زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ ۳، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۱

مهار تیروزیناز قارچی با نیتروآنیلین‌ها و مشتقات وانیلینی آن‌ها

معصومه باقری کالمرزی[۱]، الهام اسداللهی[۲]، رضا حسن ساجدی[۳*]، عطیه مهدوی[۴]، نصرالله محمودی[۵]، رضا حاجی حسینی[۶]

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد شیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۳- استادیار بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
٤- دکترای بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
٥- استاد شیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
٦- دانشیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

***تهران، کدپستی ١٥٤-١٤١١٥**
sajedi_r@modares.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۲، پذیرش: ۹۰/۱۲/۳)

چکیده- تیروزیناز یا پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) یک منواکسیژناز حاوی مس می‌باشد که مسئول تولید ملانین در جانوران می‌باشد. این آنزیم هر دو فعالیت هیدروکسیلاسیون منوفنل‌ها به *O*- دی‌فنل ها (فعالیت مونوفنلازی) و اکسایش آن به *O*- کوئینون ها (فعالیت دی‌فنلازی) را بروز می‌دهد. مهار تیروزیناز بسیار مهم و جستجو برای مهارکننده‌های جدید تیروزیناز جذاب بوده است. در این تحقیق، برای اولین بار اثر ۲-نیتروآنیلین (a) ۳-نیتروآنیلین (b)، ٤-نیتروآنیلین (c) و همچنین مشتقات وانیلینی جدید آن‌ها یعنی ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات (d) ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات (e) و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات (f) روی فعالیت دی‌فنلازی تیروزیناز با استفاده از دوپامین هیدروکلرید مورد بررسی قرار گرفته است. از میان آن‌ها، ترکیب c قویترین مهارکننده و ترکیب d به‌عنوان فعال‌کننده شناخته شد. IC_{50} این ترکیبات به‌این‌ترتیب بود: b> f= a> e> c. ترکیبات a، b و f مهارکننده‌های رقابتی و c و e نیز مهارکننده‌های نارقابتی بود. نتایج نشان می‌دهد، موقعیت گروه‌های آمینو و نیترو و قدرت الکترون‌کشندگی گروه‌های عاملی در کربن شماره ۱، به ترتیب در نیتروآنیلین‌ها و مشتقات وانیلینی آن‌ها در قدرت مهاری‌شان مهم است.

کلیدواژگان: تیروزیناز، قهوه‌ای‌شدن آنزیمی، مهارکنندگی، نیتروآنیلین‌ها.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

۱- مقدمه

قهوه‌ای شدن[1] توسط آنزیم در سبزیجات، میوه‌ها و غذاهای دریایی به‌واسطه فعالیت آنزیم تیروزیناز (EC 1.14.18.1) می‌باشد. این آنزیم که پلی‌فنل‌اکسیداز نیز خوانده می‌شود، در گستره وسیعی از موجودات زنده از باکتری‌ها تا پستانداران وجود دارد و عملکرد آن شامل فعالیت منوفنولازی[2] (کرسولازی)[3] و دی فنولازی[4] (کتکولازی)[5] می‌باشد که باعث بیوسنتز ملانین و اورتو-هیدروکسیلاسیون تیروزین (منوفنول) به ۳ و ٤-دی‌هیدروکسی فنیل‌آلانین یا DOPA (ارتو- دی فنول) و اکسیداسیون DOPA به دوپاکوئینون (ارتو-کوئینون) می‌شود. نتایج تجربی به‌دست آمده روی تیروزیناز تا به امروز نشان داده است که همه تیروزینازها از منابع مختلف منومرهای سه دومینی با بیش از یک ایزوفرم هستند [۱-٤]. در حال حاضر، خصوصیات جایگاه فعال و واکنش‌پذیری تیروزیناز عمدتاً از طریق ارتباط آن با هموسیانین که یک پروتئین حاوی مس مایل به آبی[6] در نرم‌تنان و بندپایان می‌باشد، روشن شده است [۲ و ۵] و هنوز ساختار کریستالی از این آنزیم در دست نیست [٦-۸].

از دیدگاه تجاری و اقتصادی، این آنزیم دارای دو عملکرد متفاوت است. از یک‌سو باعث ایجاد رنگ قهوه‌ای ناخواسته محصولات کشاورزی می‌شود و از سوی دیگر منجر به تغییر رنگ و ظاهر غذاهای دریایی باارزش از قبیل میگو و خرچنگ می‌شود و سبب کاهش چشمگیری در ارزش غذایی و فروش آن‌ها می‌گردد [۹ و ۱۰]. بعضی از اختلالات پوستی در انسان مرتبط با پیگمانتاسیون اضافی هستند؛ لذا استفاده از مهارکننده‌های این آنزیم در صنایع غذایی برای جلوگیری از تغییر رنگ و کیفیت مواد غذایی و در صنایع آرایشی برای سفیدکردن پوست اهمیت ویژه‌ای دارد. همچنین با توجه به نقش چشمگیر آنزیم در سخت‌شدن و تولید کیتین، جهت کنترل مراحل مختلف پوست‌اندازی در سخت‌پوستان و حشرات و نیز عمل به عنوان یک سیستم ایمنی ذاتی و بی‌نظیر در این موجودات، برای پاسخ به انگل‌ها و بیماری‌زاها، استفاده از مهارکننده‌های آنزیم می‌تواند در راستای مبارزه و کنترل جمعیت حشرات مضر، قابل توجه باشد [۱۱ و ۱۲]. از سوی دیگر، تشکیل رنگدانه‌های قهوه‌ای به‌واسطه فعالیت این آنزیم در برخی از گیاهان از جمله چای، کاکائو و قهوه و نیز در میوه‌های خشک مانند کشمش، خرما، آلو و انجیر بسیار مفید بوده است و باعث افزایش و بهبود بازده در رنگ این محصولات می‌شود. در نهایت، نقش آنزیم در ایجاد مقاومت گیاهان در برابر حملات حشرات و میکروارگانیسم‌ها حائز اهمیت است [۱۳ و ١٤]. از این نظر، ترکیبات فعال‌کننده آنزیم دارای اهمیت‌اند. با توجه به مطالب ذکرشده و بویژه عدم دسترسی به ساختار سه بعدی آنزیم‌های تیروزیناز و توجه به اهمیت ترکیبات بازدارنده فعالیت آنزیم، چه از بعد کاربردی و چه از نظر تحقیقاتی پایه (به منظور تعیین مکانیسم کاتالیزی و کسب اطلاعات از ساختار جایگاه فعال)، هدف از این تحقیق، یافتن مهارکننده‌های جدید و مناسب‌تر برای

1. Enzymatic browning
2. Monophenolase
3. Cresolase
4. Diphenolase
5. Catecholase
6. Bluish copper-containing protein

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

آنزیم است و در این راستا اثر ترکیبات ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین، ٤-نیتروآنیلین، و همچنین مشتقات وانیلینی جدید آن‌ها یعنی ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات، ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات که در موقعیت گروه‌های عاملی باهم تفاوت داشتند، مورد بررسی قرار گرفت. به استثنای سه ترکیب اول، سایر ترکیبات مذکور به‌عنوان مواد سنتزی جدید در این تحقیق سنتز شدند. این ترکیبات به راحتی قابل سنتز بودند و به لحاظ اقتصادی ارزان‌قیمت هستند و مواد اولیه آن‌ها تقریباً دردسترس است. لازم به ذکر است که اثر مهاری این ترکیبات بر روی فعالیت تیروزیناز برای اولین بار در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

آنزیم تیروزیناز قارچی، دوپامین هیدروکلراید و DMF (دی متیل فرم آمید) از شرکت سیگما (St. Louis, MO (USA)، MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinone hydrazone)، ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین، ٤-نیتروآنیلین و سایر ترکیبات از شرکت مرک (Darmstadt,Germany) خریداری شد. ترکیبات سنتزی جدید ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات، ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات نیز در آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی آلی دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان تهیه شد.

روش عمومی سنتز ترکیبات ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات، ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات

در یک بالن مقدار ۱ میلی‌مول مشتق آنیلین، ۱ میلی‌مول وانیلین و ۵ میلی‌لیتر اتانول ریخته شد. واکنش به مدت ۱ تا ۳ روز تحت حرارت قرار گرفت. پس از کامل‌شدن واکنش، مخلوط واکنش صاف و خشک شد. در مرحله بعد، جامد روی صافی پس از تبلور مجدد توسط IR شناسایی شد.

۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات

IR (KBr, υ/cm^{-1}): ۳۱۰۰,۱٦۱۰,۱۵۸۰ , ۱۵۰۰,۱٤٦۰,۱٤۲۰, ۱۳٤۰,۱۳۰۰, ۱۲۸۰, ۱۱٦۰,۷۳۰

۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات

IR (KBr, υ/cm^{-1}): ۳۱۵۰, ۱٦۲۰,۱۵۹۰, ۱۵۲۰,۱٤۸۰,۱۳۵۰, ۱۰۹۰,۸۲۰, ۷۳۰

٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات

IR (KBr, υ/cm^{-1}): ۳۱۰۰,۱٦۲۰,۱۵۸۰ , ۱۵۱۰,۱٤۷۰,۱٤٤۰, ۱۳۲۰,۱۲۹۰, ۱۱۸۰, ۱۱۰۰,۸٤۰

۲-۲- سنجش فعالیت آنزیمی

فعالیت دی‌فنولازی تیروزیناز قارچی به روش اسپکتروفتومتری در دمای محیط با ردیابی افزایش جذب در ۵۰۵ nm مطابق روش Robb (۱۹۸٤) تعیین شد [۱۵]. محیط سنجش (۱ ml) شامل ۱۰۰ µl محلول آنزیمی، ۵۰۰ µl محلول تازه سوبسترا (۶۰ mM دوپامین هیدروکلراید، ۲٪ DMF (v/v) (دی متیل فومامید) و ۵ mM MBTH در ۵۰ mM بافر فسفات) و ٤۰۰µl بافر

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

فسفات ۵۰ mM با ۶/۸ =pH بود. به‌منظور تعیین فعالیت آنزیمی از ضریب خاموشی $3700 M^{-1}.cm^{-1}$ برای محصول استفاده شد.

۲-۳- بررسی اثر مهارکننده‌ها روی فعالیت آنزیم

به‌منظور بررسی اثر مهارکننده‌ها بر روی فعالیت آنزیمی، آنزیم به‌مدت ۱۰ دقیقه با غلظت‌های مختلف هر یک از مهارکننده‌ها در دمای محیط انکوبه گردید. پس از گذشت این مدت فعالیت تیروزیناز در شرایط استاندارد اندازه‌گیری شد.

۲-٤- تعیین IC_{50}

برای بدست‌آوردن IC_{50}، مهارکننده‌ها از روی منحنی دز-پاسخ[1] [۱٦]، فعالیت آنزیمی در غلظت ثابتی از سوبسترا و در غلظت‌های مختلف هر یک از مهارکننده‌ها بدست آمد و سپس منحنی V_i/V_o علیه [I] log رسم گردید. V_o سرعت اولیه در عدم حضور مهارکننده و V_i سرعت اولیه در حضور مهارکننده است.

آنالیز سینتیکی (تعیین K_m و V_{max})

فعالیت آنزیمی تیروزیناز در غلظت‌های متفاوت سوبسترا (در غلظت‌های ثابت MBTH، DMF و اسید فسفریک) در حضور و عدم حضور غلظت IC_{50} هر یک از مهارکننده‌ها در شرایط سنجش مورد بررسی قرار گرفت. ثابت میکائیلیس-منتن (K_m) و حداکثر سرعت (V_{max}) تیروزیناز از روی منحنی‌های لینویور-برک به‌دست آمد.

تعیین غلظت پروتئین

غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد اندازگیری و از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد، استفاده شد [۱۷].

۳- یافته‌ها

ترکیبات مورد بررسی شامل ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین، ٤-نیتروآنیلین، ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات، ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات می‌باشد. ساختار شیمیایی این ترکیبات در جدول ۱ نشان داده شده است. فعالیت تیروزیناز به تنهایی و در حضور غلظت‌های مختلف ترکیبات مورد مطالعه، بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم تنها با افزایش غلظت ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات افزایش و در حضور سایر ترکیبات کاهش می‌یابد. بنابراین، ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات به عنوان فعال‌کننده و سایر ترکیبات به‌عنوان مهارکننده نسبت به این آنزیم عمل می‌کنند. پس از تعیین غلظت آنزیم و رقیق‌سازی پی‌درپی آن، بهترین غلظت آنزیم جهت بررسی اثر مهارکننده‌ها و تعیین پارامترهای سینتیکی انتخاب و فعالیت آنزیمی آن سنجش می‌شود.

۳-۱- منحنی دز-پاسخ

به‌منظور مقایسه بهتر اثر بازدارندگی یا فعال‌کنندگی ترکیبات مورد مطالعه، همچنین محاسبه IC_{50} مهارکننده‌ها، منحنی Dose-response برای هر یک از ترکیبات رسم شد (شکل ۱). ترکیبات 2-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ٤-نیتروآنیلین که دارای یک حلقه بنزن، یک گروه آمین

1. Dose-response curve

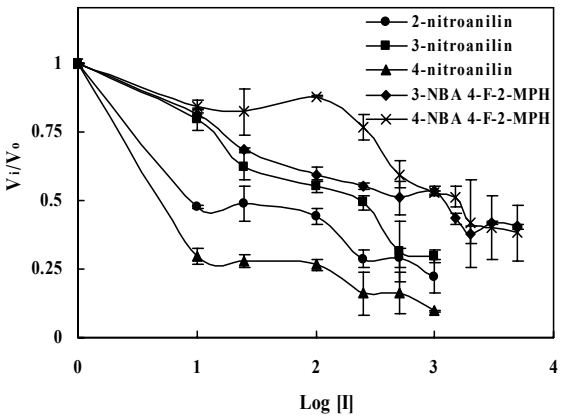
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

($-NH_2$) و نیز یک گروه نیترو ($-NO_2$) به ترتیب در موقعیت‌های ارتو، متا و پارا می‌باشند، سبب کاهش فعالیت آنزیم شده و به‌عنوان مهارکننده شناخته می‌شود. ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات به ترتیب از ترکیب گروه آمین ۳-نیتروآنیلین و ٤-نیتروآنیلین با عامل الکلی موقعیت پارای وانیلین، بدست آمده‌است، نیز به‌عنوان مهارکننده آنزیم تیروزیناز شناخته می‌شود. اثر مهارکنندگی ترکیبات فوق بر روی فعالیت آنزیمی به‌وضوح در منحنی‌های رسم‌شده در شکل ۱ دیده می‌شود. مقادیر IC_{50} محاسبه شده برای این ترکیبات نیز در جدول ۱ آورده شده است. ترکیب ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات (که از طریق واکنش گروه آمین ۲-نیتروآنیلین با عامل الکلی در موقعیت پارای وانیلین بدست آمده) تا ۵۰۰ μM تأثیر محسوسی روی فعالیت آنزیم ندارد؛ اما در غلظت‌های بیشتر درصد فعالیت تیروزیناز را به میزان زیادی افزایش می‌دهد و به‌عنوان فعال‌کننده آنزیم تیروزیناز شناخته می‌شود.

۳-۲- پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} و تعیین نوع مهارکنندگی

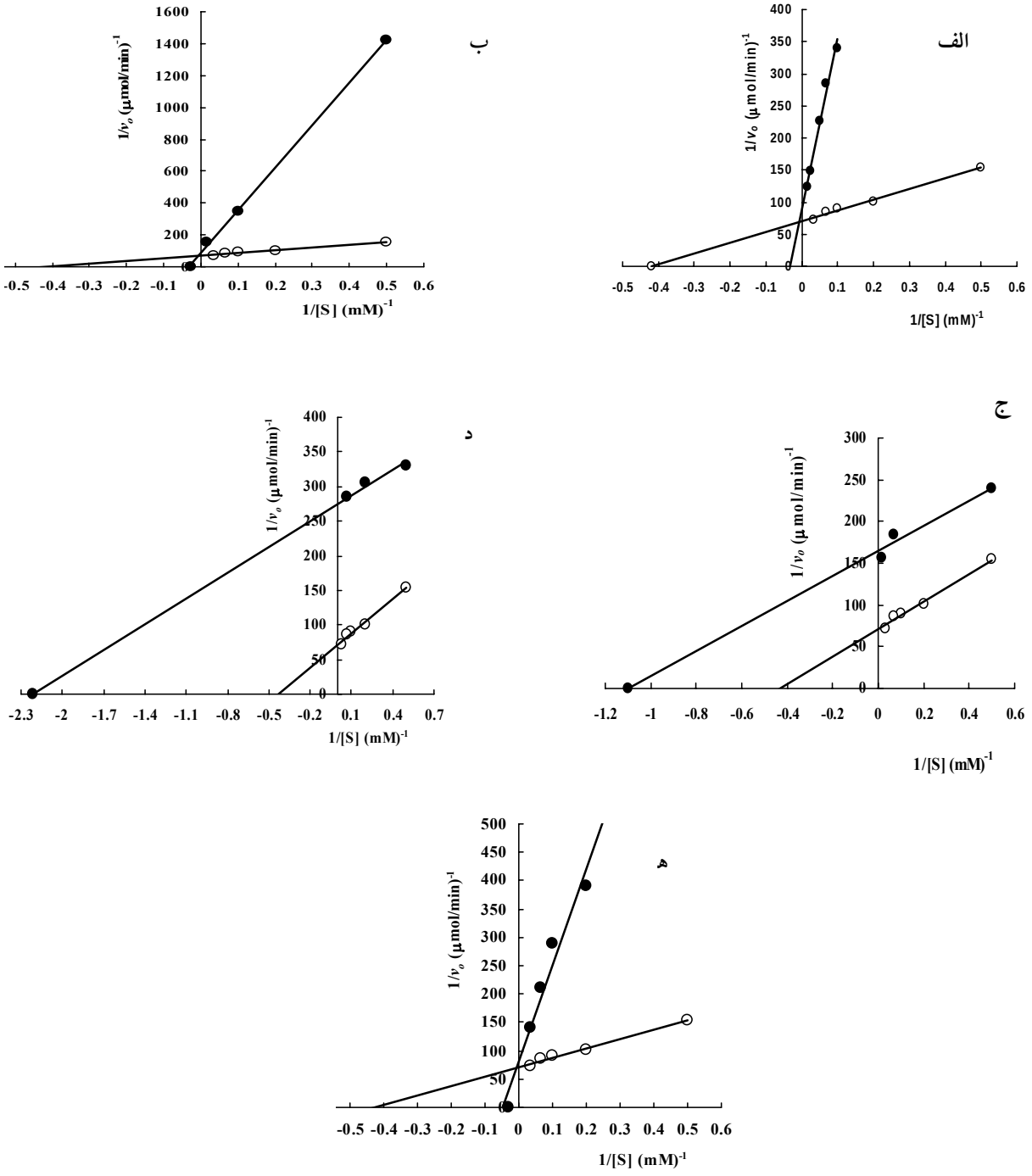
فعالیت دی‌فنولازی تیروزیناز قارچی که با استفاده از غلظت‌های مختلف دوپامین هیدروکلراید به‌عنوان سوبسترا بررسی گردید، از سینتیک میکائیلیس-منتن تبعیت می‌کند. پارامترهای سینتیکی K_m و V_{max} برای آنزیم با استفاده از منحنی لاین ویوربرک در عدم حضور مهارکننده محاسبه شد (شکل ۲). مقادیر K_m و V_{max} مهارکننده‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

به‌منظور تعیین نوع مهارکنندگی، سینتیک فعالیت تیروزیناز در غلظت‌های IC_{50} هر یک از مهارکننده‌ها بررسی و با رفتار سینتیکی آن در عدم حضور مهارکننده مقایسه می‌شود (با استفاده از منحنی لاین‌ویور- برک آنزیم در حضور و عدم حضور مهارکننده). از آنجایی‌که در حضور ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات، V_{max}آنزیم تقریبا ثابت اما K_m آن تغییر شدیدی نشان می دهد، این ترکیبات به‌عنوان مهارکننده‌های رقابتی عمل می‌کنند. در حالی‌که در حضور ترکیبات ٤-نیتروآنیلین و ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات هر دو پارامتر K_m و V_{max} کاهش می‌یابد. بنابراین این دو ترکیب به‌عنوان مهارکننده نارقابتی عمل می‌کنند (شکل ۲ و جدول ۱).



شکل ۱ منحنی‌های دز- پاسخ مهار کننده‌های مورد مطالعه.

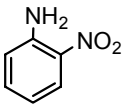
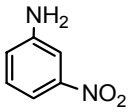
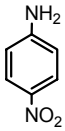
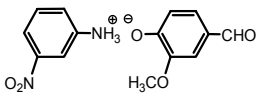
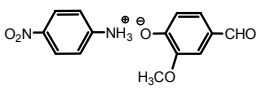
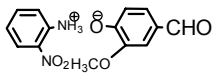
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]



شکل ۲ منحنی‌های لینویور-برک آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور مهار کننده‌ها (●) و عدم حضور آن‌ها (○): الف)۲-نیتروآنیلین، ب) ۳-نیتروآنیلین، ج) ٤-نیتروآنیلین، د) ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ه) ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

جدول ۱ مقایسه پارامترهای سنیتیکی K_m و V_{max} در غلظت IC_{50} ترکیبات مهار کننده به همراه مقادیر IC_{50} و ساختار شیمیایی آن‌ها. ساختار شیمیایی ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات بعنوان تنها ترکیب فعال کننده در این تحقیق، در ردیف آخر آمده است.

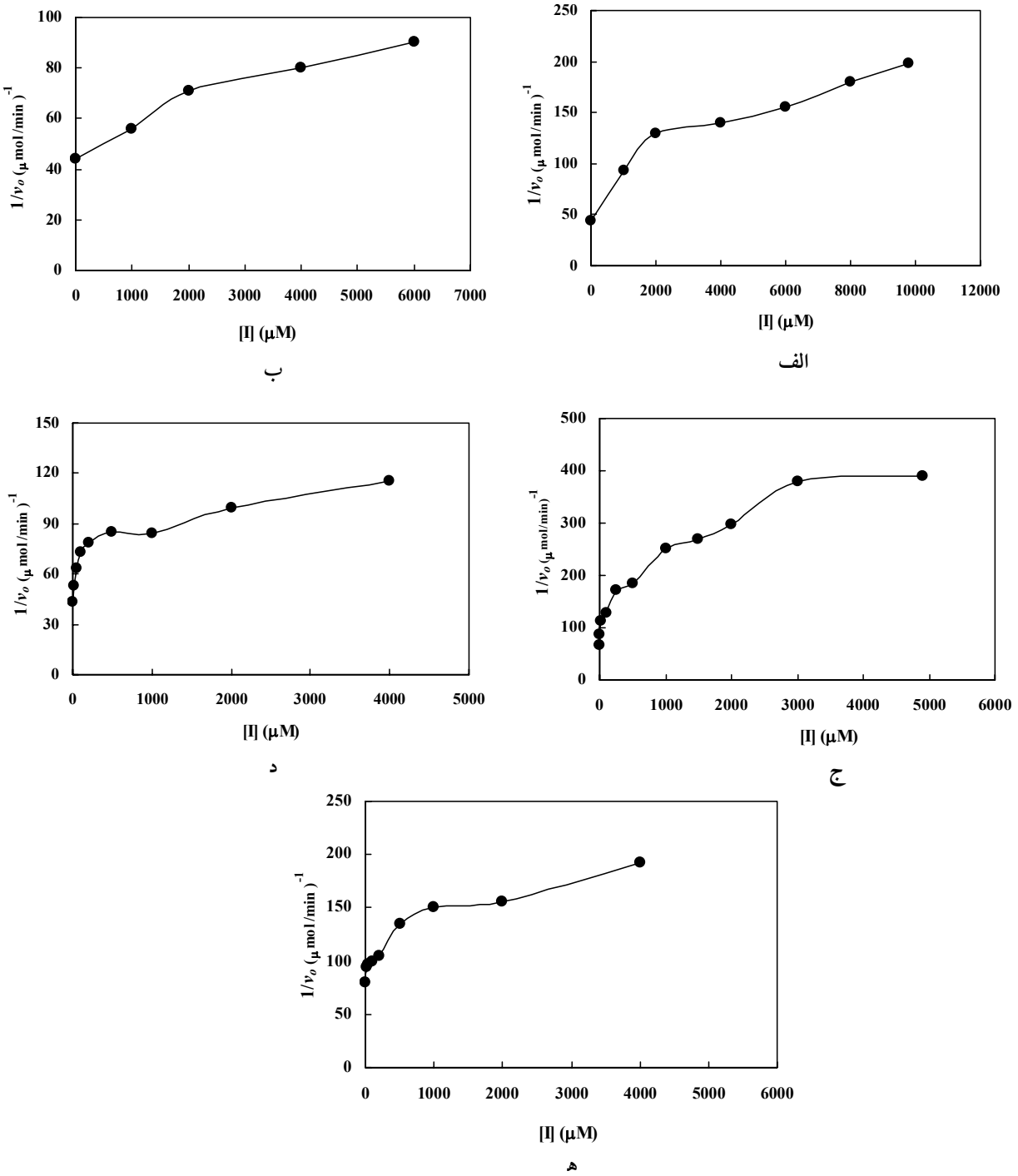
Inhibitor	Inhibition Type	K_m (mM)	V_{max} (µmol/min)	IC_{50} (µM)	Structure
-	-	2.3	0.014	-	-
2-nitroaniline	Competitive	31	0.014	1000	
3-nitroaniline	Competitive	37.6	0.014	6000	
4-nitroaniline	Uncompetitive	0.91	0.006	150	
3- nitrobenzenaminium 4-formil-2-metoxyphenolate	Uncompetitive	0.45	0.004	500	
4-nitrobenzenaminium 4-formil-2-metoxyphenolate	Competitive	33.3	0.014	1000	
2-nitrobenzenaminium 4-formil-2-metoxyphenolate	activator	-	-	-	

۳-۳- منحنی‌های دیکسون

برای تشخیص جزیی یا کامل‌بودن مهار، رفتار مهارکنندگی در محدوده وسیعی از غلظت مهارکننده مورد بررسی قرار گرفت. یکی از بهترین راه‌های تشخیص مهار جزیی از مهار کامل، رسم منحنی دیکسون است. به این منظور این منحنی‌ها در غلظت ثابتی از سوبسترا و غلظت‌های مختلف مهارکننده در مقابل $1/v_o$ رسم می‌شود. در مهار کامل، منحنی دیکسون به‌صورت خطی می‌باشد در حالی‌که در مهار جزیی، منحنی به‌صورت هیپربولیک است. منحنی‌های دیکسون مربوط به مهارکننده‌های مورد مطالعه در این تحقیق در شکل ۳ آمده است. نوع مهارکنندگی اکثر مهارکننده‌های مورد مطالعه در این تحقیق، از نوع مهار نسبی[8] می‌باشد.

8. Partial inhibition

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]



شکل ۳ منحنی دیکسون آنزیم تیروزیناز قارچی، الف) ۲-نیتروآنیلین، ب) ۳-نیتروآنیلین، ج) ٤-نیتروآنیلین، د) ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ه) ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

٤- بحث

تیروزیناز برای ملانیزاسیون در جانوران و قهوه‌ای‌شدن در گیاهان و قارچ‌ها مورد نیاز است. این فرآیندها در هیپرپیگمانتاسیون موضعی نظیر ملازوما[9]، ایفلد[10] و لنتیگو[11] دخالت دارند [۱۸]. مضرات قهوه‌ای‌شدن یا ملانوژنز غذاهای آبی و دریایی برداشت شده که به‌طور عمده در سخت پوستان نظیر میگو اتفاق می‌افتد، بسیار قابل ملاحظه است. این محصولات گران و با ارزش، به‌شدت نسبت به قهوه‌ای‌شدن آنزیمی حساس و آسیب‌پذیرند. تولید ملانین معمولاً با جداکردن سر سخت‌پوستان تشدید می‌شود. گرچه با تغییر رنگ، در طعم و بوی این محصولات غذایی تغییر چندانی به‌وجود نمی‌آید، اما تأثیر زیادی در ظاهر آن و در نتیجه فروش و جذب مشتری می‌گذارد [۱۹ و ۲۰]. بعلاوه، تیروزیناز از مهم‌ترین آنزیم‌ها در فرآیند پوست‌اندازی حشرات بوده است و مطالعه مهارکننده‌های آن می‌تواند در ارائه ترکیبات جایگزین در کنترل حشرات و به‌عنوان حشره‌کش حائز اهمیت باشد [۲۱ و ۲۲]. به موارد فوق مشکلات حاصل از تشکیل ملانین در تغییر رنگ و کیفیت میوه‌ها و سبزیجات را نیز باید اضافه نمود. از آنجاییکه قهوه‌ای‌شدن در محصولات غذایی یک فرآیند ناخواسته است، نیاز به ترکیبات ممانعت کننده آن در صنایع غذایی، یک نیاز همیشگی است [۲۳ و ۲٤]. از این‌رو مهارکننده‌های تیروزیناز بسیار مورد توجه‌اند. مهم‌ترین مسأله برای این مهارکننده‌ها سلامتی[12] است؛ به‌خصوص برای مهارکننده‌هایی که در محصولات آرایشی و مواد غذایی استفاده می‌شوند. از این‌رو مهارکننده‌هایی که از منابع طبیعی بدست می‌آیند، برای استفاده در صنایع غذایی می‌توانند ارزشمند باشند، زیرا اکثر آن‌ها اثرات جانبی کمی داشته و از ایمنی بالایی برخوردارند. گرچه تعداد زیادی از مهارکننده‌های تیروزیناز تاکنون در منابع علمی گزارش شده است [۲۵-۲۸]، اما جستجو برای محصولات طبیعی و ترکیبات سنتزی جدید همچنان ادامه دارد. این جستجو کم و بیش تصادفی است و به‌ویژه بدلیل در دسترس‌نبودن ساختار سه بعدی آنزیم موانع و مشکلات زیادی به‌این‌منظور وجود دارد. خصوصیات مرکز دو مسی در جایگاه فعال از طریق روش‌های مختلفی تا حدودی تعیین شده است و مشخص گردید شبیه به جایگاه فعال کتکول اکسیدازها و هموسیانین‌های حشرات است [۲۸-۳۰]؛ اما جزئیات فضایی جایگاه فعال و مکانیسم دقیق کاتالیز هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است. تعداد ناچیزی از عوامل ضدتولید ملانین نظیر کوجیک اسید[13] و آربوتین[14] بصورت تجاری موجود هستند. برخی از موانع، استفاده از این مواد از جمله سمیت نسبتاً بالای این ترکیبات برای سلول‌ها و ثبات کم آن‌ها در مقابل اکسیژن و آب [۳۱] لزوم تلاش در جهت شناسایی، تولید و کاربرد مهارکننده‌های طبیعی جدید را بیش از پیش آشکار می‌سازد. به‌این‌منظور، در این تحقیق اثرمهاری بعضی از مشتقات آنیلین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان می‌دهد، ۲- نیتروبنزن آمینیوم ٤- فرمیل-۲-متوکسی فنولات به‌عنوان فعال‌کننده و ۵ ترکیب دیگر یعنی ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین، ٤- نیتروآنیلین، ۳- نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲- متوکسی فنولات و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤- فرمیل-۲- متوکسی فنولات به‌عنوان مهارکننده‌های برگشت‌پذیر این آنزیم عمل می‌کنند. از

9. Melasoma
10. Ephelide
11. Lentigo
12. Safety
13. Kojic asid
14. Arbutin

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

روی منحنی‌های دیکسون که برای هر مهارکننده رسم گردید، مشخص شد که نوع مهارکنندگی اکثر مهارکننده‌های مورد مطالعه در این تحقیق از نوع مهار نسبی می‌باشد. نکته قابل ذکر این است که این نوع مهارکننده‌ها برای آنزیم‌های مختلف بسیار نادر هستند.

تیروزیناز علاوه بر سوبستراهای طبیعی مونو و *O*-دی فنلی قادر است، طیفی از آمین‌های آروماتیک و *O*-آمینوفنل‌ها را اکسید نماید. ۳-آمینو-L-تیروزین به‌عنوان یک مهارکننده قوی برای تیروزیناز گزارش شده است. به‌علاوه آمین‌های آروماتیک *O*-دی آمین‌ها و *O*-آمینوفنل‌ها به‌عنوان مهارکننده‌های تیروزیناز مورد شناسایی و بررسی قرار گرفته‌اند [۲۶، ۳۲ و۳۳]. از طرف دیگر کاپفرون، نئوکاپفرون و N-nitrosohydroxylamineها نیز به‌عنوان مهارکننده‌های تیروزیناز گزارش شده است [۳٤]. با توجه به ساختارهای فوق، اثرمهاری ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ٤-نیتروآنیلین در این تحقیق برای اولین بار روی تیروزیناز قارچی مورد مطالعه قرار گرفته است. هر سه مشتق آنیلین مورد مطالعه در این تحقیق اثرمهاری روی آنزیم نشان دادند. مقایسه IC_{50} مشتقات آنیلین مشخص کرد که اثر مهاری این سه ترکیب به‌صورت ۳-نیتروآنیلین< ۲-نیتروآنیلین< ٤-نیتروآنیلین افزایش می‌یابد. ٤-نیتروآنیلین با IC_{50} برابر ۱۵۰ µM در بین مهارکننده‌های تیروزیناز شناخته شده دارای قدرت مهاری نسبتاً بالایی است و در این تحقیق بیشترین اثرمهاری را نشان داد. موقعیت گروه‌های $-NH_2$ و $-NO_2$ نسبت بهم اثر بسزایی روی قدرت مهاری مشتقات آنیلین دارد. مشتقات آنیلین را می‌توان با آمین‌های آروماتیک که اثر آن‌ها روی تیروزیناز قارچی قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته، مقایسه کرد [۲٦]. این موارد و نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، موقعیت نسبی استخلاف‌ها در ارتو و پارا، نه تنها در کاتالیز، بلکه در اتصال دارای اهمیت هستند. همچنین مشتقات نیتروآنیلین را با کوپفرون می‌توان مقایسه کرد؛ با این تفاوت که کوپفرون در موقعیت اورتو، متا یا پارا، گروه نیترو ($-NO_2$) ندارد و به جای یکی از هیدروژن‌های گروه آمین ($-NH_2$)، دارای گروه NO– و به جای هیدروژن دیگر گروه $-ONH_4$دارد [۳۵]. با این تغییرات اثر مهاری بسیار بیشتر کوپفرون نسبت به ٤-نیتروآنیلین مشاهده می‌شود.

علاوه بر موارد فوق، در این تحقیق از ترکیب نیتروآنیلین‌ها و وانیلین ترکیبات سنتزی جدیدی حاصل شد و اثر آن‌ها نیز روی تیروزیناز مورد مطالعه قرار گرفت. در حالی‌که ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ٤-نیتروآنیلین به‌عنوان مهارکننده‌های آنزیم تیروزیناز عمل می‌کنند، در ترکیب با وانیلین این رفتار آن‌ها بسیار تغییر می‌کند. با ترکیب ۲-نیتروآنیلین با وانیلین، ماده سنتزی جدید ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات حاصل می‌شود که اثر فعال‌کنندگی روی آنزیم تیروزیناز دارد. حال آنکه ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات به عنوان مهارکننده این آنزیم عمل می‌کند. به نظر می‌رسد در مولکول ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات پس از ترکیب‌شدن، گروه‌هایی که در اتصال آن و بلوکه‌نمودن آنزیم نقش دارند، در نزدیکی هم قرار گرفته‌اند و ممانعت فضایی بین آن‌ها مانع از این عمل می‌شود. در دو ترکیب دیگر گروه‌های عاملی $-NO_2$ و $-OCH_3$ در دسترس هستند و میان‌کنش‌های موردنیاز جهت مهار آنزیم امکان‌پذیر می‌باشد. IC_{50} ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات نسبت به ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات پایین تر و قدرت مهاری آن بیشتر می باشد. ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات از نظر قدرت مهاری در این بررسی بعد از ٤-نیتروآنیلین قرار

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

دارد. حال آنکه ۳-نیتروآنیلین ضعیف ترین مهارکننده در این تحقیق ارزیابی شده است. نتایج فوق نشان می‌دهد، موقعیت دو گروه متوکسی و نیترو در ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات طوری است که اتصال مناسب‌تری با آنزیم برقرار می‌کند.

ترکیبات ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات به‌عنوان مهارکننده‌های رقابتی این آنزیم عمل می‌کند؛ در حالی‌که نوع مهارکنندگی برای ترکیبات ٤-نیتروآنیلین و ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات از نوع نارقابتی بود. به عبارت دیگر، ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات توانایی اتصال به جایگاه فعال را دارند. ٤-نیتروآنیلین و ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات تنها به کمپلکس آنزیم-سوبسترا متصل می‌شوند. والکر و ویلسون گزارش نمودند، زمانی‌که سوبسترا به آنزیم متصل می‌شود، تغییرات کونفورماسیونی را در آنزیم ایجاد می‌نماید؛ طوری‌که جایگاه هیدروفوبی که عمدتاً مربوط به اتصال مهارکننده‌ها است و در نزدیکی جایگاه فعال قرار دارد، بزرگتر می‌شود [۳٦] . ٤-نیتروآنیلین و ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات توانایی اتصال به جایگاه فعال را ندارد و تنها زمانی به آنزیم متصل می‌شوند که سوبسترا به آنزیم متصل شده باشد. جایگاه اتصال این دو ترکیب احتمالاً همان جایگاه هیدروفوب ذکرشده می‌باشد. سایر ترکیبات توانایی اتصال به آنزیم را به‌صورت آزاد (مهار رقابتی) دارند.

٥- سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور تهران و دانشگاه گیلان بخاطر حمایت مالی و فراهم‌نمودن امکانات آزمایشگاهی کمال تشکر را دارد.

٦- مراجع

[1] van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H., and Wichers, H. J. (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. Phytochemi 45, 1309–1323.

[2] Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. Chem. Rev. 96, 2563– 2605.

[3] Vaughan, P. F. T., Eason, R., Paton, J. Y., and Ritchie, G. A. (1975) Molecular weight and amino acid composition of purified spinach beet phenolase. Phytochemi 14, 2383–2386.

[4] 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. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7473–7477.

[5] Matoba, Y., Kumagai, T., Tamamoto, A., Yoshitsu, H., and Sugiyama, M. (2006) Crystallographic evidence that dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. J. Biol. Chem. 281, 8981–8990.

[6] Himmelwright, R. S., Eickman, N. C., LuBien, C. D., Lerch, K., and Solomon, E. I. (1980) Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of Neurospora tyrosinase: comparison to

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

hemocyanins. J. Am. chem. Soc. 102, 7339−7344.

[7] Volbeda, A. and Hol, W. G. J. (1989) Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. J. Mol. Biol. 209, 249-279.

[8] Magnus, K.A., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventur, C., Bonaventur, J., and Hol, W. G. (1994) Proteins 19, 302-309.

[9] Friedman, M. (1996) Food browning and its prevention: An overview. J. Agric. Food Chem. 44, 631–653.

[10] Kubo, I. and Kinst-Hori, I. (1998) Tyrosinase inhibitors from cumin. J. Agric. Food Chem. 46, 5338–5341.

[11] Beerntsen, B. T., James, A. A. and Christensen, B. M. (2000) Genetics of mosquito vector competence. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64, 115–137.

[12] Chen, C. C. and Chen, C. S. (1995) Brugia pahangi: Effects of melanization on the uptake of nutrients by microfilariae in vitro. Exp. Parasitol. 81, 72–78.

[13] Ensminger, A. H., Ensminger, M. E., Konlande, J. E. and Robson, J. R. K. (1995) The Concise Encyclopedia of Foods and Nutrition. Boca Raton, LA, CRC Press.

[14] Viterbo, A. and Yagen, B. (1993) Cucurbitacins, 'attack' enzymes and laccase in *Botrytis cinerea*. Phytochemi 32, 61-65.

[15] Robb, D. A. (1984). Tyrosinase. In R. Lontie (Ed.), Copper proteins and copper enzymes (Vol. II, pp. 207–240). Boca Raton, FL: CRC Press.

[16] Copeland, R. A. (2000) *Enzymes,* United States of America, Wiley-VCH.

[17] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–54

[18] Shin, N. H., Ryu, S. Y., Choi, E. J., Kang, S. H., Chang, I. M., Min, K. R., and Kim, Y. (1998) Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 243, 801-803.

[19] Friedman, M. J. (1996) Food Browning and Its Prevention: An Overview. J. Agric. Food Chem. 44, 631-653.

[20] Sugumaran, M. (1991) Molecular Mechanism for Mammalian Melanogenesis. FEBS Lett. 293, 4-10.

[21] Marshall, M. R., Kim, J. and Wei, C. I. (2000) Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods, FAO.

[22] Miyazawa, M., Oshima, T., Koshio, K., Itsuzaki, Y., and Anzai, J. J. (2003) Agric. Food Chem. 51, 6953– 6956.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

[23] Iozumi, K., Hoganson, G. E., Pennella, R., Everett, M. A., and Fuller, B. B. J. (1993) Invest. Dermatol, 100, 806.

[24] Briganti, S., Camera, E., and Picardo, M. (2003) Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. Pigm. Cell Res. 16, 101-110.

[25] Xie, J. J., Song, K.K., Qiu, L., He, Q., Huang, H., and Chen, Q.X. (2007) Inhibitory effects of substrate analogues on enzyme activity and substrate specificities of mushroom tyrosinase. Food Chem. 103, 1075–1079.

[26] Kubo, I., Kinst-Hori, I. J. (1999) Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. J. Agric. Food Chem. 47, 4121–4125.

[27] Casanola-Martin, G. M., Marrero-Ponce, Y., Khan, M. T. H., Ather, Khan, A., K. M., Torrens, F., Rotondo, R. (2007) Dragon method for finding novel tyrosinase inhibitors: Biosilico identification and experimental in vitro assays. Eur. J. Med. Chem. 42, 1370-1381.

[28] Gasowska, B., Kafarski P., and Wojtasek, H. (2004) Interaction of mushroom tyrosinase with aromatic amines, *o*-diamines and *o*-aminophenols. Biochim. Biophys. Acta 1673, 170– 177.

[29] Decker, H. and Tuczek, F. (2000) Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. Trends Biochem. Sci. 25, 392– 397.

[30] Decker, H., Dillinger, R., and Tuczek, F. (2000) How does tyrosinase work? Recent insights from model chemistry and structural biology, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 39, 1591– 1595.

[31] Sánchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., and García-Carmona, F. (1995) Tyrosinase: A comprehesive review of its mechanism. Biochim. Biophys. Acta 1247, 1–11.

[32] Iida, K., Hase, K., Shimomura, K., Sudo, S., Kadota, S., and Namba, T. (1995) Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from Rheum officinale. Planta Med. 61, 425–428.

[33] Toussaint, O. and Lerch, K. (1987) Catalytic oxidation of 2-aminophenols and ortho hydroxylation of aromatic amines by tyrosinase. Biochemistry 26, 8567– 8571.

[34] Maddaluno, J. F. and Faull, K. F. (1988) Inhibition of mushroom tyrosinase by 3-amino-L-tyrosine: molecular probing of the active site of the enzyme. Experientia 44, 885– 887.

[35] Casa~nola-Martı´n, G. M., Marrero-Ponce, Y., Khan, M. T. H., Ather, A., Khan, K.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]

M., Torrens, F., and Rotondo, R. (2007) Dragon method for finding novel tyrosinase inhibitors: Biosilico identification and experimental *in vitro* assays. Eur. J. Med. Chem. 42, 1370-1381.

[36] Espin, J. C. and Wichers, H. J. (1999) Kinetic Study of the oxidation of gamma-L-glutaminyl-4-hydroxybenzene catalyzed catalyzed by (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. J. Agric. Food Chem. 47, 2638–2644.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-04-20]