

曲酸对小菜蛾酚氧化酶抑制作用的研究

王树栋, 罗万春, 高兴祥, 丁琦

(山东农业大学农药毒理与应用技术省级重点实验室, 泰安 271018)

摘要: 研究了曲酸对小菜蛾酚氧化酶的单酚酶和二酚酶活力的影响并初步探讨了其抑制作用机理, 结果表明, 曲酸对小菜蛾酚氧化酶的单酚酶和二酚酶活力均有抑制作用, 其 I_{50} 分别为 $0.07 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。曲酸对单酚酶活力表达的迟滞时间有明显的延长效应, 对二酚酶的抑制作用表现为典型的可逆竞争型抑制类型, 其抑制常数 K_i 为 $0.47 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。曲酸与酚氧化酶中催化氧化反应活性中心的 Cu^{2+} 螯合可能是其产生抑制作用的重要原因。金属铁离子可明显地缩短单酚酶的迟滞时间, 但对单酚酶的活力无明显影响。

关键词: 曲酸; 小菜蛾; 酚氧化酶; 抑制剂; 抑制机理

Inhibitory Effects of Kojic Acid on Phenoloxidase of Diamondback Moth *Plutella xylostella*

WANG Shu-dong, LUO Wan-chun, GAO Xing-xiang, DING Qi

(Shandong Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Application Technique, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract: The effects of Kojic acid on phenoloxidase (PO) of *Plutella xylostella* were studied, when which had been partially purified by 40% saturated $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ and Sephadex G-100 gel filtration. Kojic acid showed inhibitory effects on both monophenolase and o-diphenolase activity of the PO. The inhibitor concentrations leading to 50% (I_{50}) activity lost were estimated to be $0.07 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ for monophenolase activity and $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ for diphenolase, respectively. Kojic acid can also prolong the lag time of PO for oxidation of L-tyrosine. The inhibitory kinetics were analyzed by Lineweaver-Burk plots and kojic acid was found to be a reversible competitive inhibitor with the K_i of $0.47 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. The ability of kojic acid to inhibit the enzyme activity may be associated with its ability to chelate copper at the active site. In addition, the iron ion was found to shorten the lag time obviously, but have no important effect on the monophenolase activity.

Key words: Kojic acid; *Plutella xylostella*; Phenoloxidase; Inhibitor; Inhibition kinetics

酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 是昆虫体内一种重要酶类, 主要参与色素和其它多酚化合物的形成^[1], 催化单酚羟基化为二酚 (如 L-DOPA), 并把二酚氧化成醌, 醌则在酶促条件下最终生成黑色素^[2]。酚氧化酶在昆虫的正常发育过程中具有重要的生理功能:

(1) 参与表皮的硬化和黑化; (2) 对卵壳的鞣化作用; (3) 参与伤害防御; (4) 加速伤口的愈合^[3]。另外, 在较高等的无脊椎动物中, 酚氧化酶还可在宿主的防御反应中作为非自身识别系统发挥功能, 当入侵的异物太大 (如寄生虫) 而无法被单个血细胞吞噬时, 宿主便通过黑色素的包被作用来抵抗和消灭异物, 酚氧化酶在此过程中起重要的作用。

鉴于酚氧化酶在昆虫的生长发育过程中具有非常重要的作用, 有可能作为害虫控制剂中的一个重要作用靶标, 可通过抑制害虫体内酚氧化酶的活力, 使害虫“软化”畸形或丧失防御能力从而达到合理控制害虫的目的。1993年, 我国著名昆虫毒理学家张宗炳和冷欣夫先生就曾经指出“探索新杀虫药剂的一条最有希望的途径是生物合理途径, 其中酪氨酸酶 (即酚氧化酶) 抑制剂名列前茅”^[4]。小菜蛾是世界上最难治理的重要蔬菜害虫之一, 曲酸 (Kojic acid) 是某些微生物生长过程中经糖代谢产生的弱酸性天然化合物, 具有酪氨酸酶抑制能力、抑菌能力、抗氧化能力和金属离子螯合能力, 已广泛应用于食品防腐、鲜花果蔬

收稿日期: 2004-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270887)

作者简介: 王树栋 (1978-), 男, 山东诸城人, 硕士研究生。主要从事昆虫毒理学及天然产物农药研究。E-mail: shudong_wang@sohu.com。罗万春为通讯作者, Tel: 0538-8242983; E-mail: wcluo@sdau.edu.cn

保鲜等多个领域^[5,6]。本文研究了曲酸对小菜蛾酚氧化酶的抑制作用,旨在为开发以该酶为靶标的新型害虫控制剂提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试昆虫

供试昆虫小菜蛾 *Plutella xylostella* 在本研究室养虫室内(温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 60%~70%, 光周期为 14L:10D)以改良的蛭石油菜苗法继代饲养^[7]。

1.2 主要仪器及试剂

主要仪器: 高速冷冻离心机(CR22, 日本日立公司); UV-2201 紫外分光光度计(日本岛津公司); 电动恒温水浴摇床(上海华光仪器公司); H-1 自动核酸蛋白分离层析仪(上海沪西分析仪器厂)。

主要试剂: 邻苯二酚(天津市科密欧化学试剂开发中心); Sephadex G-100(北京欣经科生物技术公司); L-酪氨酸(Tyr)(上海伯奥生物科技有限公司); 考马斯亮蓝(G-250)(进口分装); 磷酸二氢钠(中国兖州化工厂); 磷酸氢二钠(山东省化工研究院); 硫酸铵(天津市大茂化学仪器供应站); 硫酸亚铁(天津市博迪化工有限公司); 硫酸铁(天津市博迪化工有限公司); 硫酸铜(天津市博迪化工有限公司)。

1.3 酶液制备

取小菜蛾 4 龄幼虫 80 头, 按照每克虫重 8 ml 剂量加入 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6.5 的磷酸缓冲液, 放在预冷的匀浆器中, 在冰浴中充分匀浆, 然后将匀浆液转移至离心管中, 在高速冷冻离心机上以 8 000 r/min 离心 30 min, 除去液面上的脂类和色素后, 取上清液作为粗酶源。加入固体硫酸铵使其饱和度为 40%, 在冰浴下静置 30 min 后, 于 8 000 r/min、 0°C 条件下离心 30 min。收集最后所得沉淀并溶解在少量体积的相同磷酸缓冲液中, 然后在缓冲液中透析过夜, 其间更换 3 次透析液。浓缩后经 Sephadex G-100 凝胶过滤, 即得到部分纯化的小菜蛾酚氧化酶酶源。以每分钟每毫克蛋白吸光度提高 0.001 定义为 1 个酶活力单位(U), 则本实验所用初纯化后酶的比活力为 $980\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 总纯化倍数为 5.86 倍。

1.4 测定方法

1.4.1 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝 G-250 法, 以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白^[8]。

1.4.2 PO 单酚酶活力测定 以 $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-酪氨酸为底物, 在 $3\text{ml } 0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.5)测活体系中, 将 0.1ml 不同浓度的效应物溶液与 2.5ml 缓

冲液配制的底物溶液混匀, 在 30°C 恒温下水浴稳定 30 min 后, 加入 0.4 ml 酶液, 于 475 nm 波长下测定光密度随时间变化的增长曲线。

1.4.3 PO 二酚酶活力测定 参照 Benjamin 和 Montgomery 的方法^[9]并略有改进。以 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯二酚溶液为底物, 在 $3 \text{ ml } 0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液(pH 6.5)测活体系中, 将 0.1 ml 不同浓度的效应物溶液与 1.5 ml 底物溶液及 1.3 ml 磷酸缓冲液混匀, 在 30°C 恒温下水浴稳定 30 min 后, 加入 0.1 ml 酶液, 于 400 nm 波长下测定光密度随时间变化的增长直线, 从直线的斜率求得该酶活力。

1.4.4 铁离子对曲酸抑制 PO 单酚酶活力影响的测定

在 $3 \text{ ml } 0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.5)的测活体系中, 包含 0.1 ml $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铁离子溶液(分别用硫酸铁和硫酸亚铁配制)、0.1 ml $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 曲酸溶液、2.4 ml 用缓冲液配制的底物溶液和 0.4 ml 酶液, 测定活力, 方法同 1.4.2。

1.4.5 铜离子对曲酸抑制 PO 二酚酶活力影响的测定

在 $3 \text{ ml } 0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.5)的测活体系中, 包含 0.1 ml $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 溶液(用硫酸铜配制)、0.1 ml $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 曲酸溶液、2.7 ml 用缓冲液配制的底物溶液和 0.1 ml 酶液, 测定方法同 1.4.3。

1.4.6 曲酸与 PO 的预温浴对 PO 酶活力影响的测定

以 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 邻苯二酚溶液为底物, 在 $3 \text{ ml } 0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.5)测活体系中, 将 0.1 ml $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 曲酸溶液、0.1ml 酶液及 1.3 ml 磷酸缓冲液混匀, 在 30°C 恒温下水浴稳定 5 min 后, 加入提前在相同温度条件下温育好的 1.5 ml 底物溶液, 测定活力方法同 1.4.3。

2 结果与分析

2.1 曲酸对 PO 单酚酶活力的影响

将反应体系起始时的吸光度定为零, 小菜蛾 PO 单酚酶催化反应的进行曲线见图 1。开始时, 产物形成量缓慢增加, 到一定时间后成直线上升, 反应体系达到恒定的斜率, 说明反应达到稳定态, 直线外推得到的横截距为迟滞时间^[10]。由曲线可看出酶反应的迟滞时间随曲酸浓度的增大而增大, 而稳态酶活力(直线部分的斜率)随曲酸浓度的增大而下降, 说明曲酸对单酚酶活性有明显的抑制作用。图 2 表示曲酸对该酶稳态酶活力的影响, 图 3 表示曲酸对该酶催化 L-酪氨酸迟滞时间的影响。由图 2 和图 3 可看出: 随着抑

制剂浓度的增大,酶反应的迟滞时间迅速增大,该酶稳态酶的活力明显下降。当曲酸浓度为零时,迟滞时间为 306 s; 曲酸浓度为 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,迟滞时间增大到 732 s, 稳态酶活力下降 57%; 当曲酸浓度为 $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,迟滞时间增大到 900 s, 稳态酶活力下降 64%。由图 2 中该酶活力被抑制趋势线可求出使该酶稳态酶活力下降 50% 的抑制剂浓度 (I_{50}) 为 $0.07 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

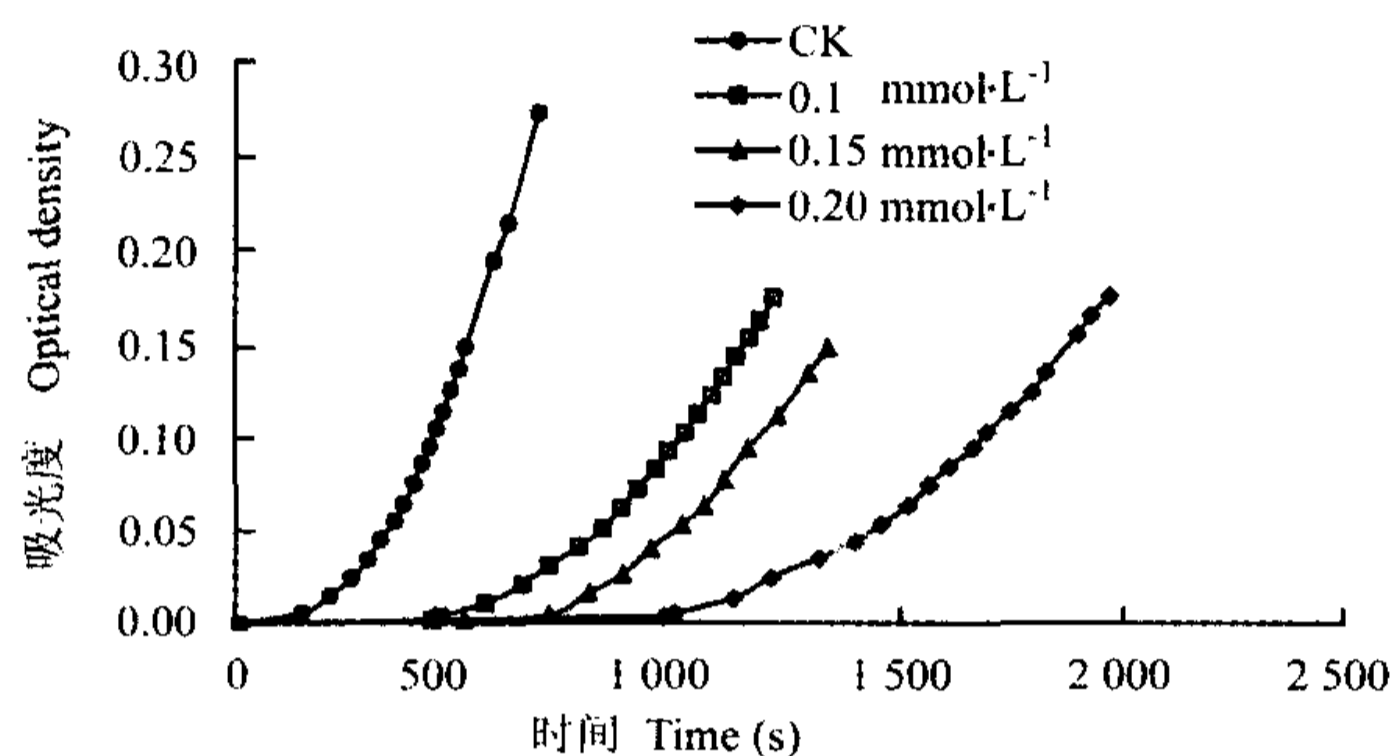


图 1 曲酸抑制小菜蛾酚氧化酶反应的进程

Fig.1 Progress curves for the inhibition of phenoloxidase by kojic acid

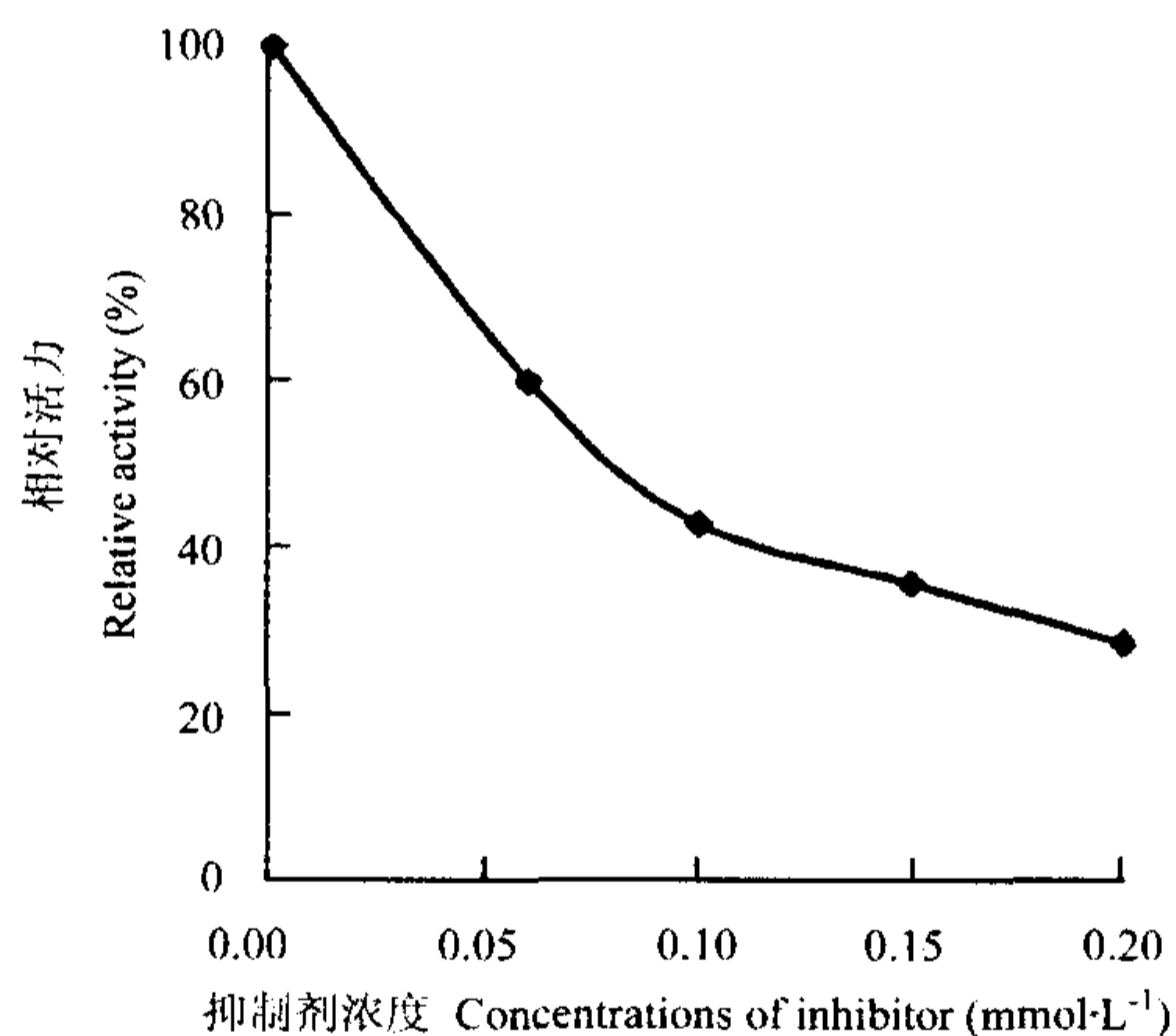


图 2 曲酸对单酚酶稳态酶活力的影响

Fig.2 Effect of kojic acid on the steady-state activity of monophenolase

2.2 铁离子对 PO 单酚酶活力的影响

铁离子是酚氧化酶催化酪氨酸的辅助因子^[11]。由图 4 结果可看出,加入 Fe^{2+} 可以明显缩短该酶催化 L-酪氨酸的迟滞时间,由对照的 255 s 缩短为 70 s; 另外,由图 4 中直线部分的斜率还可看出, Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对该酶稳态酶活力影响不明显。铁离子对曲酸抑制 PO 单酚酶活力的影响如图 5 所示,由图 5 中结果可看出,

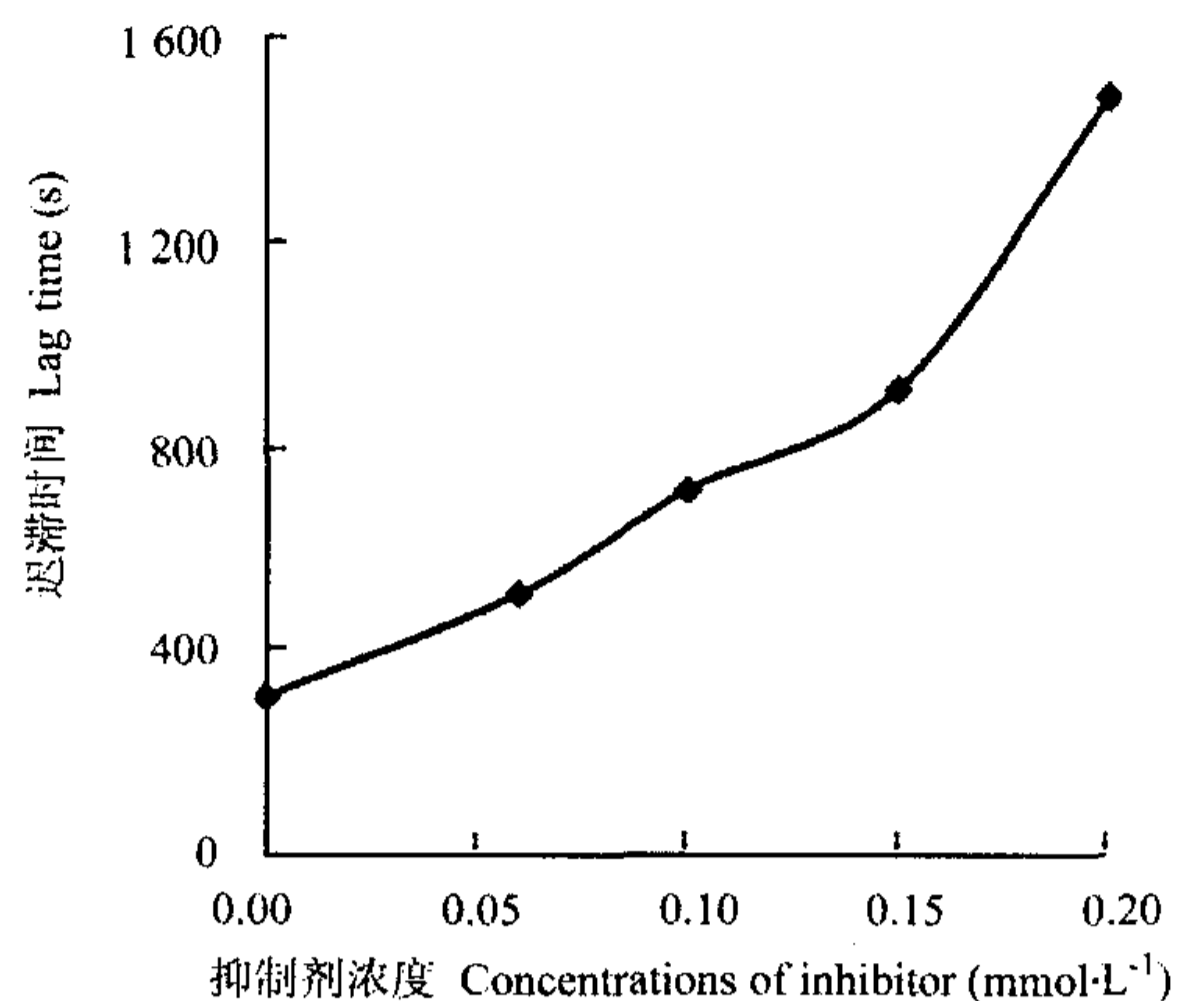


图 3 曲酸对单酚酶迟滞时间的影响

Fig.3 Effect of kojic acid on the lag time of monophenolase

Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 明显地缩短了迟滞时间,其中以 Fe^{2+} 的影响显著,由对照的 1 014 s 缩短为 513 s; 从直线部分的斜率可看出, Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对曲酸抑制 PO 单酚酶稳态酶活力的影响也不明显。试验结果表明,与铁离子直接对 PO 的影响相同,铁离子虽然可以缩短曲酸抑制 PO 单酚酶催化酪氨酸的迟滞时间,但对曲酸抑制该酶稳态酶活力的影响不明显。

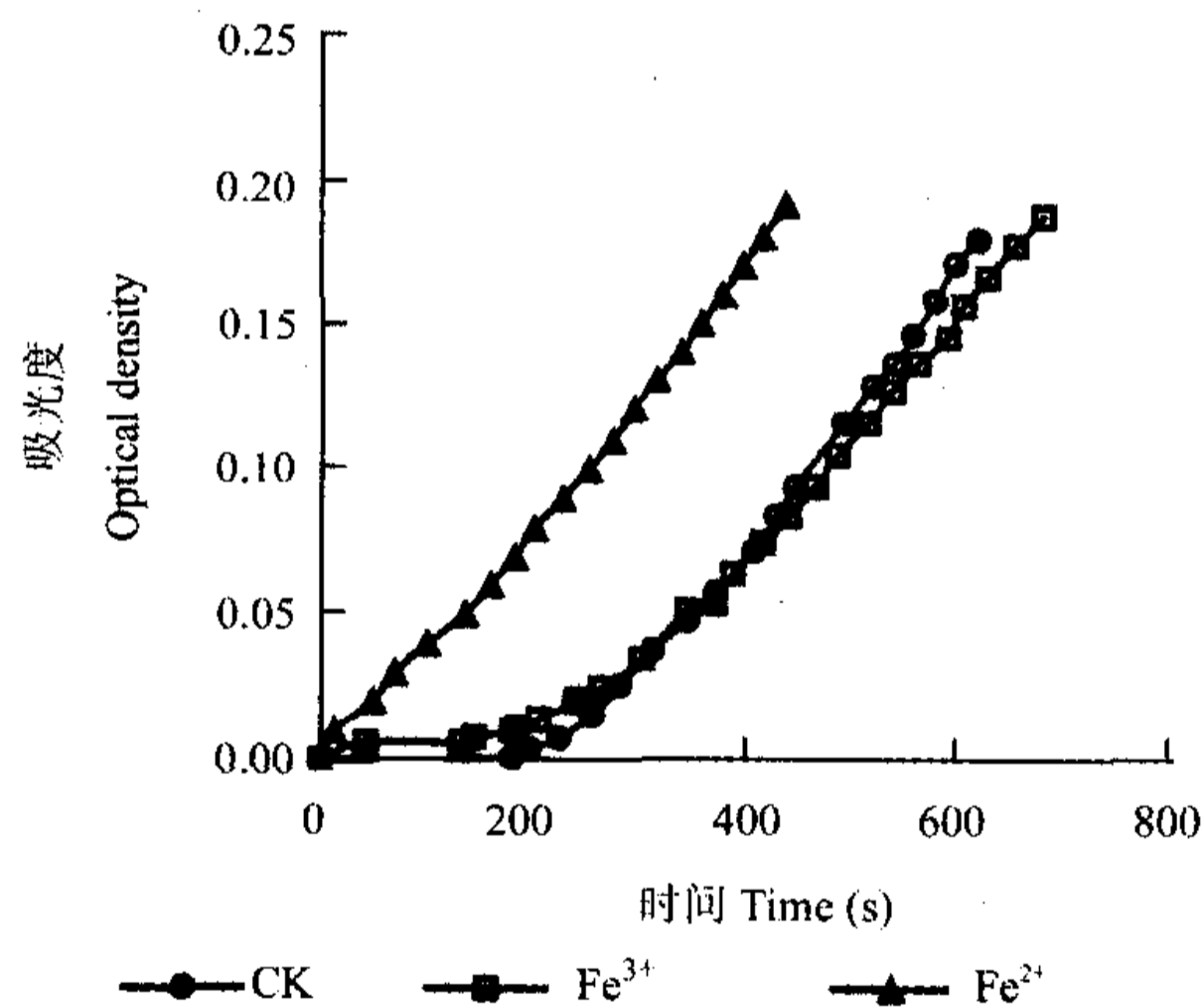


图 4 铁离子对 PO 单酚酶活力的影响

Fig.4 Effect of iron ion on monophenolase activity

2.3 曲酸对 PO 二酚酶活力的影响

以邻苯二酚为底物,测定曲酸对小菜蛾 PO 二酚酶活力。结果表明,在测定时间内,酶反应的进行曲线均为通过原点的直线,产物的形成量与时间成直线正比关系,表明该酶催化邻苯二酚氧化不存在迟滞过程,直线的斜率即为该酶活力。在反应体系中加入曲酸后,直线斜率下降,表明曲酸对该酶有抑制作用。图 6 表示曲酸对二酚酶活力的抑制曲线,由该结果可看出,随着曲酸浓度的增大,酶活力逐渐下降,当曲

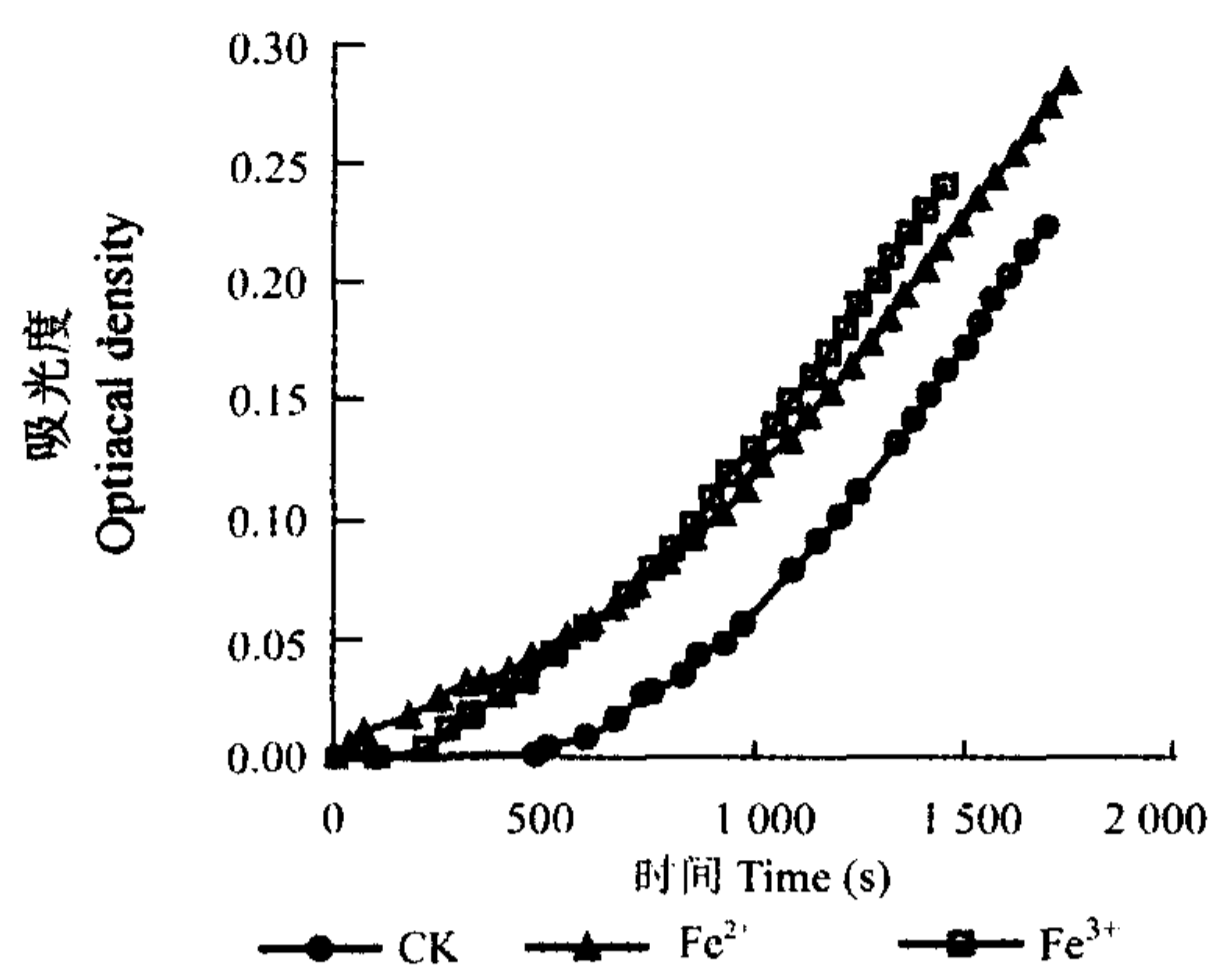


图 5 铁离子对曲酸抑制 PO 单酚酶活力的影响

Fig.5 Effect of iron ion on the inhibition of kojic acid on the monophenolase activity

酸浓度为 $0.8\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 酶活力下降 46.87%, 当曲酸浓度增大至 $1.2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 酶活力下降 56.25%, 由图 6 中该酶活力被抑制趋势线可求出曲酸抑制小菜蛾 PO 活力的抑制中浓度 (I_{50}) 为 $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

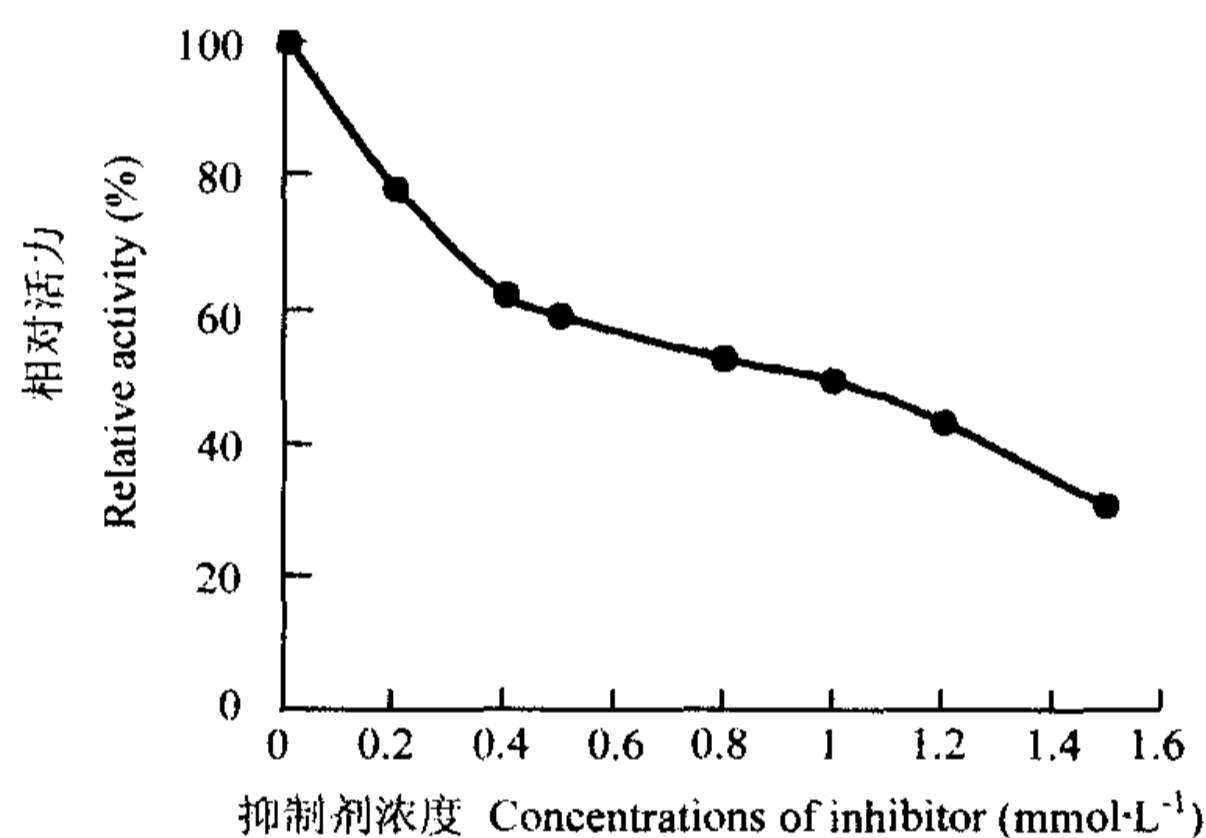


图 6 曲酸对 PO 双酚酶活力的影响

Fig.6 Effect of kojic acid on diphenolase

2.4 曲酸对小菜蛾 PO 的抑制机理及抑制常数

以邻苯二酚为底物, 测定不同曲酸浓度下酶液量对 PO 活力的影响, 如图 7 所示。结果表明, 在设定的曲酸浓度下, PO 活力与酶液量的关系均为通过原点的直线, 说明曲酸抑制该酶活力的反应为可逆性抑制。

以邻苯二酚为底物, 测定不同曲酸浓度下酶活力作图 (图 8), 得到一组相交于纵轴的直线, 此结果表明: 米氏常数 (K_m) 随曲酸浓度的增大而增大, 说明随着曲酸浓度的增大, 酶对底物的亲和力下降, 随曲酸阻碍了底物与酶的结合; 最大反应速率 (V_{max}) 不随曲酸浓度的变化而变化, 增大底物浓度底物浓度变

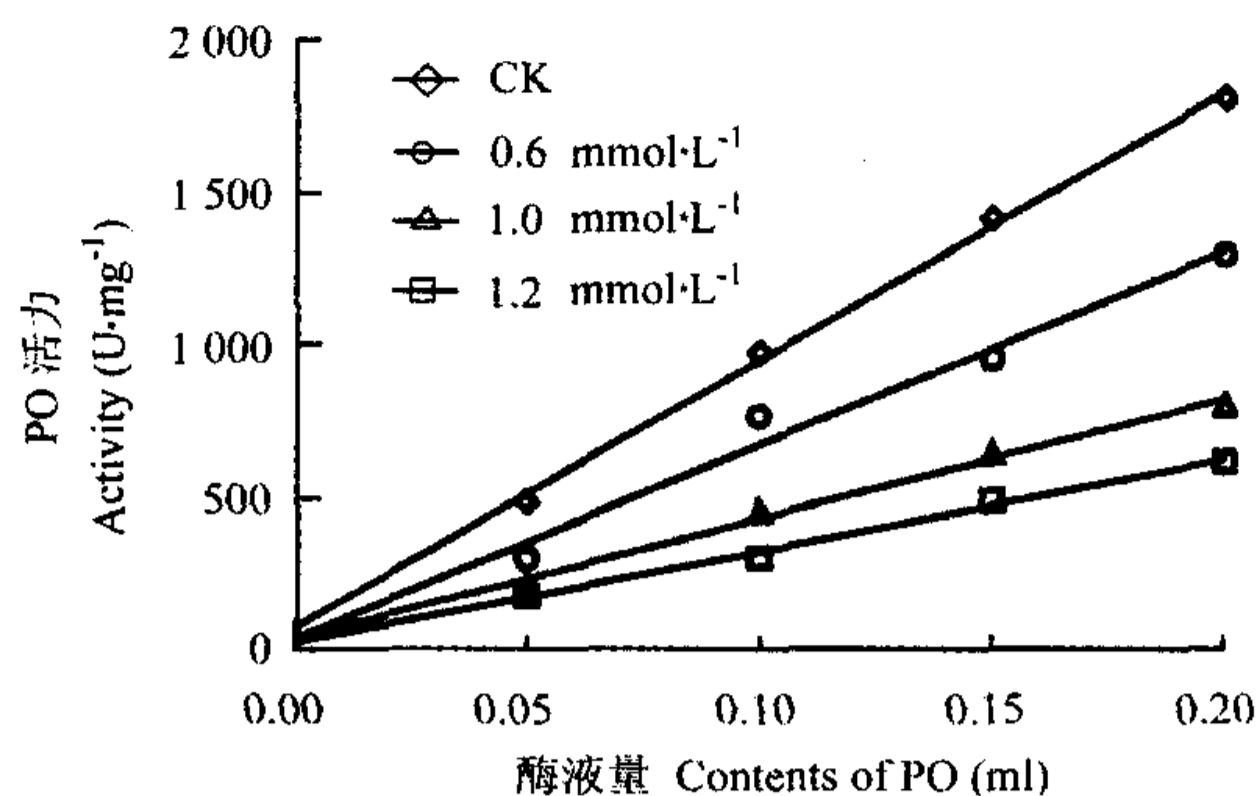


图 7 不同酶液量对 PO 活力的影响

Fig.7 Effect of enzyme concentration on PO activity

化的规律, 以 Lineweaver-Burk 双倒数可消除曲酸对酶的抑制作用, 表明底物与曲酸同酶分子的结合是互相竞争的。综合以上分析结果可得出, 曲酸对小菜蛾 PO 活性的抑制为可逆性竞争抑制作用。以不同曲酸浓度下测定的 K_m 对曲酸浓度作图 (图 8 内插图) 为一条直线, 从该直线的斜率可求得抑制常数 (K_i) 为 $0.47\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.5 铜离子对 PO 活力的影响

将 $0.1\text{ml } 10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 溶液加入到 3ml 的测活体系中测定 PO 活力, 结果与条件相同但无 Cu^{2+} 的对照相比, 前者活力下降 15%, 表明在此浓度下, Cu^{2+} 对 PO 活力有一定的抑制作用。在含有 $0.1\text{ml } 10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 溶液与 $0.1\text{ml } 10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 曲酸溶液的反应体系中, PO 活力明显高于条件相同但无 Cu^{2+} 对照中的 PO 活力, 前者活力提高 35%, 表明 Cu^{2+} 明显地影响曲酸对 PO 活力的抑制。

2.6 曲酸与 PO 预温浴对 PO 酶活力的影响

将 PO 与曲酸预先温浴后, 测定其残余活力, 比对照下降 30%。结果表明, 曲酸可能直接作用于 PO, 从而使 PO 活力降低。因曲酸对二酚酶活力表现为竞争性抑制作用, 表明曲酸和游离酶 (Emet 和 Eoxy) 结合, 又因只有 Edeoxy 能结合氧分子且试验是在反应体系中氧分子饱和的前提下进行的, 说明提前与曲酸温浴的 PO 活性下降不是因为酶与氧分子结合而引起的。 Cu^{2+} 是酚氧化酶催化氧化反应活性中心的重要组成部分^[12], Kubo^[13] 曾报道曲酸能与蘑菇酚氧化酶中的 Cu^{2+} 螯合从而使该酶活性下降。 Cu^{2+} 对 PO 活力影响的测定结果进一步表明, 溶液中的 Cu^{2+} 与 PO 中的 Cu^{2+} 共同竞争曲酸中对 PO 产生抑制作用的 Cu^{2+} 结合位点, 从而影响曲酸对 PO 的抑制, 因此造成预温浴后小菜蛾 PO 活性下降的原因可能是曲酸与 PO 中的 Cu^{2+} 螯合。

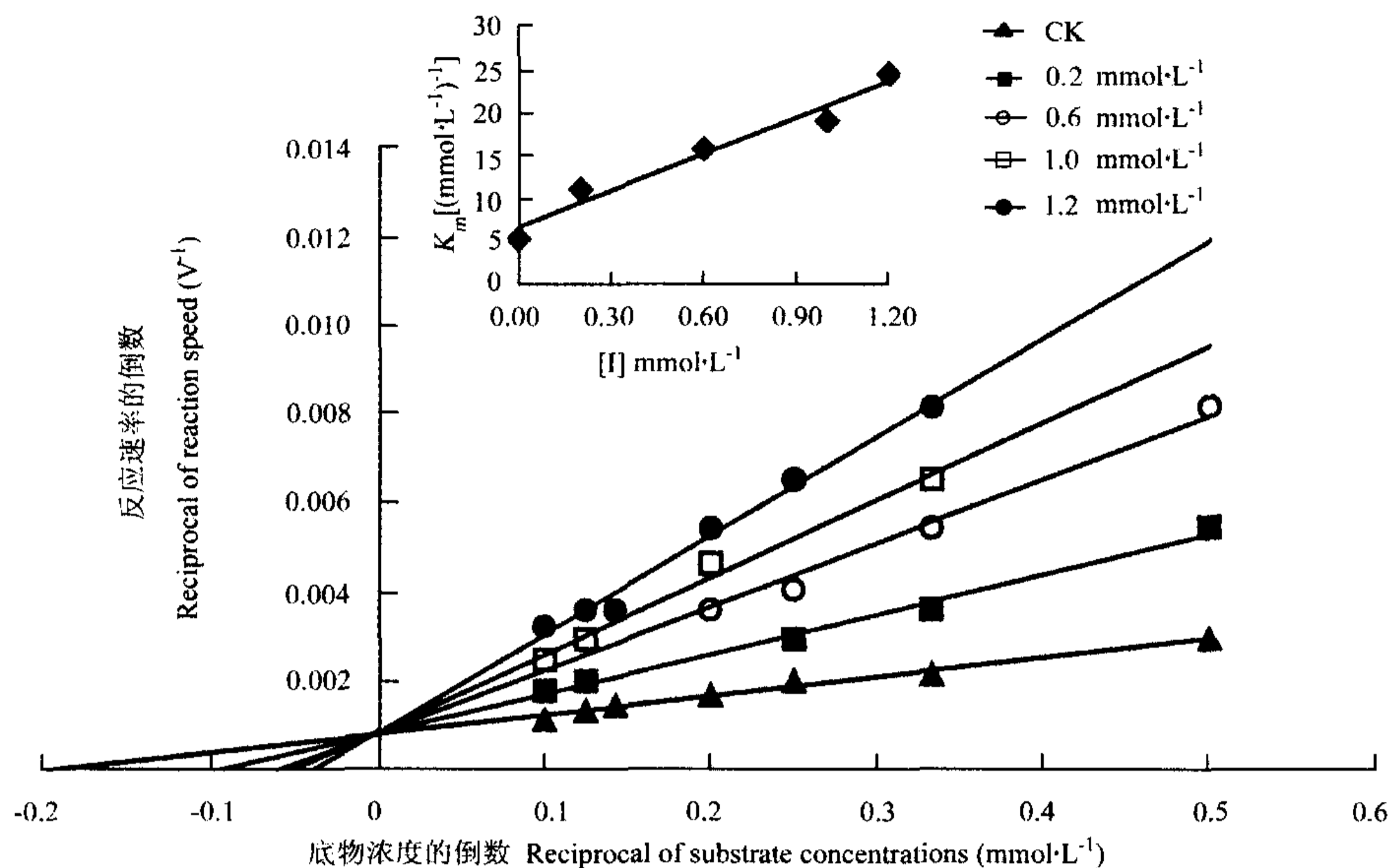


图8 曲酸对PO抑制类型和抑制常数的测定

Fig.8 Determination of the inhibition type and inhibition constant of kojic acid on PO

3 讨论

酚氧化酶具有单酚酶活性和二酚酶活性,可先将酪氨酸羟化产生邻位二羟基苯丙氨酸(单酚酶活性),进一步将其氧化成为相应的醌(二酚酶活性)。在催化作用过程中酶存在3种形式:氧-铜离子态(Eoxy)、铜离子态(Emet)和亚铜离子态(Edeoxy),Emet和Eoxy具有二酚氧化酶特性,Eoxy还具有单酚加羟酶活性,只有Edeoxy能结合氧原子^[14]。

本文以L-酪氨酸为底物,测定的酶活力为单酚酶活力,当加入抑制剂曲酸后,迟滞时间延长,稳态酶活力下降,表明曲酸可降低小菜蛾酚氧化酶的单酚酶活性。究其原因,可能是由于在酚氧化酶的单酚酶活性循环催化反应模型中,Emet型酶虽能和单酚底物结合,但不能进入正常的反应循环,而该步骤可使整个催化反应体系达到稳态所需时间延长,即出现迟滞时间,且迟滞时间的长短也与此步骤相关^[10]。曲酸一方面与Emet型游离酶结合,导致酶催化单酚羟化过程的迟滞时间延长,一方面与Eoxy型游离酶作用,抑制其活性,导致稳态酶活力的下降。迟滞时间可通过过渡的金属离子或二酚的加入被缩短甚至消除^[15],本试验结果表明,铁离子可明显地缩短迟滞时间,但对稳态酶活力的影响不明显。

本文研究得出,曲酸对小菜蛾酚氧化酶二酚酶的抑制作用表现为可逆效应,且表现为竞争性抑制作用,表明曲酸和游离酶(Eoxy和Emet)结合。虽然对于昆虫

酚氧化酶的研究报道较少^[1],且在一些报道中得知不同来源的酚氧化酶的酶学特性存在差异^[16~19],但曲酸对该酶的抑制特性在不同昆虫间却存在统一性^[18,20]。这个结果是很重要的,它指出了曲酸可以作为小菜蛾和甜菜夜蛾酚氧化酶的共同抑制剂。

酚氧化酶是结构复杂的多亚基的含铜氧化还原酶,每一个亚基含2个金属铜离子,2个金属铜离子分别与蛋白质分子中2个平展的组氨酸和1个弱的直立组氨酸配体结合,另有1个内源桥基将2个铜离子联系在一起,构成酚氧化酶催化氧化反应活性中心^[21]。试验结果表明,曲酸可与小菜蛾酚氧化酶中的Cu²⁺作用,影响该酶的催化氧化反应活性中心,从而产生抑制作用。推测曲酸与小菜蛾酚氧化酶中的铜离子螯合可能是其产生抑制作用的重要原因。

近年来,开始有人关注小菜蛾酚氧化酶问题,并从该酶的生化特性、酶活性与该虫发育阶段的关系及曲酸等化合物对不同虫态小菜蛾的生物活性进行了研究^[19,20]。本文研究了曲酸对小菜蛾酚氧化酶的抑制作用,目的是将昆虫酚氧化酶作为研究新型害虫控制剂的“靶标”,寻找能高效抑制该酶的化合物,以这些化合物或其类似物作为开发新型农药的骨架结构,用定量结构活性相关(QSAR)技术研究抑制剂的主要理化参数与抑制酚氧化酶活性的关系来指导抑制剂化合物的分子设计,以便为寻找新型害虫控制剂提供线索。

References

- [1] Ashida M, Yamazaki H. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to activation. Ohnishi E, Ishizaki H. *Molting and Metamorphosis*. Tokyo: Japanese Science Society Press, 1990:239-265.
- [2] 罗克斯坦编, 李绍文译. 昆虫生物化学. 北京: 科学出版社, 1988: 151-153.
Lokstan M (eds.), Li S W (tran.). *Insect Biochemistry*. Beijing: Science Press, 1988: 151-153. (in Chinese)
- [3] Chase M R, Raina K, Bruno J, Sugumaran M. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidase from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 30: 953-967.
- [4] 张宗炳, 冷欣夫. 杀虫药剂毒力及应用. 北京: 化学出版社, 1993:331-337.
Zhang Z B, Leng X F. *Pesticide Toxicology and Application*. Beijing: Chemical Press. 1993:331-337. (in Chinese)
- [5] Niwa Y, Akamasu H. Kojic acid scavenges free radical while potentiating leukocyte function including free radical generation. *Inflammation*, 1991, 15(4): 303-315.
- [6] Wei C I, Huang S Y, Chang K T. Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicol Letters*, 1990, 59:213-220.
- [7] 徐金汗, 黄志鹏, 关 雄. 生物测定虫种-小菜蛾的人工饲养及冷藏. 福建农业大学学报, 1997, 26(2):187-190.
Xu J H, Huang Z P, Guan X. Artificial rearing and low temperature keeping of *Plutella xylostella*. *Journal of Fujian Agricultural University*, 1997, 26(2): 187-190. (in Chinese)
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
- [9] Benjamin N D, Montgomery M W. Polyphenol oxidase of royal ann cherries: purification and characterization. *Journal of Food Science*, 1973, 38:798-806.
- [10] 刘晓丹, 黄 璜, 陈清西. 苯甲酸对蘑菇酪氨酸酶抑制作用机理的研究. 厦门大学学报, 2003, 42(1): 102-106.
Liu X D, Huang H, Chen Q X. Studies on inhibitory effects of benzoic acid on mushroom tyrosinase. *Journal of Xiamen University*, 2003, 42(1): 102-106. (in Chinese)
- [11] 王荫长. 昆虫生物化学. 北京: 中国农业出版社, 2001: 226.
Wang Y C. *Insect Biochemistry*. Beijing: China Agricultural Press, 2001:226. (in Chinese)
- [12] Shahar T, Hennig N, Gufinger T. The tomato 66.3-kDa polyphenoloxidase gene: molecular identification and development expression. *Plant Cell*, 1992, 4:135-147.
- [13] Kobu I, Kins-Hori I. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1999, 47:4 121-4 125.
- [14] S ́nchez-Ferrer A, Rodr ́guez-L ́pez J N, Garc ́a-C ́novas F. Tyrosinase A comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1247:1-11.
- [15] Cabanes J, Garc ́a-C ́novas F, Lozano J A. A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, 790: 101-107.
- [16] Izumi Y, Masami Y, Yohio K. Purification and some physico-chemical properties of phenoloxidase from the Larvae of Housefly. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1980, 44(1): 55-59.
- [17] 程振衡, 梁子才. 亚洲玉米螟血淋巴中酚氧化酶的研究. 昆虫学报, 1990, 33(4):424-429.
Cheng Z H, Liang Z C. Studies on the phenoloxidase in the hemolymph of the Asia cornborer *Ostrinia furnacalis*. *Acta Entomologica Sinica*, 1990, 33(4): 424-429. (in Chinese)
- [18] 高兴祥, 罗万春, 谢桂英, 薛超彬, 丁 琦. 甜菜夜蛾多酚氧化酶的特性及其对曲酸等抑制剂的反应. 中国农业科学, 2004, 37 (5): 687-691.
Gao X X, Luo W C, Xie G Y, Xue C B, Ding Q. Characteristics and kinetics of inhibition polyphenol oxidase from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37(5): 687-691. (in Chinese)
- [19] 梁 沛, 孟凤霞, 高希武, 郑炳宗, 程 刚. 小菜蛾酪氨酸酶生物化学性质研究. 昆虫学报, 2003, 46(5):553-557.
Liang P, Meng F X, Gao X W, Zheng B Z, Cheng G. Biochemical characteristics of tyrosinase in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Acta Entomologica Sinica*, 2003, 46(5): 553-557. (in Chinese)
- [20] 谢桂英, 罗万春, 马 琛. 天然源化合物曲酸对小菜蛾酚氧化酶抑制作用研究初报. 农药学学报, 2003, 5 (1):68-72.
Xie G Y, Luo W C, Ma C. Effect of kojic acid on phenoloxidase activity in Diamondback Moth. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2003, 5 (1): 68-72. (in Chinese)
- [21] Siegbahn P E. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by o-o bond cleavage. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2003, (8):567-576.

(责任编辑 王红艳)