

مهار تیروزیناز قارچی با نیتروآنیلین ها و مشتقات وانیلینی آن ها

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 زیست شناسی، 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 علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دکترای بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۵- استاد شیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۶- دانشیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

*تهران، کدپستی ۱۵۴-۱۴۱۱۵

sajedi_r@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۲، پذیرش: ۹۰/۱۲/۳)

چکیده- تیروزیناز یا پلی فنل اکسیداز (PPO) یک منواکسیژناز حاوی مس می باشد که مسئول تولید ملانین در جانوران می باشد. این آنزیم هر دو فعالیت هیدروکسیلاسیون منوفنل ها به O-دی فنل ها (فعالیت مونوفنلازی) و اکسایش آن به O-کوئینون ها (فعالیت دی فنلازی) را بروز می دهد. مهار تیروزیناز بسیار مهم و جستجو برای مهارکننده های جدید تیروزیناز جذاب بوده است. در این تحقیق، برای اولین بار اثر ۲-نیتروآنیلین (a)، ۳-نیتروآنیلین (b)، ۴-نیتروآنیلین (c) و همچنین مشتقات وانیلینی جدید آن ها یعنی ۲-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل ۲-متوکسی فنولات (d)، ۳-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل ۲-متوکسی فنولات (e) و ۴-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل ۲-متوکسی فنولات (f) روی فعالیت دی فنلازی تیروزیناز با استفاده از دوپامین هیدروکلرید مورد بررسی قرار گرفته است. از میان آن ها، ترکیب c قویترین مهارکننده و ترکیب d به عنوان فعال کننده شناخته شد. IC₅₀ این ترکیبات به این ترتیب بود: c > e > f = a > b. ترکیبات a، b و f مهارکننده های رقابتی و c و e نیز مهارکننده های نارقابتی بود. نتایج نشان می دهد، موقعیت گروه های آمینو و نیترو و قدرت الکترون کشندگی گروه های عاملی در کربن شماره ۱، به ترتیب در نیتروآنیلین ها و مشتقات وانیلینی آن ها در قدرت مهارشان مهم است.

کلیدواژگان: تیروزیناز، قهوه ای شدن آنزیمی، مهارکنندگی، نیتروآنیلین ها.

۱- مقدمه

قهوه‌ای شدن^۱ توسط آنزیم در سبزیجات، میوه‌ها و غذاهای دریایی به واسطه فعالیت آنزیم تیروزیناز (EC 1.14.18.1) می‌باشد. این آنزیم که پلی فنل اکسیداز نیز خوانده می‌شود، در گستره وسیعی از موجودات زنده از باکتری‌ها تا پستانداران وجود دارد و عملکرد آن شامل فعالیت مونوفنولازی^۲ (کرسولازی)^۳ و دی فنولازی^۴ (کتکولازی)^۵ می‌باشد که باعث بیوسنتز ملانین و اورتو-هیدروکسیلاسیون تیروزین (مونوفنول) به ۳ و ۴-دی هیدروکسی فنیل آلانین یا DOPA (ارتو-دی فنول) و اکسیداسیون DOPA به دوپاکوئینون (ارتو-کوئینون) می‌شود. نتایج تجربی به دست آمده روی تیروزیناز تا به امروز نشان داده است که همه تیروزینازها از منابع مختلف منومرهای سه دومینی با بیش از یک ایزوفریم هستند [۱-۴]. در حال حاضر، خصوصیات جایگاه فعال و واکنش پذیری تیروزیناز عمدتاً از طریق ارتباط آن با هموسیانین که یک پروتئین حاوی مس مایل به آبی^۶ در نرم تنان و بندپایان می‌باشد، روشن شده است [۲ و ۵] و هنوز ساختار کریستالی از این آنزیم در دست نیست [۶-۸].

از دیدگاه تجاری و اقتصادی، این آنزیم دارای دو عملکرد متفاوت است. از یک سو باعث ایجاد رنگ قهوه‌ای ناخواسته محصولات کشاورزی می‌شود و از سوی دیگر منجر به تغییر رنگ و ظاهر غذاهای دریایی با ارزش 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 سخت شدن و تولید کیتین، جهت کنترل مراحل مختلف پوست اندازی در سخت پوستان و حشرات و نیز عمل به عنوان یک سیستم ایمنی ذاتی و بی نظیر در این موجودات، برای پاسخ به انگل‌ها و بیماری‌زها، 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 به واسطه 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 ۱۴]. از این نظر، ترکیبات فعال کننده آنزیم دارای اهمیت اند. با توجه به مطالب ذکر شده 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

آنزیم است و در این راستا اثر ترکیبات ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین، ۴-نیتروآنیلین، و همچنین مشتقات وانیلینی جدید آن‌ها یعنی ۲-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات، ۳-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ۴-نیتروبنزن آمینیوم ۴-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 در دسترس است. لازم به ذکر است که اثر مهارتی 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) (3-Methyl-2-Benzothiazolinone MBTH, (USA, hydrazone)، ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین، ۴-نیتروآنیلین و سایر ترکیبات از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد. ترکیبات سنتزی جدید ۲-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات، ۳-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ۴-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات نیز در آزمایشگاه تحقیقاتی شیمی آلی دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان تهیه شد.

روش عمومی سنتز ترکیبات ۲-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات، ۳-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ۴-نیتروبنزن آمینیوم ۴-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 کامل شدن واکنش، مخلوط واکنش صاف و خشک شد. در مرحله بعد، جامد روی صافی پس از تبلور مجدد توسط IR شناسایی شد.

۲-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات
IR (KBr, v/cm^{-1}): ۳۱۰۰, ۱۶۱۰, ۱۵۸۰, ۱۵۰۰, ۱۴۶۰, ۱۴۲۰, ۱۳۴۰, ۱۳۰۰, ۱۲۸۰, ۱۱۶۰, ۷۳۰

۳-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات
IR (KBr, v/cm^{-1}): ۳۱۵۰, ۱۶۲۰, ۱۵۹۰, ۱۵۲۰, ۱۴۸۰, ۱۳۵۰, ۱۰۹۰, ۸۲۰, ۷۳۰

۴-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات
IR (KBr, v/cm^{-1}): ۳۱۰۰, ۱۶۲۰, ۱۵۸۰, ۱۵۱۰, ۱۴۷۰, ۱۴۴۰, ۱۳۲۰, ۱۲۹۰, ۱۱۸۰, ۱۱۰۰, ۸۴۰

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 (۱۹۸۴) 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 ۴۰۰ μl بافر

فسفات ۵۰ mM با $\text{pH} = 7.8$ بود. به منظور تعیین فعالیت آنزیمی از ضریب خاموشی $3700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ برای محصول استفاده شد.

تعیین غلظت پروتئین

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

۳-۲- بررسی اثر مهارکننده‌ها روی فعالیت آنزیم

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

۴-۲- تعیین IC_{50}

برای بدست آوردن IC_{50} مهارکننده‌ها از روی منحنی دز-پاسخ^۱ [۱۶]، فعالیت آنزیمی در غلظت ثابتی از سوپسترا و در غلظت‌های مختلف هر یک از مهارکننده‌ها بدست آمد و سپس منحنی V_i/V_0 علیه $\log [I]$ رسم گردید. V_0 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 سوپسترا (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 لینیو-برک به دست آمد.

۳- یافته‌ها

ترکیبات مورد بررسی شامل ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین، ۴-نیتروآنیلین، ۲-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات، ۳-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ۴-نیتروبنزن آمینوم ۴-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 آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات افزایش و در حضور سایر ترکیبات کاهش می‌یابد. بنابراین، ۲-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات به عنوان فعال کننده و سایر ترکیبات به عنوان مهارکننده نسبت به این آنزیم عمل می‌کنند. پس از تعیین غلظت آنزیم و رقیق سازی پی در پی آن، بهترین غلظت آنزیم جهت بررسی اثر مهارکننده‌ها و تعیین پارامترهای سینتیکی انتخاب و فعالیت آنزیمی آن سنجش می‌شود.

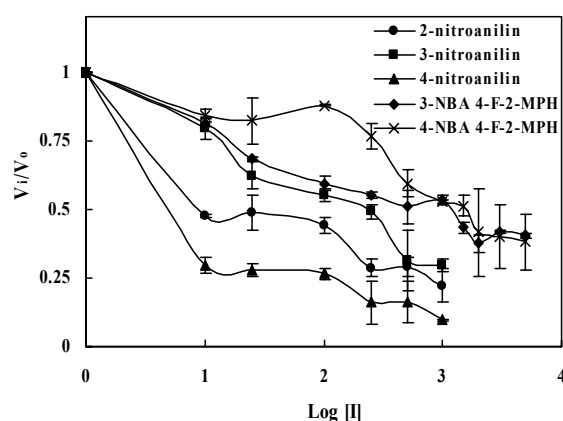
۳-۱- منحنی دز-پاسخ

به منظور مقایسه بهتر اثر بازدارندگی یا فعال کنندگی ترکیبات مورد مطالعه، همچنین محاسبه IC_{50} مهارکننده‌ها، منحنی Dose-response برای هر یک از ترکیبات رسم شد (شکل ۱). ترکیبات ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ۴-نیتروآنیلین که دارای یک حلقه بنزن، یک گروه آمین

1. Dose-response curve

مهارکننده محاسبه شد (شکل ۲). مقادیر V_{max} و K_m مهارکننده‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

به منظور 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 لاین و یور-برک آنزیم در حضور و عدم حضور مهارکننده). از آنجایی که در حضور ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ۴-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات، V_{max} آنزیم تقریباً ثابت اما K_m آن تغییر شدیدی نشان می‌دهد، این ترکیبات به عنوان مهارکننده‌های رقابتی عمل می‌کنند. در حالی که در حضور ترکیبات ۴-نیتروآنیلین و ۳-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات هر دو پارامتر V_{max} و K_m کاهش می‌یابد. بنابراین این دو ترکیب به عنوان مهارکننده نارقابتی عمل می‌کنند (شکل ۲ و جدول ۱).

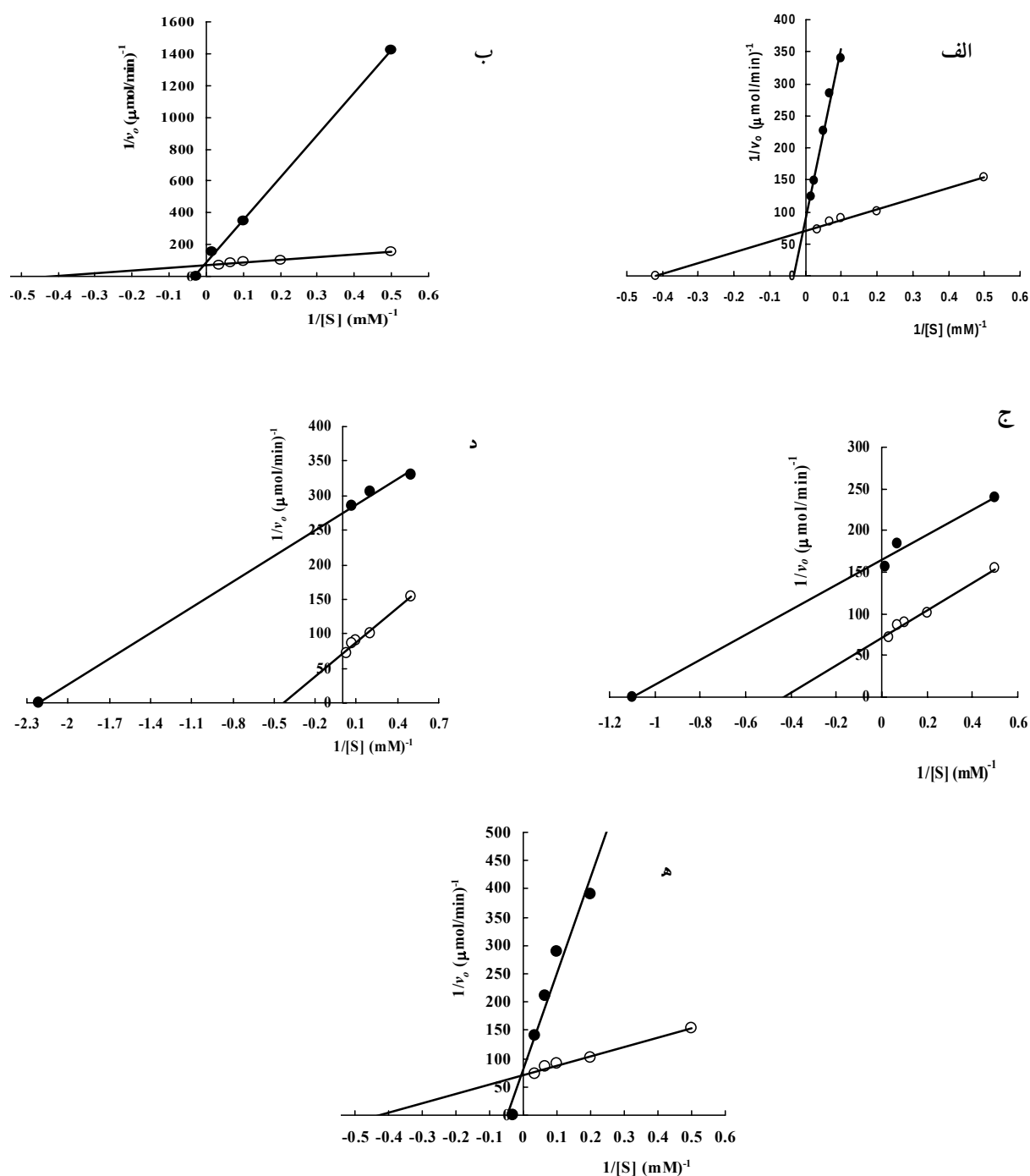


شکل ۱ منحنی‌های دز- پاسخ مهار کننده‌های مورد مطالعه.

(-NH₂) و نیز یک گروه نیترو (-NO₂) به ترتیب در موقعیت‌های ارتو، متا و پارا می‌باشند، سبب کاهش فعالیت آنزیم شده و به عنوان مهارکننده شناخته می‌شود. ۳-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ۴-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات به ترتیب از ترکیب گروه آمین ۳-نیتروآنیلین و ۴-نیتروآنیلین با عامل الکلی موقعیت پارای وانیلین، بدست آمده‌است، نیز به عنوان مهارکننده آنزیم تیروزیناز شناخته می‌شود. اثر مهارکنندگی ترکیبات فوق بر روی فعالیت آنزیمی به وضوح در منحنی‌های رسم شده در شکل ۱ دیده می‌شود. مقادیر IC_{50} محاسبه شده برای این ترکیبات نیز در جدول ۱ آورده شده است. ترکیب ۲-نیتروبنزن آمینوم ۴-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 به عنوان فعال کننده آنزیم تیروزیناز شناخته می‌شود.

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

فعالیت دی فنولازی تیروزیناز قارچی که با استفاده از غلظت‌های مختلف دوپامین هیدروکلراید به عنوان سوبسترا بررسی گردید، از سینتیک میکائلیس-منتن تبعیت می‌کند. پارامترهای سینتیکی V_{max} و K_m برای آنزیم با استفاده از منحنی لاین و یوربرک در عدم حضور



شکل ۲ منحنی‌های لینویر-برک آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور مهارکننده‌ها (●) و عدم حضور آن‌ها (○):

الف) ۲-نیتروآنیلین، ب) ۳-نیتروآنیلین، ج) ۴-نیتروآنیلین، د) ۳-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ه) ۴-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات.

جدول ۱ مقایسه پارامترهای سینتیکی 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 ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات ۲-متوکسی فنولات بعنوان تنها ترکیب فعال کننده در این تحقیق، در ردیف آخر آمده است.

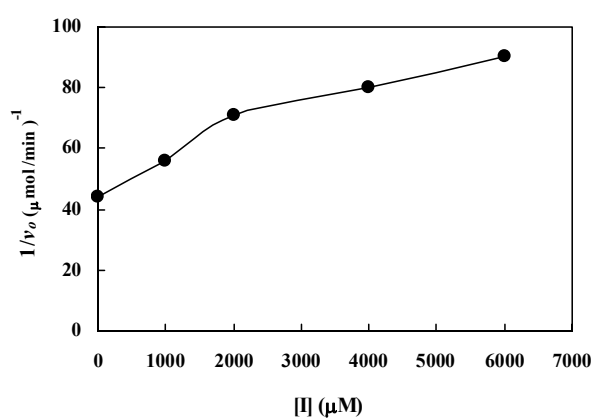
Inhibitor	Inhibition Type	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/min}$)	IC_{50} (μM)	Structure
-	-	2.3	0.014	-	-
2-nitroaniline	Competitive	31	0.014	1000	
3-nitroaniline	Competitive	37.6	0.014	6000	
4-nitroaniline	Uncompetitive	0.91	0.006	150	
3-nitrobenzenaminium 4-formil-2-metoxyphenolate	Uncompetitive	0.45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

۳-۳-۳ منحنی‌های دیکسون

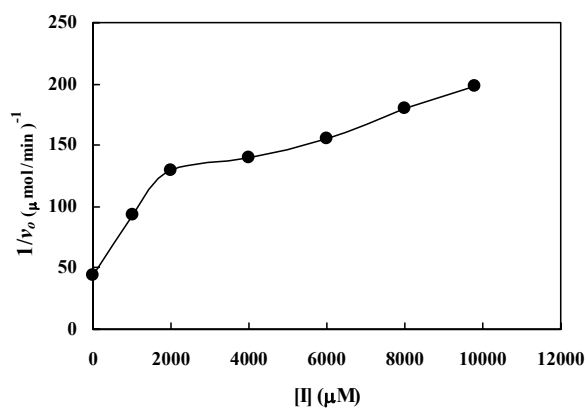
برای تشخیص جزئی یا کامل بودن مهار، رفتار مهارکنندگی در محدوده وسیعی از غلظت مهارکننده مورد بررسی قرار گرفت. یکی از بهترین راه‌های تشخیص مهار جزئی از مهار کامل، رسم منحنی دیکسون است. به این منظور این منحنی‌ها در غلظت ثابتی از سوبسترا و غلظت‌های مختلف مهارکننده در مقابل $1/v_0$ رسم می‌شود. در مهار کامل، منحنی

دیکسون به صورت خطی می‌باشد در حالی که در مهار جزئی، منحنی به صورت 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^۸ می‌باشد.

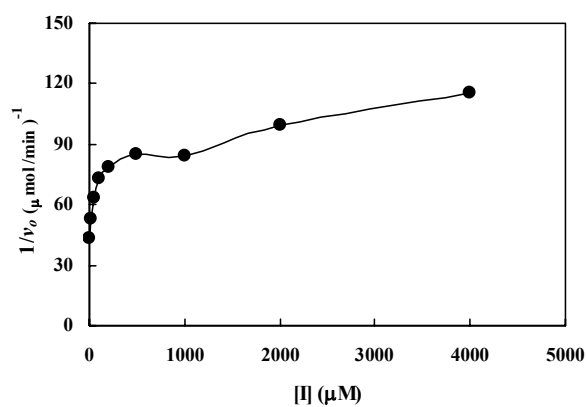
8. Partial inhibition



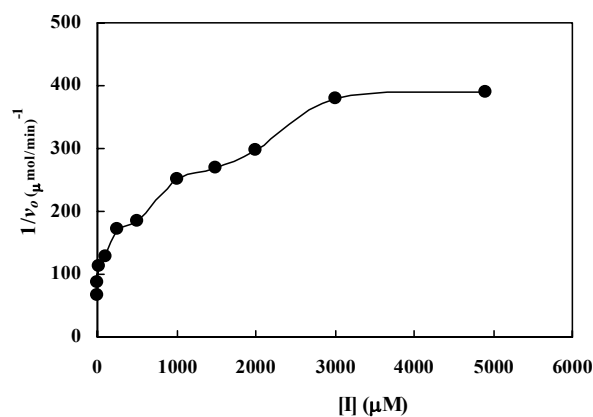
ب



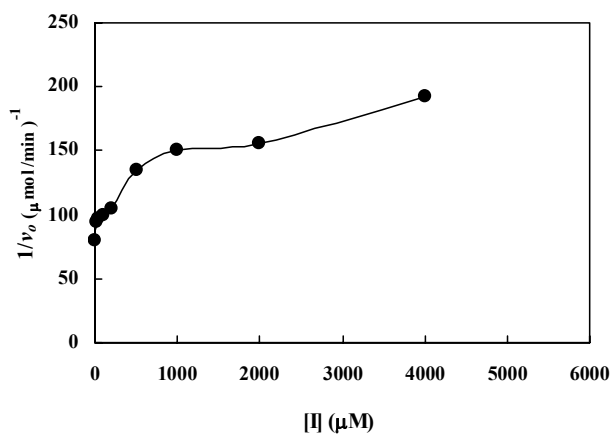
الف



د



ج



هـ

شکل ۳ منحنی دیکسون آنزیم تیروزیناز قارچی، الف) ۲-نیتروانیلین، ب) ۳-نیتروانیلین، ج) ۴-نیتروانیلین، د) ۳-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ه) ۴-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات.

۴- بحث

تیروزیناز برای ملانیزاسیون در جانوران و قهوه‌ای شدن در گیاهان و قارچ‌ها مورد نیاز است. این فرآیندها در هیپرپیگمانتاسیون موضعی نظیر ملازوما^۹، ایفلد^{۱۰} و لنتیگو^{۱۱} دخالت دارند [۱۸]. مضرات قهوه‌ای شدن یا ملانوزنر 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 قهوه‌ای شدن 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 قهوه‌ای شدن در محصولات غذایی یک فرآیند ناخواسته است، نیاز به ترکیبات ممانعت‌کننده آن در صنایع غذایی، یک نیاز همیشگی است [۲۳ و ۲۴]. از این‌رو مهارکننده‌های تیروزیناز بسیار مورد توجه‌اند. مهم‌ترین مسأله برای این مهارکننده‌ها سلامتی^{۱۲} 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 دسترس نبودن 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 کوچیک اسید^{۱۳} و آربوتین^{۱۴} 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 اثرمهارری بعضی از مشتقات آنیلین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان می‌دهد، ۲- نیتروبنزن آمینیوم ۴- فرمیل-۲- متوکسی فنولات به‌عنوان فعال‌کننده و ۵ ترکیب دیگر یعنی ۲- نیتروآنیلین، ۳- نیتروآنیلین، ۴- نیتروآنیلین، ۳- نیتروبنزن آمینیوم ۴- فرمیل-۲- متوکسی فنولات و ۴- نیتروبنزن آمینیوم ۴- فرمیل-۲- متوکسی فنولات به‌عنوان مهارکننده‌های برگشت‌پذیر این آنزیم عمل می‌کنند. از

9. Melasoma
10. Ephelide
11. Lentigo
12. Safety

13. Kojic acid
14. Arbutin

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 -آمینوفل‌ها را اکسید نماید. ۳-آمینو-L-تیروزین به‌عنوان یک مهارکننده قوی برای تیروزیناز گزارش شده است. به‌علاوه آمین‌های آروماتیک O -دی آمین‌ها و O -آمینوفل‌ها به‌عنوان مهارکننده‌های تیروزیناز مورد شناسایی و بررسی قرار گرفته‌اند [۲۶، ۳۲ و ۳۳]. از طرف دیگر کاپفرون، نئوکاپفرون و N -nitrosohydroxylamine‌ها نیز به‌عنوان مهارکننده‌های تیروزیناز گزارش شده است [۳۴]. با توجه به ساختارهای فوق، اثرمهار ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ۴-نیتروآنیلین در این تحقیق برای اولین بار روی تیروزیناز قارچی مورد مطالعه قرار گرفته است. هر سه مشتق آنیلین مورد مطالعه در این تحقیق اثرمهار روی آنزیم نشان دادند. مقایسه IC_{50} مشتقات آنیلین مشخص کرد که اثرمهار این سه ترکیب به‌صورت ۳-نیتروآنیلین > 2 -نیتروآنیلین > 4 -نیتروآنیلین افزایش می‌یابد. ۴-نیتروآنیلین با IC_{50} برابر $150 \mu M$ در بین مهارکننده‌های تیروزینازی شناخته شده دارای قدرت مهار نسبتاً بالایی است و در این تحقیق بیشترین اثرمهار را نشان داد. موقعیت گروه‌های NH_2 و NO_2 - نسبت بهم اثر بسزایی روی قدرت مهار مشتقات آنیلین دارد. مشتقات آنیلین را می‌توان با آمین‌های آروماتیک که اثر آن‌ها روی تیروزیناز قارچی قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته، مقایسه کرد [۲۶]. این موارد و نتایج این تحقیق نشان می‌دهد، موقعیت نسبی استخلاف‌ها در اورتو 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 اثرمهار بسیار بیشتر کوپفرون نسبت به ۴-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 حالی که ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ۴-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 ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات حاصل می‌شود که اثر فعال‌کنندگی روی آنزیم تیروزیناز دارد. حال آنکه ۳-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات و ۴-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات به‌عنوان مهارکننده این آنزیم عمل می‌کنند. به نظر می‌رسد در مولکول ۲-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات پس از ترکیب شدن، گروه‌هایی که در اتصال آن و بلوکه نمودن 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 مورد نیاز جهت مهار آنزیم امکان‌پذیر می‌باشد. IC_{50} ۳-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات نسبت به ۴-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات پایین تر و قدرت مهار آن بیشتر می‌باشد. ۳-نیتروبنزن آمینیوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات از نظر قدرت مهار در این بررسی بعد از ۴-نیتروآنیلین قرار

۶- 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
- 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 آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات طوری است که اتصال مناسب‌تری با آنزیم برقرار می‌کند.
- ترکیبات ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ۴-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات به‌عنوان مهارکننده‌های رقابتی این آنزیم عمل می‌کند؛ در حالی که نوع مهارکنندگی برای ترکیبات ۴-نیتروآنیلین و ۳-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات از نوع نارقابتی بود. به عبارت دیگر، ۲-نیتروآنیلین، ۳-نیتروآنیلین و ۴-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات توانایی اتصال به جایگاه فعال را دارند. ۴-نیتروآنیلین و ۳-نیتروبنزن آمینوم ۴-فرمیل-۲-متوکسی فنولات تنها به کمپلکس آنزیم-سوبسترا متصل می‌شوند. والکر و ویلسون گزارش نمودند، زمانی که سوبسترا به آنزیم متصل می‌شود، تغییرات کونفورماسیونی را در آنزیم ایجاد می‌نماید؛ طوری که جایگاه هیدروفوبی که عمدتاً مربوط به اتصال مهارکننده‌ها است و در نزدیکی جایگاه فعال قرار دارد، بزرگتر می‌شود [۳۶]. ۴-نیتروآنیلین و ۳-نیتروبنزن آمینوم ۴-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 ذکر شده می‌باشد. سایر ترکیبات توانایی اتصال به آنزیم را به‌صورت آزاد (مهار رقابتی) دارند.

۵- سپاسگزاری

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

- 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 quantities 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.
- 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

- [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 comprehensive 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] Casanola-Martín, G. M., Marrero-Ponce, Y., Khan, M. T. H., Ather, A., Khan, K.
- [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.

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