]؛ ۲۰۰۸). بازدارنده‌های آنزیمی با جلوگیری از پروتولیز باعث هضم ناقص غذا و مانع جذب اسیدهای‌آمینه ضروری شده در نتیجه کندی رشد و باعث مرگ در اثر گرسنگی می‌شوند (سیرینی واسان[20]؛ ۲۰۰۵). در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای بیان ژن‌های این مهارکننده‌ها در گیاهان به منظور مقاوم نمودن گیاهان به آفات انجام گرفته است (کوگیول و همکاران، ۲۰۰۸).

علاوه بر استفاده از گیاهان مقاوم و تراریخته حاصل از مهندسی ژنتیک، استفاده از سموم زیستی مانند Bt در کنترل حشرات نیز مورد توجه است. این آفت‌کش از طریق گوارش اثر می‌کند و دارای پروتئین‌های سمی می‌باشد که در دستگاه گوارش تحت‌تأثیر آنزیم‌ها قرار می‌گیرد (شنپ[21]؛ ۱۹۹۸). توانایی یک گیاه یا باکتری بیماریزای *Bacillus thuringiensis* (Bt) در مقابله با آفات به سرنوشت این پروتئین‌های سمی در دستگاه گوارش حشره بستگی دارد (کنوپ رایت[22] و همکاران، ۲۰۰۶). از این رو با دانستن فیزیولوژی این آنزیم‌ها و نحوه اثر آن‌ها روی این نوع سموم می‌توان با اختلال در کارکرد آنزیم‌ها، حساسیت حشرات را نسبت به این سموم افزایش داده و بر کارآیی آن‌ها افزود (بوداتا[23]؛ ۲۰۰۸). یک کنترل مؤثر، انتخابی با حداقل ایجاد اختلال در محیط زیست و تأمین نهایت سلامتی انسان است، حشره‌کش‌های میکروبی از وسایل مطلوب در کنترل آفات به شمار می‌روند که از مهمترین آن‌ها می‌توان به آفت‌کش‌های میکروبی بر پایه *B. thuringiensis* اشاره کرد. موفق‌ترین آفت‌کش‌های بیولوژیکی که به صورت تجاری عرضه شده‌اند عبارتند از: *باسیلوس تورینژینسیس* که پرمصرف‌ترین حشره‌کش بیولوژیکی است، Bt یک باکتری هوازی گرم مثبت است، که به طور معمول در طبیعت یافت می‌شود. این باکتری طی اسپوردهی کریستال پروتئینی سمی تولید می‌کند. توکسین‌های متفاوتی به وسیله نژادهای مختلف باسیلوس تولید می‌شود. مهم‌ترین توکسین آن دلتا-اندوتوکسین نام دارد. فرمولاسیون‌های تجاری حاوی اسپور و کریستال است، که باید به وسیله حشره خورده شود. دستگاه گوارش حشره بعد از خوردن Bt فلج می‌شود ولی مرگ حشره بعد از چند روز اتفاق می‌افتد. سویه کورستاکی (Kurstaki) بیشترین مصرف را دارد و روی بال پولکداران در زراعت‌های مختلف مؤثر است.

1 George 8
1 Chougule 9
2 Sirinivasan 0
2 Schnepf 1
2 Knop wright 2

2 Budatha 3

منبع:

Applebaum, S. W. (1985). Biochemistry of digestion. In: G. A. Kerkut and L. I. Gilbert (eds.) Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry & Pharmacology. Regulation, digestion, excretion. Pergamon Press, 4:279–307.

Budatha, M., G. Meur & A. Datta-Gupta. (2008). Identification and characterization of midgut proteases In *Achaeta janata* & their implication. Biotechnology letters. 30: 305-310.

Chapman, R. F., (1998). The Insects Structure and function, 4th edition, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 782.

Chougule, N. P., E. Doyle., E. Fiches. & J. A. Gatehouse. (2008). Biochemical Characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (Lep. :Noctuiae) and effect of soybean inhibiator (SKTI) in feeding assay. Journal of Insect Physiology. 54: 563-572.

Feller, G., T. Lonhienne, C. Deroanne, C. Libioulle, J. Van Beeumen, C. Gerday. (1992). Purification, characterization and nucleotide sequence of the thermolabile α-amylase from the antarctic psychrotroph ALTEROMONAS HALOPLANCTIS. Journal of Biology and Chemistry, 267:5217–5221.

Ferreira, C., B. B. Torres., W. R. Terra. (1998). Substrate specificities of midgut β-glycosidases from insects of different orders, Comparative Biochemistry Physiology. 119B (1): 219–225.

J. F. Robyt. (1984). "Enzymes in the Hydrolysis and Synthesis of Starch," in Starch: Chemistry and Technology, 2nd Ed, ed. by R. L. Whistler, J. N. Bemiller and E. F. Paschall, (Orlando:, Academic Press). 736p

Keith, J. L. and **B. F. Peterman. (1979).** Temperature effects in enzyme kinetics. Methods in Enzymology, 63: 234-257.

Mendiola-Olaya, E., A. Valencia-Jimenez., S. Valeds-Rodriguez, J. Delano- Frier, A. Blanco-Labra. (2000). Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncates* Horn. Comprative Biochemistry Physiology, 126: 425-433.

Schnepf, E. N., J. Crickmore, D. Van Rie, J. Lereclus, J. Feitelson. D. R. Zeigler and D. H. Dean. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology Molecular Biology Review, 62: 775–80.

Sirinivasan, A., N.P. Chougle, A.P. Giri, J.A. Gatehouse, V.S. Gupta. (2005). Podborer (*Helicoverpa armigera* :Hubn) does not show specific adaptation in gut proteinase to dietry *cicer arietinum* Kunitz proteinase inhibator. Journal of Insect Physiology. 51: 1268-1276.

Terra, W. R., C. Ferreira, B. P. Jordao and R. J. Dillon. (1996). Digestive enzymes In: Lehane M. J., Billingsly P. F (Eds.) Biology of the Insect Midgut. Chapman and Hall, London, pp: 153-193.

Zheng, F., A.C. Cohen. (2000). Comparison of α-amylase and protease activities of a zoophytophagus and two phytophagous Heteroptera. Comparative Biochemistry Physiology, 126:101-10