DOI: http://dx.doi.org/10.22092/jaeb.2016.106118
آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۳، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۴

خالص‌سازی و تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی فنل‌اکسیداز همولمف شب‌پره برگ‌خوار توت *Glyphodes pyloalis* (Lep.: Pyralidae)

محبوبه شریفی[۱]، محمد قدمیاری[۲]✉، رضا حسن ساجدی[۳]

۱- دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان ۲- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه گیلان، ۳- گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۴؛ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۴)

چکیده

آنزیم فنل اکسیداز (EC 1.14.18.1)، یکی از آنزیم‌های کلیدی در رشد و ایمنی حشرات می‌باشد و مهار این آنزیم می‌تواند به‌عنوان روشی جدید برای کنترل آفات مورد استفاده قرار گیرد. شب‌پره برگ‌خوار توت (*Glyphodes pyloalis* Walker)، یکی از آفات مهم درختان توت در شمال ایران است که با تغذیه از برگ توت در پرورش کرم ابریشم اختلال ایجاد می‌کند. در این تحقیق، آنزیم فنل‌اکسیداز از همولمف شب‌پره برگ‌خوار توت با استفاده از رسوب با سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی ژل و کروماتوگرافی تبادل یونی خالص شد. وزن ملکولی دو ایزوفرم آنزیم با استفاده از SDS-PAGE به‌ترتیب ۶۹/۶۶ و ۷۰/۵۳ کیلودالتون به‌دست آمد. اثرات بازدارنده‌ها نشان داد که روش مهارکنندگی ۴-هگزیل رسورسینول از نوع رقابتی و اما برای کوئرسین هیدرات و کوجیک اسید از نوع مختلط می‌باشد. هم‌چنین، بررسی ویژگی‌های آنزیمی نشان داد که اسیدیته مطلوب و دمای بهینه آنزیم فنل‌اکسیداز به‌ترتیب برابر با ۷ و ۳۵ درجه سلسیوس بود و آنزیم در دماهای ۴۰، ۴۵ و ۵۰ درجه سلسیوس تا ۳۰ دقیقه پایدار بود. اثر یون‌های فلزی روی آنزیم خالص نشان داد که یون Zn^{2+} کاهشی معنی‌داری بر فعالیت آنزیم داشت.

واژه‌های کلیدی: *Glyphodes pyloalis*، فنل‌اکسیداز، خالص‌سازی، مکانیسم مهارکنندگی.

Purification and biochemical characterization of phenoloxidase from hemolymph of *Glyphodes pyloalis* (Lep: Pyralidae)

M. SHARIFI[1], M. GHADAMYARI[2]✉ and R.H. SAJEDI[3]

1&2 -PhD student and Associate Professor respectively, Department of Plant Protection, University of Guilan,2- Associate Professor, Department of Biochemistry, Tarbiat Modares University

Abstract

Insect phenoloxidase (PO) (EC 1.14.18.1) is the key enzyme in development and immunity of insects. Inhibition of this enzyme could be a new target for pest control. The lesser mulberry snout moth, *Glyphodes pyloalis* Walker is an important pest of mulberry trees in north of Iran. This pest feeds on mulberry leaves and causes serious problems for the silk industries. In this study, PO from hemolymph of *G. pyloalis* was purified by ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography and gel filtration. The apparent molecular weights of two isoforms were determined by SDS-PAGE as 69.66 and 70.53 KDa. The inhibitory kinetics of PO showed that the mechanisms were competitive and mixed inhibition for 4-hexylresorcinol, kojic acid and quercetin, respectively. Optimal pH and maximum temperature for PO activity purified from *G. pyloalis* were 7 and 35 °C, respectively. The purified PO was stable at 40, 45 and 50 ºC for 30 min. The effects of different ions on enzyme activity showed that Zn^{2+} had a significant inhibitory effect.

Key words: *Glyphodes pyloalis*, Phenoloxidase, Purification, Mechanism of inhibitory.

✉ **Corresponding author: mghadamyari@gmail.com**

مقدمه

شب‌پره برگ‌خوار توت (*Glyphodes pyloalis* Walker)، یکی از آفات مهم درختان توت در شمال ایران است که با تغذیه از برگ توت در پرورش کرم ابریشم اختلال ایجاد می‌کند. زمانی که برگ‌های آلوده به فضولات این آفت مورد تغذیه کرم ابریشم قرار می‌گیرد، باعث ایجاد بیماری یبوست در آن‌ها می‌شود. هم‌چنین، این آفت به‌عنوان میزبان ثانویه ویروس‌های پاتوژن عمل کرده و باعث انتقال بیماری به کرم ابریشم می‌شود (Watanabe *et al*., 1988). استفاده از حشره‌کش‌ها برای کنترل شب‌پره برگ‌خوار توت به‌دلیل استفاده از برگ‌های توت برای تغذیه کرم ابریشم، با مشکلاتی همراه است. امروزه، باتوجه به مسأله احتمال وجود باقیمانده آفت‌کش‌ها در محیط‌زیست در اثر سم‌پاشی نامناسب و وارد شدن آن‌ها به چرخه غذایی و در نهایت سمیت آن‌ها بر انسان و افزایش احتمال بروز مقاومت آفات به آفت‌کش‌ها، روش‌های ایمن‌تری در مدیریت تلفیقی آفات مدنظر می‌باشد. یکی از این روش‌ها، استفاده از مواد شیمیایی انتخابی با هدف اثرگذاری بر حشرات و دارا بودن سمیت کم روی انسان به عنوان موجود غیر هدف است.

یکی از آنزیم‌های فعال در ملانیزاسیون و مؤثر در سیستم دفاعی حشرات، فنل‌اکسیداز می‌باشد. تولید o-quinone به وسیله فنل‌اکسیداز به‌عنوان مرحله آغازی در کمپلکس بیوشیمیایی بتا-اسکلروتینیزیشن (beta-skelerotinization) شناخته می‌شود. بیوسنتز کینون و ملانین، فرآیندهایی هستند که چندین نقش مهم در رشد و سیستم ایمنی حشرات ایفا می‌کنند (Ashida and Brey, 1995). فنل‌اکسیداز در برخی از حشرات از قبیل کرم جوانه‌خوار تنباکو (*Helicoverpa virescens*) (Ourth, 1998)، پشه *Aedes aegypti* L. (Burks and Fuchs, 1995)، مگس خانگی (*Musca domestica* L.) (Hera *et al*., 1993)، مگس سرکه (*Drosophila melanogaster* Meigen) (Fugimoto *et al*., 1993)، سفیده کلم (*Pieris rapae* L.) (Xue *et al*., 2006; Wang *et al*., 2007)، شب‌پره هندی (Hartezer *et al*., 2005) (*Plodia interpunctella* Hübner)، مگس *Sarcophaga bullata* Parker (Chase *et al*., 2000)، (Feng *et al*., 2008) *Ostrinia furnicula* Guenée و ابریشم باف ناجور (*Lymantria dispar*) (Yan *et al*., 2009) مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

بازدارنده‌های فنل‌اکسیدازی، از ترکیبات مهمی می‌باشند که در صنایع تولید دارو و مواد آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند و برای انسان و محیط‌زیست ایمن هستند (Xue *et al*., 2006). بنابراین، امروزه حجم عظیمی از پژوهش‌های مربوط به آنزیم فنل‌اکسیداز روی کشف و بررسی عملکرد بازدارنده‌های این آنزیم تمرکز کرده‌اند. از طرفی، از آنجایی‌که آنزیم تیروزیناز در برخی از حشرات مثل کرم شاخ‌دار توتون به‌عنوان یک حشره مدل، مشابه آنزیم تیروزیناز قارچی است، به‌نظر می‌رسد بازدارنده‌های تیروزیناز قارچی توانایی مهار تیروزیناز حشرات را نیز دارند. اکثر مهارکننده‌های تیروزینازی، حاوی ساختار فنلی و یا دارای یک جزء جدا کننده فلزی می‌باشند(Chen *et al*., 2005).

گزارش شده است که پلی‌فنل‌اکسیداز جدا شده از کوتیکول حشرات، فقط فعالیت دی‌فنل‌اکسیدازی دارد، درحالی‌که پلی‌فنل‌اکسیداز جدا شده از همولنف، فعالیت منوفنل‌اکسیدازی را هم نشان می‌دهد (Yamaura *et al*., 1980). پلی‌فنل‌اکسیداز موجود در کوتیکول میگو، هر دو فعالیت را نشان می‌دهد (Sugumaran and Kanost, 1993). نتایج تحقیقات در شرایط زنده (*In vivo*) نشان داده است که ۴-هگزیل رسورسینول (4-hexylresorcinol)، به عنوان یکی از بازدارنده‌های فنل‌اکسیداز، برای شب‌پره برگ‌خوار توت سمی می‌باشد (Sharifi *et al*., 2012). بنابراین، به‌منظور بررسی ویژگی‌های این آنزیم، در این تحقیق آنزیم فنل‌اکسیداز این حشره خالص‌سازی و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن تعیین شد. هم‌چنین، مکانیسم بازدارندگی این آنزیم توسط بازدارنده‌های فنل‌اکسیدازی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

مواد شیمیایی: رزین‌های Sephacryl 100-HR و DEAE Sepharose™fastflow از شرکت GE healthcare، سولفات آمونیوم، دوپامین هیدروکلراید، اسید فسفریک، دی‌متیل فورمامید (DMF) و کوجیک اسید از شرکت مرک آلمان و کوئرسین، ۴- هگزیل رسورسینول از شرکت سیگما-آلدریچ تهیه شدند.

جمع‌آوری حشرات: لاروهای سنین مختلف شب‌پره برگ‌خوار توت از مرکز تحقیقات کرم ابریشم واقع در روستای پسی‌خان در اطراف شهرستان رشت، استان گیلان جمع‌آوری شد. لاروهای این حشره در اتاقک رشد با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۱۰ ± ۶۰ درصد و دوره روشنایی- تاریکی ۸:۱۶ ساعت روی برگ‌های تازه درخت توت (واریته کن‌موچی) پرورش داده شد. از ظروف مکعبی شفاف با ابعاد ۱۰ × ۵ × ۱۰ سانتی‌متر (هر ظرف حاوی ۵ عدد لارو) برای پرورش استفاده شد و لاروهای سن آخر برای انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

نحوه تهیه همولمف: اولین پای کاذب قطع و همولمف خارج شده از بدن لارو شب‌پره برگ‌خوار توت با استفاده از لوله‌های مویین ۵۰ میکرولیتری جمع‌آوری شد. نمونه‌های همولمف بعد از جمع‌آوری به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل گردیدند. سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی به عنوان منبع آنزیم استفاده شد (Wang *et al.*, 2007).

محلول سوبسترا برای سنجش فعالیت آنزیم دی‌فنل‌اکسیداز: محلول اولیه سوبسترا با غلظت ۶۰ میلی‌مولار دوپامین هیدروکلراید (با وزن مولکولی ۱۸۹/۶g/mol) در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH: ۷، دی‌متیل فورمامید (DMF) ۲ درصد (v/v) و ۵ میلی‌مولار MBTH (۲-متیل ۳-بنزوتیازولوهیدرازون) تهیه شد و از این محلول برای تمام سنجش‌ها استفاده گردید (Robb, 1984).

سنجش فعالیت آنزیم دی‌فنل‌اکسیداز: فعالیت آنزیم دی‌فنل‌اکسیداز مطابق روش Robb (۱۹۸۴) به روش اسپکتروفتومتری به‌وسیله دستگاه میکروپلیت ریدر مدل Microplate reader Stat Fax 3200® در دمای محیط با ردیابی افزایش جذب در ۴۹۰nm تعیین شد. محیط سنجش شامل ۱۰ میکرولیتر محلول آنزیمی، ۵۰ میکرولیتر محلول تازه سوبسترا و ۴۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH: ۷ بود. به منظور تعیین فعالیت آنزیمی، از ضریب خاموشی $M^{-1}.cm^{-1}$ ۳۷۰۰ برای محصول استفاده شد. فعالیت بر اساس میکرومول محصول بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین ارائه شد.

خالص‌سازی آنزیم فنل‌اکسیداز: محلول‌رویی حاصل از سانتریفیوژ همولمف لاروهای سن آخر با آمونیوم سولفات ۸۰ درصد روی یخ رسوب داده شد. سپس، به‌مدت ۴-۵ ساعت در یخچال به‌صورت ثابت قرار گرفت و پس از آن، در ۷۰۰۰× g به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید، سپس قسمت رونشین تخلیه شده و رسوب پروتئین در یک میلی‌لیتر از بافر تریس ۷: pH حل و در کیسه‌های مخصوص (ساخت شرکت سیگما-آلدریچ به قطر ۲۳ میلی متر که می تواند پروتئین‌های بالای ۱۲ کیلو دالتون را در خود نگه‌دارد(pore size: 12,000 Da MWCO)، به‌مدت ۲۴ ساعت در معرض همان بافر دیالیز ۳ بار تعویض بافر شد (Wang *et al.*, 2007).

کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و تبادل یونی: با رزین Sephacryl 100-HR انجام شد (Wang *et al.*, 2007) و از رزین DEAE Sepharose™ fast flowبرای خالص‌سازی با تکنیک تبادل یونی استفاده شد. فرکشن[1]های حاصل از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با بالاترین فعالیت آنزیمی، در ستون تبادل یونی بارگذاری شد. سپس، با استفاده از غلظت‌های نمکی ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ مولار آنزیم از ستون خارج و در فرکشن‌های یک میلی‌لیتری جمع‌آوری شدند.

تعیین pH و دمای بهینه برای فعالیت آنزیم: به منظور بررسی اثر pH روی فعالیت آنزیم فنل اکسیداز، ابتدا pHهای

۱-Fraction

مختلف از ۳ تا ۱۲ با بافر مخلوط استیک- گلایسین-فسفات ۵۰ میلی‌مولار تهیه شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم از روش سنجش یاد شده استفاده گردید. هم‌چنین، اثر دماهای مختلف (۲۵، ۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵ و ۸۵ درجه سلسیوس) روی فعالیت آنزیم در اسیدیته مطلوب بررسی شد. به این صورت که مخلوط همه محلول‌های مورد آزمایش را درون میکروتیوپ ریخته و به‌مدت پنج دقیقه در دمای مور نظر قرار گرفت و سپس جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی میزان پایداری دمایی آنزیم: در داخل هر میکروتیوپ ۹۰ میکرولیتر بافر فسفات pH: ۷ و ۱۰ میکرولیتر آنزیم ریخته و به‌ترتیب به‌مدت صفر، ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ دقیقه در دمای بهینه و ۵ درجه بالاتر و پایین‌تر از دمای بهینه قرار داده شد (Yapi *et al.*, 2009). پس از گذشت مدت زمان مقرر، محتویات میکروتیوپ در چاهک پلیت الایزا ریخته و به آن محلول سوبسترا اضافه و جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر به‌صورت پیوسته خوانده شد.

بررسی مکانیسم بازدارندگی آنزیم توسط بازدارنده‌ها: جهت تعیین مکانیسم بازدارندگی، اثر غلظت‌های I_{50} و I_{25} کوئرسین، کوجیک اسید و ۴-هگزیل رسورسینول روی پارامترهای کینتیکی آنزیم خالص بررسی شد (Yan *et al.*, 2009). اثر این دو غلظت بازدارنده در غلظت‌های مختلف سوبسترا (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۳۰، ۱۵، ۱۰ و ۵ میلی‌مولار) روی آنزیم فنل‌اکسیداز بررسی شد، سپس، با محاسبه ثابت میکائیلیس-منتن (*Km*) و حداکثر سرعت (*Vmax*) آنزیم در حضور و عدم‌حضور بازدارنده، نوع مکانیسم مهارکنندگی آنزیم مشخص گردید.

بررسی اثر یون‌های فلزی روی فعالیت آنزیم: برای بررسی اثر یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز، ابتدا در داخل هر چاهک ۱۰ میکرولیتر نمونه، ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات pH: ۷ و ۴۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت یون‌های فلزی، اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، بقیه مراحل مانند سنجش فعالیت آنزیم انجام گرفت. در این تحقیق یون‌ها در دو غلظت ۵ و ۲۰ میلی‌مولار روی آنزیم بررسی شد (Liu *et al.*, 2006).

تعیین غلظت پروتئین: میزان پروتئین موجود در نمونه‌ها، براساس روش برادفورد با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تخمین زده شد (Bradford, 1976).

زایموگرام دی‌فنل‌اکسیداز و الکتروفورز SDS-PAGE : در زایموگرام از ژل جداکننده ۱۰ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز، ابتدا ژل در محلول حاوی ترایتون ۲/۵٪ به‌مدت یک ساعت روی شیکر قرار داده شد و سپس درون محلول سوبسترا به‌مدت ۱۲ ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفت. آن‌گاه، ژل با آب مقطر چندین بار شستشو و باندهای به رنگ تیره در زمینه صورتی روی ژل مشخص شدند. در SDS-PAGE در هر میکروتیوپ ۲۵-۳۰ میکرولیتر نمونه به اضافه ۷ میکرولیتر بافر نمونه احیایی با مرکاپتواتانول ریخته به‌مدت ۵ دقیقه آن را جوشانده و در چاهک ژل بارگذاری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش‌ها در سه یا چهار تکرار انجام شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد و با نرم‌افزار SAS (۱۹۹۷) انجام شد.

نتیجه و بحث

آنزیم فنل‌اکسیداز در طیف وسیعی از موجودات شامل گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و حیوانات وجود دارد. این سیستم آنزیمی نقش مهمی در رشد و نمو و ایمنی حشره دارد و می‌تواند مکان هدف تعدادی از بازدارنده‌ها باشد. با توجه به اهمیت این آنزیم در سیستم ایمنی حشرات و فراهم آوردن اطلاعات پایه، در این تحقیق آنزیم موردنظر از شب‌پره برگ‌خوار توت خالص‌سازی و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت.

خالص‌سازی آنزیم فنل‌اکسیداز: نتایج حاصل از خالص‌سازی آنزیم فنل‌اکسیداز موجود در همولمف

شب‌پره توت با استفاده از تکنیک‌های مختلف در جدول یک نشان داده شده است. در روش ژل فیلتراسیون، هر بار ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه در ستون بارگذاری و ۲۵ فرکشن یک میلی‌لیتری جمع‌آوری شد. سپس، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب پروتئین هر فرکشن اندازه‌گیری شد (شکل A۱). فرکشنی که دارای بیش‌ترین میزان فعالیت بود (فرکشن۱۲) در ستون تبادل یونی به‌میزان ۸۰۰ میکرولیتر بارگذاری و ستون ابتدا با بافر بدون نمک به‌عنوان بافر شست‌وشو و پس از آن، با غلظت‌های نمکی مختلف شست‌وشو شد. نتایج نشان داد که فقط در دو فرکشن بافر شست‌وشو (بدون نمک) فعالیت آنزیم مشاهده می‌شود (شکل ۱ B). وجود فعالیت در دو فرکشن اولیه ستون تبادل یونی، نشان‌دهنده آن است که این آنزیم نتوانسته به ستون متصل شود، اما بقیه پروتئین‌های مزاحم موجود در فرکشن بارگذاری شده به رزین موجود در ستون متصل شده و از آنزیم جدا شده‌اند و از این طریق امکان خالص‌سازی آنزیم فراهم شده است. استفاده از رزین‌های مختلف تبادل یونی نشان داد که این آنزیم خیلی ناپایدار بوده و در صورت پیوند شدن به رزین، جدا کردن آن با غلظت‌های نمکی باعث غیرفعال شدن آنزیم می‌شود. با توجه به بررسی منابع، بیش‌تر محققین از ستون تبادل یونی برای خالص‌سازی این آنزیم استفاده نکرده‌اند. به‌نظر می‌رسد ستون تبادل یونی تنها زمانی در مورد خالص‌سازی این آنزیم مناسب است که آنزیم به ستون باند نشده و با بافر شست و شو از ستون خارج شود.

کاهش فعالیت و غیرفعال شدن آنزیم طی خالص‌سازی سبب شده بود که تا مدت‌ها اطلاعات بسیار کمی درباره ویژگی‌های اختصاصی این آنزیم وجود داشته باشد (Sugumaran and Kanost,1993). در این تحقیق، نیز مشخص شد که پس از خالص‌سازی، درصورت نگهداری آنزیم در فریزر میزان فعالیت آن، پس از ۴۸ ساعت به‌شدت کاهش پیدا کرد. به‌همین دلیل، پیشنهاد می‌شود بلافاصله پس از خالص‌سازی ویژگی‌های بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گیرد.

جدول ۱- مشخصات مراحل خالص‌سازی آنزیم فنل‌اکسیداز از همولمف شب‌پره برگ‌خوار توت

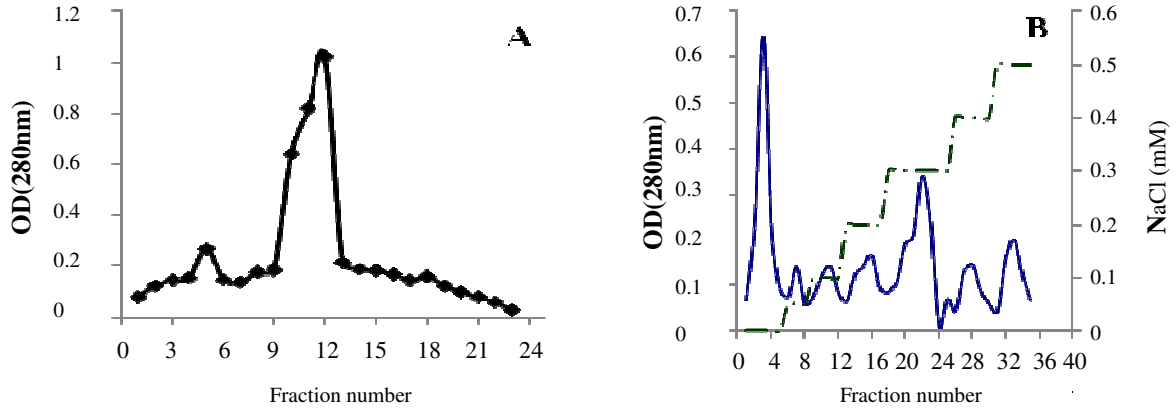
Table 1. Purification steps of the PO from the hemolymph of *Glyphodes pyloalis*

Purification steps	Total activity (U)	Total protein (mg)	Recovery (%)	Specific activity (U/mg)	Purification Fold
Crude extract	21.55	19.21	100	1.35	-
Ammonium sulfate 80%	4.85	1.45	5.22	2.82	2.1
Sephacryl 100-HR	1.03	0.42	2.18	4.9	3.62
DEAE Sepharose	0.467	0.088	0.45	6.32	4.68

الکتروفورز SDS-PAGE و زایموگرام: پس از انجام الکتروفورز SDS-PAGE و ظهور باندها در ژل، مشاهده شد که پروتئین موردنظر خالص شده است (شکل ۲) و دو ایزوفرم از فنل‌اکسیداز در شب‌پره برگ‌خوار توت وجود دارد که براساس رابطه بین Rf (فاصله پیموده شده توسط نمونه تقسیم بر فاصله طی شده توسط رنگ) و لگاریتم وزن مولکولی مارکر پروتئینی موجود، وزن ملکولی فنل‌اکسیداز شب‌پره برگ‌خوار توت برابر با ۶۹/۶۶ و ۷۰/۵۳ کیلو دالتون به‌دست آمد. بنابراین، آنزیم فنل-اکسیدازشب‌پره برگ‌خوار توت، دارای دو ایزوفرم با وزن ملکولی نزدیک به‌هم هستند (شکل‌های ۲ و ۳). بر اساس نتایج لیو و همکاران در سال ۲۰۰۶ وزن مولکولی این آنزیم به مقدار زیادی به ایزوفرم، وضعیت فعال بودن و گونه موجود مورد مطالعه وابسته است و برای فعال شدن پروفنل‌اکسیداز و تبدیل آن به فنل‌اکسیداز فعال، ۵-۱۵ کیلودالتون از وزن فرم غیرفعال

آن کم می‌شود (Liu *et al.*, 2006). پارک و همکاران وزن پروفنل‌اکسیداز پروانه سفید اشجار (*Hyphantria cunea*Drury) را ۸۰ کیلو دالتون محاسبه کرده که با فعال شدن آن، وزن مولکولی آنزیم موردنظر به ۷۰ کیلو دالتون می‌رسد. وزن ملکولی این آنزیم در حشرات بیش‌تر از ۶۰ کیلو دالتون است. طی جدا سازی cDNA مربوط به پروفنل‌اکسیداز موجود در کل بدن لارو پروانه سفید اشجار، مشخص شد که این آنزیم از ۹۶۷ آمینواسید تشکیل شده و وزن مولکولی آن ۸۰/۲ کیلو دالتون می‌باشد (Park *et al.*, 1997). هال و همکاران در سال ۱۹۹۵ آنزیم پروفنل‌اکسیداز کرم شاخدار توتون را با استفاده از ستون ژل فیلتراسیون (Sephacryl S-100) خالص نموده و وزن مولکولی آن را تقریباً ۱۰۰ کیلو دالتون گزارش کرده‌اند (Hall *et al.*, 1995). کووان و همکاران در سال ۱۹۹۷ با انجام شش مرحله خالص‌سازی روی فنل‌اکسیداز *Holotrichia omphalia* با مجموعه‌ای از تکنیک‌های ژل فیلتراسیون و تبادل یونی این آنزیم را خالص کردند و وزن مولکولی آن را ۷۹ کیلو دالتون تخمین زدند. ژوفلاتو و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده ستون ژل فیلتراسیون Sepharose CL-6B فنل‌اکسیداز موجود در همولمف زنبور عسل را خالص‌سازی کرده و وزن مولکولی آن را ۷۰ کیلو دالتون تخمین زده‌اند (Zufelatoa *et al.*, 2004). برخی از محققین نیز با استفاده از ستون ژل فیلتراسیون Sephadex G-100 توانستند به‌ترتیب آنزیم فنل‌اکسیداز موجود در کل بدن لاروهای پروانه‌های *P. rapae*، *L. dispar* و *Spodoptera exigua* Hübner را تا حدودی خالص نموده و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن را بررسی نمایند (Xue *et al.*,2006;Yan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

بررسی اثرات pH روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز: اثر pH روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز در دمای اتاق نشان داد که میزان محصول واکنش (دوپاکروم) تولید شده در pH:۷ بیشترین مقدار است. در pH بالاتر یا پایین‌تر از pH مطلوب، میزان فعالیت آنزیم به‌شدت کاهش پیدا می‌کند و میزان فعالیت آنزیم در pH۱۱ به کمتر از ۳۰ درصد می‌رسد (شکل ۴ A).



شکل ۱- الگوی توزیع جذب پروتئین‌های موجود در فرکشن‌های (در ۲۸۰ نانومتر) حاصل از ستون‌های مختلف. الف- ژل فیلتراسیون Sephacryl 100-HR .. ب- ستون تبادل یونی DEAE Sepharose TM fast flow. خطوط نقطه‌چین نشان‌دهنده شیب غلظت NaCl است

Fig. 1. Elution OD profiles at 280 nm from different columns. A. Sephacryl 100-HR gel-filtration chromatography. B. DEAE Sepharose TM fast flow ionexchange; Dashedline shows NaCl gradient concentrations

از آن‌جایی‌که pH بر گروه‌های فعال مرتبط با عملکردهای کاتالیکی یک آنزیم اثرگذار است، نتایج نیز نشان داد که سرعت فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز به‌شدت تحت تأثیر pH می‌باشد و pH مناسب برای کاتالیز L-DOPA در آفت مورد مطالعه، ۷ می‌باشد. pH مطلوب برای فعالیت فنل‌اکسیداز *M. domestica* بین ۶/۵ تا ۷/۵ و برای شفیره *S. bullata* ۷ تخمین زده شده است (Hara *et al.*, 1993؛ Wang *et al.*, 2004). Zufelatoa *et al.* (2004) نشان دادند که pH مناسب برای

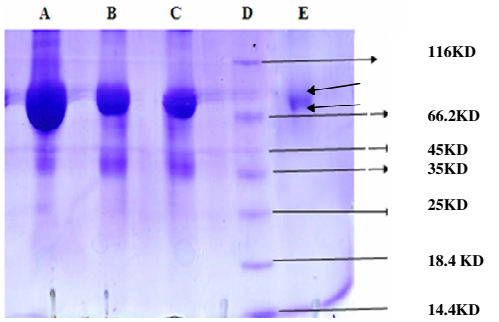
فنل‌اکسیداز خالص شده از همولمف شفیره زنبور عسل ۶/۵ می‌باشد. به‌علت ویژگی‌های بافری همولمف، به‌نظر می‌رسد فنل‌اکسیداز در همولمف حشرات، مخصوصاً در راسته بالپولکداران در شرایط خنثی فعال باشد. به‌طور مثال pH=۶ برای پروانه کرم ابریشم *Bombyx mori* L. (Ashida, 1971)، حدود ۷/۵ برای *Galleria mellonella* L. (*Dunphy, 1991*)، ۷/۵– ۷ برای *S. littoralis*، ۸ برای *L. dispar* (Lee and Anstee, 1995) و ۷ برای *P. rapae* (Xue *et al*., 2006) به‌عنوان pH بهینه گزارش شده است. این تفاوت در میزان pH به‌گونه مورد مطالعه و شرایط زندگی گونه‌ها مربوط می‌باشد (Kobayashi *et al*., 1995).

بررسی اثرات دما و پایداری دمایی روی فعالیت آنزیم

فنل‌اکسیداز: نتایج حاکی از این است که آنزیم فنل‌اکسیداز در دمای ۴۵ درجه سلسیوس بیش‌ترین میزان فعالیت را از خود نشان می‌دهد. در ۱۰ درجه بالاتر و پایین تر از این دما، میزان فعالیت این آنزیم ۲۰ تا ۲۵ درصد کاهش پیدا می‌کند. این کاهش فعالیت در دیگر دماها به بیش‌تر از ۴۵ درصد می‌رسد (شکل ۴ B).

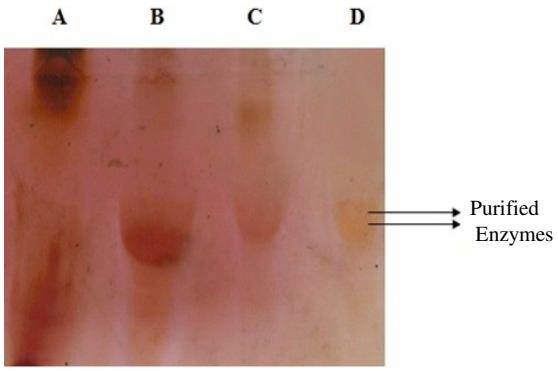
جهت بررسی پایداری این آنزیم از سه درجه حرارت ۴۰، ۴۵ و ۵۰ درجه سلسیوس استفاده شد. مشاهدات نشان داد که آنزیم تا حدود ۱۵ دقیقه اول در هر سه دمای مورد استفاده پایدار ماند و بعد از آن، به‌شدت کاهش فعالیت مشاهده شد تا اینکه پس از یک ساعت، درصد فعالیت بسیار کاهش یافت (شکل ۴ C).

عملکردهای بیولوژیکی در بدن موجودات زنده به‌وسیله آنزیم‌ها کاتالیز می‌شوند و با افزایش دما میزان فعالیت بیولوژیکی این کاتالیزورها افزایش می‌یابد، اما این افزایش تا زمانی است که ساختار سه‌بُعدی آنزیم به‌هم نخورد (Nelson, 2010). همان‌طور که در نتایج مربوط به دما مشاهده می‌شود دمای مناسب برای فنل‌اکسیداز شب‌پره برگ‌خوار توت ۴۵ درجه سلسیوس می‌باشد درحالی‌که دمای مناسب برای فعالیت فنل‌اکسیداز شفیره زنبور عسل ۲۰ درجه سلسیوس (Zufelatoa *et al*., 2004)، ملخ صحرایی مهاجر ۳۰–۳۵ درجه سلسیوس (Cherqui *et al*., 1996) و مگس خانگی ۴۵–۵۰ درجه سلسیوس (Hara *et al*., 1993) گزارش شده است. اما در اغلب گونه‌های مربوط به بالپولکداران مثل پروانه سفید کلم (Xue *et al*., 2006) و *H. virescens* (Lockey and Orth, 1992) دمای مناسب برای آنزیم فنل‌اکسیداز بین ۳۵–۴۵ درجه سلسیوس می‌باشد.



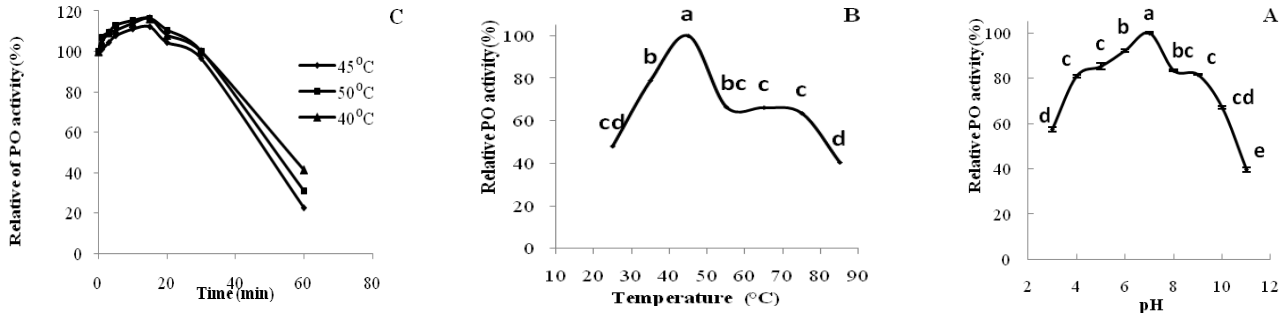
شکل ۲- الکتروفورز SDS-PAGE محلول استخراجی از مراحل مختلف خالص‌سازی آنزیم فنل‌اکسیداز شب‌پره برگ‌خوار توت. A: همولمف،B: اشباع با آمونیوم سولفات، C: ژل فیلتراسیون، D: مارکر پروتئینی، E: کروماتوگرافی تبادل یونی

Fig 2. The SDS-PAGE of PO at different steps of enzyme purification from *Glyphodes pyloalis*.Line A: crude extract; Line B: ammonium sulfate; Line C: Sephacryl 100-HR; Line E: DEAE Sepharose™ fast flow (2.7 μg protein; PO activity = 7.36 U/mg protein); LineD: marker



شکل ۳- زایموگرام فنل‌اکسیداز مربوط به مراحل مختلف خالص‌سازی فنل اکسیداز شب‌پره برگ‌خوار توت. A: همولمف، B: بعد از دیالیز، C: ژل فیلتراسیون، D: کروماتوگرافی تبادل یونی

Fig 3. The zymogram of PO at different steps of enzyme purification from *Glyphodes pyloalis*.Line A: crude extract; Line B: ammonium sulfate; Line C: Sephacryl 100-HR; Line D: DEAE Sepharose™ fast flow (2.7 μg protein; PO activity = 7.36 U/mg protein)



شکل ۴- اثر pH (A)، دما (B) برفعالیت و پایداری دمایی (C) آنزیم فنل‌اکسیداز خالص شده از شب‌پره برگ‌خوار توت (*میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون توکی $P < 0.05$))

Fig 4. Effects of pH and temperature on activity and thermostability of PO purified from *Glyphodes pyloalis* (*Different letters (a–e) indicate significant differences in relative activity (Tukey's test, $P < 0.05$))

همان‌طورکه در شکل۴ C مشاهده می‌شود الگوی پایداری آنزیم فنل‌اکسیداز برای هر سه دمای انتخابی مشابه می‌باشد. در هر سه دما، آنزیم فنل‌اکسیداز تا ۳۰ دقیقه اول تقریباً توانسته تا حدود ۸۵ درصد از فعالیت خود را حفظ کند، اما با گذشت نیم ساعت به یک‌باره فعالیت آنزیم به‌شدت کاهش پیدا کرده است و به کمتر از ۵۰ درصد رسید. تحقیقات ژوفلانتو و همکاران در سال ۲۰۰۴ (Zufelatoa *et al*., 2004) در مورد پایداری دمایی فنل‌اکسیداز شفیره زنبور عسل نشان داد که این آنزیم در دمای مطلوب خود حداقل در نیم ساعت اول تقریباً فعالیت خود را حفظ می‌کند، اما آنزیم فنل‌اکسیداز مگس خانگی (Hara *et al*., 1993) و ایزوفرم A_3 از مگس خانگی (Feng *et al*., 2008) می‌تواند پایداری خود را به‌مدت یک ساعت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس حفظ کند.

بررسی اثرات یون‌های فلزی بر فعالیت آنزیم فنل-اکسیداز: همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود برخی از مواد شیمیایی اثر کاهشی روی فعالیت آنزیم دارند، به‌ویژه یون روی (Zn^{2+}) که تا ۷۰ درصد فعالیت آنزیم را کاهش می‌دهد و تعدادی از یون‌های فلزی تأثیر معنی‌داری روی فعالیت آنزیم ندارند.

اتصال یون‌های فلزی، تأثیر معنی‌داری روی ساختار دوم پلی‌پپتیدهای دارای عناصر فلزی دارند و ساختار دوم آنزیم فنل‌اکسیداز خالص‌سازی شده از *Ostrinia furnicula* دارای β–sheet کمتر از ۱۴/۳۳ درصد و α–helix بیشتر از ۳۷/۲۸ درصد می‌باشد. به‌نظر می‌رسد هنگامی که یون‌های فلزی به محلول فنل‌اکسیداز خالص شده وارد می‌شوند، منجر به تجمع ساختارهای β–sheet شده و باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌گردد (Feng *et al*., 2008). البته این موضوع در مورد فنل‌اکسیداز شب‌پره برگ‌خوار توت نیاز به بررسی دارد.

اثر چندین یون فلزی (۲۰mM) روی فعالیت فنل‌اکسیداز همولمف شب‌پره برگ‌خوار توت نشان داد که فعالیت آنزیم در تیمار با یون کلسیم برابر با شاهد است و دیگر یون‌ها تا حدودی باعث کاهش عملکرد آنزیم شده‌اند و فقط یون روی به‌صورت معنی‌داری سبب کاهش فعالیت نسبی آنزیم تا زیر ۲۵ درصد می‌شود. یان و همکاران (Yan *et al*., 2009). در تحقیقی اثر یون‌های فلزی را روی آنزیم فنل‌کسیداز پروانه ابریشم‌باف‌ناجور که تا حدودی خالص‌سازی شده، بررسی کردند. این تحقیق نشان داد که یون‌های قلیایی مثل پتاسیم اثر بسیار جزئی روی فعالیت این آنزیم دارند. غلظت بیش از ۴ میلی‌مولار یون منیزم روی فعالیت آنزیم اثر مهارکنندگی دارد، اما در غلظت‌های پایین‌تر از آن اثر افزایشی روی فعالیت آنزیم نشان می‌دهد. یون مس روی فعالیت آنزیم اثر متغیری دارد، بدین‌معنا که کاهش یا افزایش غلظت این یون، ممکن است

سبب کاهش یا افزایش فعالیت آنزیم شود. یون روی نیز چنین عملکردی را از خود در مورد پروانه ابریشم‌باف ناجور نشان می‌دهد و یون منگنز در اکثر موارد تأثیر معنی‌داری روی فعالیت آنزیم ندارد.

جدول۲- اثر یون‌های فلزی و EDTA روی فعالیت فنل اکسیداز خالص شده از همولمف شب‌پره برگ‌خوار توت

Table 2. Effect of metal ions and EDTA on thepurified PO from haemolymph of *Glyphodes pyloalis*

Compounds	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control	0	100 ± 0.003 (a)
$FeCl_2$	5	70.66 ± 0.007 (bc)
$MgCl_2$	5	82.4 ± 0.006 (abc)
$BaCl_2$	5	81.61 ± 0.007(bc)
KCl	5	76.15 ± 0.004(bc)
EDTA	5	59.43 ± 0.009 (c)
$MnCl_2$	5	69.06 ± 0.01(bc)
$CaCl_2$	5	99.8 ± 0.003 (a)
$Hg2Cl_2$	5	90.98 ± 0.002(ab)
$CoCl_2$	5	65.66 ± 0.009(c)
$ZnCl_2$	۵5	31.06 ± 0.004 (d)

×میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (آزمون توکی $P < 0.05$)

* Different letters (a–c) indicate that the relative activity of enzymes is significantly different from each other by Tukey's test ($P < 0.05$).

هم‌چنین، گزارش شده‌است که یون کلسیم اثر افزاینده روی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز *H. virescenrs* و *S. littoralis* دارد (Lockey and Orth, 1992; Lee and Anstee, 1995). فنگ و همکاران نیز نشان دادند که یون منیزیم و مس باعث افزایش فعالیت فنل‌اکسیداز *O. furnacalis* می‌شود. در حقیقت به‌نظر می‌رسد یون‌های فلزی، افزاینده فعالیت فنل‌اکسیداز با ایجاد تغییر در ساختار سه‌بُعدی پروتئین، سبب افزایش فعالیت آنزیم می‌شوند (Feng *et al*., 2008).

مکانسیم اثر بازدارنده‌ها: کوجیک اسید، کوئرسین و ۴-هگزیل رسورسینول جزو بازدارنده‌های برگشت‌پذیر فنل‌اکسیداز هستند (Chang , 2009). در تحقیق حاضر، اثر IC_{25} و IC_{50} کوئرسین، کوجیک اسید و ۴-هگزیل رسورسینول به عنوان مهارکننده فنل‌اکسیداز شب‌پره برگ‌خوار توت مطالعه شد. در مورد ۴-هگزیل رسورسینول، *Vmax* تقریباً ثابت بوده اما *Km* افزایش پیدا کرده است. بنابراین، مهارکنندگی آن از نوع رقابتی می‌باشد و در مورد دو مهارکننده دیگر، چون هر دو پارامتر با هم کاهش پیدا کرده‌اند مهارکنندگی از نوع مختلط بوده است (جدول ۳). هم‌چنین براساس نتایج آزمون بازدارندگی ترتیب قدرت مهارکنندگی این ترکیبات به‌صورت ۴-هگزیل رسورسینول>کوئرسین>کوجیک اسید می‌باشد (جدول ۴).

۴-هگزیل رسورسینول احتمالا با یون مس واکنش داده و یک کمپلکس جدید را ایجاد می‌کند و به‌نظر می‌رسد این نوع مهارکنندگی فعالیت آنزیم‌های درگیر را نسبت به آنزیم آزاد تحت تأثیر قرار دهد. پس نحوه‌ی مهارکنندگی این ترکیب به صورت برقراری ارتباط مولکولی آن با یون مس موجود در جایگاه فعال آنزیم است و برای اطمینان کامل از صحت این موضوع نیاز به بررسی مولکولی آنزیم‌های مهار شده می‌باشد (Chen*et al*., 2004; Xue*et al*., 2006). کوجیک اسید یک مهارکننده تیپیک و شناخته شده تیروزیناز است اما به‌علت پایداری کم و میزان اثر مهاری، استفاده از آن محدود است (Chen*et al*., 2005). کوجیک اسید به‌عنوان کلاته کننده عناصر ناقل الکترون مانند آهن و مس واقع در جایگاه فعال اکثر آنزیم‌ها عمل می‌کند. این مهارکننده با اتصال به این یون‌ها باعث اختلال در عملکرد آن‌ها می‌شود و از انتقال الکترون به سوبسترا ممانعت کرده و به این‌ترتیب فعالیت آنزیم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Kobayashi et al., 1995). کوئرسین دارای ساختار آنالوگ با سوبسترای فنل‌اکسیداز می‌باشد که به جایگاه فعال آنزیم منتقل می‌شود و در آنجا مانع اتصال سوبستراهای آزاد می‌شود و تا مدتی آن‌ها را از فعالیت طبیعی خود باز می‌دارد (Chen*et al*., 2005).

جدول ۳- پارامترهای کینتیکی فعالیت آنزیم فنل‌اکسیداز خالص شده از همولنف لارو سن آخر پروانه برگ‌خوار توت در برابر ۴-هگزیل رسورسینول،کوجیک اسید و کوئرسین هیدرات

Table 3. Kinetic parameters of 4 the purified PO from hemolymph of *Glyphodes pyloalis* in the presence of -hexylresorsinol, kojic acid and quercetin on

Inhibitors	Inhibitor concentration (µM)	Vmax (µmol/min)	Km (mM)	Inhibition type
Control	0	0.15	98.89	
4-Hexylresorsinol	IC_{50}= 4.35	0.142	129.95*	Competitive
	IC_{25}= 0.833	0.147	108.85*	
Kojic acid	IC_{50}= 25.89	0.07*	65.56*	Mixed
	IC_{25}= 7.7	0.1*	78.94*	
Quercetin	IC_{50}= 17.39	0.06*	44.66*	Mixed
	IC_{25}= 5.6	0.09*	38.28*	

*دارای تفاوت معنی‌دار با شاهد در سطح یک درصد (آزمون t- student)

گزارش‌ها نشان می‌دهد که کوئرسین نقش مهارکنندگی قابل‌توجهی روی عملکرد آنزیم فنل‌اکسیداز ابریشم‌باف ناجور دارد و میزان IC50 این مهارکننده زمانی که کتکول (Catechol) به‌عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار گرفته است، ۰/۰۷۶ میکرومولار می‌باشد و هم‌چنین، دارای اثر مهارکنندگی رقابتی نیز بوده که ثابت مهارکنندگی آن ۲۱/۷۱ میلی‌مولار بر لیتر گزارش شده است (Yan*et al*., 2009). اما نتایج ما نشان می‌دهد که مکانیسم بازدارندگی این ترکیب روی فنل اکسیداز شب‌پره برگ‌خوار توت از نوع مختلط می‌باشد.

در مطالعه دیگری که اثر کوئرسین روی فعالیت فنل‌اکسیدازی لاروهای *Semiothsa cinerearia* Bremer (Lepidoptera: Geometridae) بررسی شده و میزان IC_{50} آن ۱۸۰ میکرومولار بر لیتر گزارش شده است که در این مورد هم کوئرسین یک مهارکننده رقابتی به‌حساب می‌آید. تمایل آنزیم به این ترکیب نسبتا زیاد است که این مسئله سبب می‌شود تا کوئرسین با نیروی بیشتری آنزیم‌های آزاد را به‌سمت تشکیل کمپلکس آنزیم – سوبسترا بکشاند و در نتیجه سرعت واکنش آنزیم با سوبسترای اصلی خود کاهش پیدا می‌کند. اما زمانی که غلظت سوبسترا اصلی افزایش پیدا کند، اثر مهارکنندگی آن کم‌تر می‌شود. بنابراین، *Vmax* تغییری نخواهد کرد بلکه تمایل نسبی آنزیم برای سوبسترا خود کاهش پیدا خواهد کرد و در حضور این ترکیب *Km* افزایش پیدا می‌کند (Chen*et al*., 2004;). کوجیک اسید هم خاصیت بازدارندگی مونوفنل‌اکسیدازی و هم دی‌فنل‌اکسیدازی نشان داردو میزان IC50 برای فعالیت مونوفنل‌اکسیدازی در پروانه پشت‌الماسی و پروانه ابریشم‌باف ناجور به‌ترتیب ۰/۰۷ و ۰/۰۶ میلی‌مولار بر لیتر و برای فعالیت دی‌فنل‌اکسیدازی ۱ و ۰/۹۲ میلی‌مولار بر لیتر محاسبه شده است که به‌عنوان یک مهارکننده رقابتی عمل کرده و با ایجاد یک فاز تاخیری سبب مهار آنزیم می‌شود. با افزایش غلظت مهارکننده، فاز تأخیری اتصال آنزیم و سوبسترا افزایش می‌یابد و ثابت مهارکنندگی آن ۰/۴۷ و ۰/۵۱ میلی‌مولار بر لیتر به‌ترتیب برای دو آفت مذکور می‌باشد (Yan*et al*., 2009; Chen*et al*., 2004).

میزان IC_{50} برای ۴- هگزیل رسورسینول روی آنزیم فنل‌اکسیداز همولمف لاروهای ابریشم‌باف ناجور، هنگام استفاده از سوبسترای مونوفنل‌اکسیدازی و سوبسترای دی‌فنل‌اکسیدازی به‌ترتیب ۰/۰۰۰۴۱ و ۰/۰۰۰۳۵ میلی‌مولار بر لیتر می‌باشد. این ترکیب، نیز با ایجاد یک فاز تاخیری باعث مهار آنزیم می‌شود. نوع مهارکنندگی این ترکیب روی

آنزیم فنل‌اکسیداز این آفت از نوع رقابتی می‌باشد و زمان استفاده از کتکول به‌عنوان سوبسترا، ثابت مهارکنندگی ۰/۰۰۰۱۵ میلی‌مولار بر لیتر می‌باشد (Yan*et al*., 2009). هم‌چنین، میزان IC_{50} این ترکیب برای آنزیم فنل‌کسیداز همولمف لاروهای پروانه سفیده کلم ۱/۵ میکرومولار بر لیتر و ثابت مهارکنندگی آن ۰/۴۷ میکرومولار بر لیتر می‌باشد (Xue*et al*., 2006).

همان‌طور که ذکر شد آنزیم فنل‌اکسیداز، آنزیمی حاوی مس است که در طیف وسیعی از موجودات شامل گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و حیوانات وجود دارد. این آنزیم چند کاره، دو مسیر مختلف شامل هیدروکسیلاسیون مونوفنل به o-دی‌فنل و دیگری اکسیداسیون o-دی‌فنل به کینون را کاتالیز می‌کند. در این تحقیق، آنزیم فنل‌اکسیداز از همولمف شب‌پره برگ‌خوار توت با استفاده از تکنیک‌های مختلف خالص شد. وزن ملکولی دو ایزوفرم آنزیم ۶۹/۶۶ و ۷۰/۵۳ کیلودالتون به‌دست آمد. اثرات بازدارنده‌ها نشان داد که روش مهارکنندگی ۴-هگزیل رسورسینول از نوع رقابتی و اما برای کوئرسین هیدرات و کوجیک اسید از نوع مختلط می‌باشد. از آن جهت که آنزیم فنل‌اکسیداز نقش فیزیولوژیکی خیلی مهمی در حشرات ایفا می‌کند، مطالعه ویژگی‌های اختصاصی آن اهمیت به‌سزایی دارد. در حال حاضر، تعدادی از تحقیقات روی نحوه‌ی فعالیت این آنزیم و طراحی مهار کننده‌های آن متمرکز شده‌اند که این مسئله نشان‌دهنده آن است که آینده روشنی برای ساخت و طراحی حشره‌کش-هایی با این عملکرد وجود دارد (Hassan Khan, 2007). با توجه به این‌که این آنزیم نقش مهمی در سیستم ایمنی حشرات دارد، این امکان وجود دارد که بتوان با استفاده از این بازدارنده‌ها سیستم ایمنی حشرات را مختل نموده و در اثر تلفیق این بازدارنده‌ها با پاتوژن‌های حشرات، میزان غلظت مصرفی سموم شیمیایی را در کنترل آفات کاهش داد.

References

ASHIDA, M. 1971. Purification and characterization of pro-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm Bombyx mori, Archives of Biochemistry and Biophysics, 44: 749-762.

ASHIDA, M. and BREY, P. 1995. Role of the integument in insect defense: prophenoloxidase cascade in the cuticular matrix, Proceedings of the National Academy of Sciences, 92: 10698-10702.

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

BURKS, C. S. and FUCHS, M. S. 1995. Partial purification of plasma phenoloxidase of the yellow fever mosquito Aedes aegypti L. (Diptera: Culicidae), Comparative Biochemistry and Physiology, 110B: 641-647.

CHANG, T. S. 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors, 10 (6): 2440-2475.

CHASE, M. R., RAINA, K., BRUNO, J. and, SUGUMARAN, M. 2000. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from Sarcophaga bullata, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30: 967-953.

CHEN, Q. X., KE, L.N., SONG, K. K., HUANG H. and LIU, X. D.2004. Inhibitory effects of hexylresorcinol and dodecylresorcinol on mushroom (Agaricus bisporus) tyrosinase, Journal of Protein Chemistry, 23: 135-141.

CHEN, Q. X., KE, N., SONG, K. K., HUANG, H., LIU, X. D., HUANG, H. and GUO, H. Y. 2005. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by p-alkoxybenzoic acids, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 91: 269-274.

CHERQUI, A., DUVIC, B. and BREHELIN, M. 1996. Purification and characterization of prophenoloxidase from the hemolymph of Locusta migratoria, Archives of Physiology and Biochemistry, 32: 225-235.

DUNPHY, G. B.1991. Phenoloxidase activity in the serum of two species of insects, the gypsy moth, Lymantria dispar (Lymantriidae) and the greater wax moth, Galleria mellonella (Pyralidae), Comparative Biochemistry and Physiology. 98B: 535-538.

FENG, C., SONG, Q., LIU, W. and LU, J. 2008. Purification and characterization of hemolymph prophenoloxidase from Ostrinia furnicula (Lep:pyralidae) larvae, Comparative Biochemistry and Physiology, 151: 139-146.

FUJIMOTO, K., MASUDA, N., ASADA K. I. and OHNISHI, E. 1993. Purification and characterization of prophenoloxidase from pupae of Drosophila melanogaster, Journal of Biochemistry, 113: 285-291.

HALL, M., SCOTT, T., SUGUMARAN, M., SODERHALL K. and LAW, J. 1995. Proenzyme of Manduca sexta phenoloxidase: Purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning, Proceedings of the National Academy of Sciences, 92: 7764-7768.

HARA, T., MIYOSHI T. and TSUKAMOTO, T. 1993. Comparative studies on larval and pupal phenoloxidase of the housefly, Musca domestica, L. Comparative Biochemistry and Physiology, 106: 287-292.

HARTZER, K. L., ZHU, K. Y. and BAKER, J. E. 2005. Phenoloxidase in larvae of Plodia interpunctella (Lepidoptera: Pyralidae): molecular cloning of the proenzyme cDNA and enzyme activity in larvae paralyzed and parasitized by Habrobracon hebetor (Hymenoptera: Braconidae), Archive Insect Biochemistry and Physiology, 59: 67-79.

HASSAN KHAN, M. T. 2007. Molecular design of tyrosinase inhibitors: A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins, Pure Applied Chemistry, 79 (12): 2277-2295.

KOBAYASHI, Y., KAYAHARA, H., M. TADASA, NAKAMURA, TANAKA, K. T. and BIOSCI, H. 1995. Synthesisof N-kojic-amino acid and N-kojic-amino acid-kojiate and their inhibitory activity, Biotechnology and Biochemistry, 9: 1745-1754.

KWON, B. S., HAQ, A. K., POMERANTZ S. H. and HALABAN, R. 1987. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus, Proceedings of the National Academy of Sciences, 84: 7473-7477.

LEE, M. J. and ANSTEE, H. J. 1995. Phenoloxidase and its zymogen from the haemolymph of larvae of the lepidopteran Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae), Comparative Biochemistry and Physiology, 110: 379-384.

LIU, G., YANG, L., FAN, T. Z., CONG, H., TANG, W., SUN, X. MENG and ZHU, L. 2006. Purification and characterization of phenoloxidase from crab Charybdis japonica, Fish Shellfish Immunology, 20: 47-57.

LOCKEY, T. D. and ORTH, D. D. 1992. Isolation and characterization of hemolymph phenoloxidase from Heliothis virescens larvae, Comparative Biochemistry and Physiology, 102: 891-896.

NELSON, D. L. 2010. Lehninger Principals of Biochemistry, Fifth edition. Macmillan Publishers Ltd, England. 1158 pp.

OURTH, D. D. 1988. Phenoloxidase activity, lack of bactericidal immunity and oral susceptibility of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to Serratia marcescens, Journal of Economic Entomology, 81: 148-151.

PARK, S. S., SHIN, S. W., PARK, D. S., OH, H. W., BOO, K. S. and PARK, H. Y. 1997. Protein purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the larvae of fall webworm (Hyphantria cunea), Insect Biochemistry and Molecular Biology, 27: 711-720.

ROBB, D. A. 1984. Tyrosinase. In: R. Lontie (ed.), Copper Proteins and Copper Enzymes, Boca Raton, FL: CRC Press. Vol. II, pp. 207-240.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N., TUDELA, J., VARÓN, R. GARCÍA-CARMONA F. and GARCÍA-CÁNOVAS, F. 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway, Journal of Biological Chemistry, 267: 3801-3810.

SHARIFI, M., GHADAMYARI, M., SAJEDI, R. H., ZAVAREH, M. and SHEIKHNEJAD, H. 2012. Insecticidal effects of 4-hexylresorcinol on the lesser mulberry snout moth, Glyphodes pyloalis Walker, Archives Phytopathology and Plant Protection, 46 (4): 423-435.

SHERMAN, T. D., GARDEUR T. L. and LAX, A. R. 1995. Implications of the phyogenetic distribution of polyphenol oxidase in plants. In: C. Y. Lee, J. R. Whitaker (eds.), Enzymatic Browning and Its

Prevention. American Chemical Society, Washington, DC. PP. 103-119.

SUGUMARAN, M. and KANOST, M. 1993. Regulation of insect hemolymph phenoloxidases. In: N. E. Beckage, S. N. Thomson and B.A. Frederick (eds.), Parasites and Pathogens. Academic Press, San Diego. PP. 317-342.

WANG, Q., KE, L., XUE, C., LUO, W. and CHEN, Q. 2007. Inhibitory kinetics of p-substituted benzaldehydes on polyphenol oxidase from the fifth instar of Pieris rapae L., Tsinghua Science and Technology, 12 (4): 400-404.

WANG, Q., CHEN, Q. X., HUANG, X. H., KE, L. N., SHI Y. and WANG, J. 2004. Studies on the enzymatic characterization and functional groups of polyphenoloxidase from pupae of blowfly (Sarcophaga bullata), Biochemistry, 69: 918-920.

WANG, S. D., LIU, W., XUE, C. B. and LUO, W. C. 2010. The effects of luteolin on phenoloxidase and the growth of Spodoptera exigua (Hübner) larvae (Lepidoptera: Noctuidae), Journal of Pest Science, 35 (4): 483-487.

WATANABE, H., KURIHARA, Y., WANG Y. X. and SHIMIZU, T. 1988. Mulberry pyralid, Glyphodes pyloalis: Habitual host of nonoccluded viruses pathogenic to the silkworm, Bombyx mori, Journal of Inverteberate Pathology, 52 (3): 401-408.

XUE, C. B., LUO, W. C., CHEN, Q. X., WANG, Q. and KE, L. N. 2006. Enzymatic properties of phenoloxidase from Pieris rapae (Lepidoptera) larvae, Insect Science, 13: 251-256.

YAMAURA, I., YONEKURA, M. Y., KATSURA, M. and FUNATSU, M. 1980. Purification and some physico-chemical properties of phenoloxidase from the larvae of housefly, Agriculture and Biological Chemistry, 44: 55-59.

YAN, Z., LONG, Y., LUFAN, C., CHENG GANG, Z. and CHUN. L. W. 2009. Inhibitory effects of tetra-hexylresorcinol and kojic acids on the phenoloxidase from Lymantria dispar, Scientia Silvae Sinica, 45: 95-99.

YAPI, D. Y. A., GNAKRI, D., NIAMKE, S. L. and KOUAME, L. P., 2009. Purification and biochemical characterization of a specific β-glucosidase from the digestive fluid of larvae of the palm weevil, Rhynchophorus palmarum.Journal of Insect Science, 9 (1), p.4.

ZUFELATOA, M. S., LOURENC-O, A. P. L., SIMõES Z. L., JORGE, J. A. and BITONDI M. M. 2004. Phenoloxidase activity in Apis mellifera honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 34: 1257-1268.