

بازدارندگی ترکیب‌های ان - بوتیل، ان - هگزیل و ان - اکتیل دی تیوکاربامات و برخی اسیدی‌های خطی روی فعالیت آنزیم تایروزیناز قارچ خوراکی

نعمت اله غیبی*⁺

قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و فیزیکی پزشکی

علی اکبر صبوری

تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، گروه بیوفیزیک

چکیده: اثر بازدارندگی سه ترکیب ان - بوتیل (I)، ان - هگزیل (II) و ان - اکتیل (III) دی تیوکاربامات روی دو فعالیت کاتکولازی و کروزولازی آنزیم تایروزیناز با منشأ قارچ خوراکی مورد بررسی قرار گرفت. بازدارندگی این ترکیب‌ها در واکنش کاتکولازی از نوع مختلط بوده و ثابت بازدارندگی این ترکیب‌ها به ترتیب ۹/۴، ۱۵/۱ و ۲۸/۵ میکرومولار و مقادیرهای فاکتور برهمکنش بین سویسترا و بازدارنده (α) به ترتیب ۲/۸، ۴/۵ و ۴/۶ به دست آمد. عملکرد بخش کربوکسیلیک اسیدها روی فعالیت‌های کاتکولازی و کروزولازی آنزیم در مجاورت برخی از اسیدهای آلفاتیک انجام گرفت. بیشترین فعالیت کاتکولازی آنزیم در مجاورت اسیدهای پیرویک، اکریلیک، پروپانویک، ۲- اکسوبوتانویک و ۲- اکسواکتانویک به ترتیب در غلظت‌های ۱، ۱/۲۵، ۲، ۲/۲ و ۳ میلی مولار به دست آمد. اسیدهای مذکور در واکنش‌های کروزولازی، اثر بازدارندگی از خود نشان دادند. پروپانویک اسید دارای الگوی بازدارندگی ضد رقابتی است ($K_i=0.14$). اما در اسیدهای پیرویک، اکریلیک، ۲- اکسوبوتانویک و ۲- اکسواکتانویک اسید بازدارندگی از نوع رقابتی است. ثابت بازدارندگی (K_i) این چهار اسید به ترتیب ۰/۳۶، ۰/۷۵، ۳/۶ و ۴/۵ میلی مولار به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: تایروزیناز قارچی، بازدارندگی، دی تیوکاربامات‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک خطی.

KEY WORDS: Mushroom Tyrosinase, Inhibition, Dithiocarbamates, n-alkyl carboxylic acids.

مقدمه

در سال ۱۸۹۵ میلادی برمی گردد که قارچ خوراکی آسیب دیده هنگامی که در معرض هوا قرار می گرفت سیاه می شد [۱]. مطالعه‌های زیادی برای یافتن علت تغییر رنگ در سطوح متفاوت حیات از سطوح پایین تا موجودهای عالی تر انجام گرفته است [۶-۲]، بدان علت که

در سی سال اخیر آنزیم تایروزیناز (پلی فنل اکسیداز: EC 1.14.18.1) به عنوان یک نمونه مناسب جهت بررسی طیف وسیعی از موضوع‌های علمی مورد توجه فراوان قرار گرفته است. نخستین مطالعه‌های بیوشیمیایی در این خصوص به سال

*E-mail :gheibi_n@yahoo.com

*عهده دار مکاتبات

مس در جایگاه فعال آنزیم اعمال می‌کنند. در عین حال این شرط وقتی برقرار است که گروه ۳- هیدروکسی، آزاد باشد. هم چنین این پژوهشگران نشان داده‌اند که گروه ۳- هیدروکسی یک نیاز ضروری برای بازدارندگی آنزیم نیست. چنان که برخی فلاوونوئیدها مانند luteolin 4'-o-glucoside و 7-o-glucoside فاقد گروه ۳- هیدروکسی هستند اما در عین حال ویژگی‌های بازدارندگی از خود نشان می‌دهند [۲۱]. در سال‌های اخیر نشان داده شده است فلاوونوئیدهایی که دارای گروه α -کتو هستند ویژگی‌های بازدارندگی قوی از خود نشان می‌دهند [۲۷]. یک ترکیب مهم دیگر این گروه گالیک اسید است که به صورت استر با D- گلوکز وجود دارد و استرهای آن به فراوانی در افزاینده‌ها در صنایع غذایی به کار می‌رود. گالیک اسیدهای گوناگون و مشتقات آن‌ها از چای [۲۸] و Galla rhois [۲۹] استخراج شده‌اند و برخی از آن‌ها به عنوان بازدارنده‌های قوی تایروزیناز محسوب می‌شوند. از طرفی مطالعه‌های دیگر نشان داده‌اند، که قدرت بازدارندگی کربوکسیلیک اسیدهای آروماتیک با استری کردن، هیدروکسیل کردن و متیل کردن حلقه بنزنی کاهش می‌یابد [۳۱،۳۰].

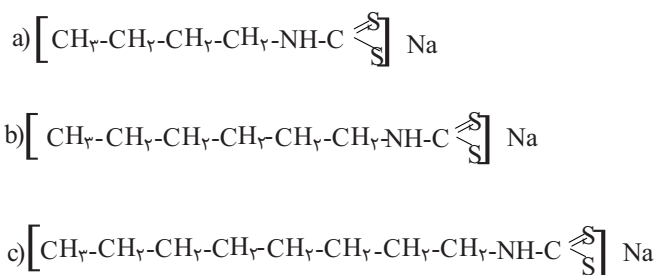
نتیجه‌های مطالعه‌های ما در این پژوهش یک نوع جدید از بازدارنده‌های طبیعی تایروزیناز را مشخص می‌کند که کاربرد این ترکیب‌ها در آینده برای درمان هایپرپیگمنتاسیون، درمان برخی اختلال‌های پوستی یا در طراحی مواد آرایشی با خاصیت سفیدکنندگی پوست در کلینیک و نیز طراحی بازدارنده‌های جدید برای جلوگیری از قهوه‌ای شدن گیاهان به ما کمک خواهد کرد. لذا ابتدا اثر بازدارندگی ترکیب‌های دی تیوکارباماتی سنتز شده به صورت نمک‌های سدیم، شامل ان- بوتیل دی تیو کاربامات (I)، ان- هگزیل دی تیو کاربامات (II) و ان- اکتیل دی تیو کاربامات (III) با در نظر گرفتن دم آلیفاتیک متغیر (C_4, C_6, C_8) و سر قطبی یکسان آن‌ها (شکل ۱)، در دو واکنش کاتکولازی و کروزولازی بررسی می‌شوند. سپس جهت شناخت اثر بخش کربوکسیلیک اسیدهای پیروئیک، آکریلیک، پروپانویک، ۲- اکسوبوتانویک و ۲- اکسواکتانویک (شکل ۲)، و تأکید بر اثر بخش‌های غیر اشباع آن‌ها روی فعالیت آنزیم تایروزیناز، دو فعالیت کاتکولاز و کروزولازی آنزیم به ترتیب با استفاده از سوبستراهای MeBACat و MePAPH در مجاورت غلظت‌های متفاوت اسید مورد بررسی قرار می‌گیرند.

این تغییر مربوط به بازدارنده‌های درون‌زاد است، ردیابی آن در برخی موارد امکان‌پذیر نیست [۷،۸]. آنزیم مربوط به این تغییرهای رنگ بعدها تایروزیناز نام گرفت که دارای یک موضع فعال حاوی دو اتم مس در قارچ خوراکی متداول و هم چنین در تایروزیناز ملانومای بدخیم انسانی است [۹،۱۰]. در گیاهان عالی‌تر و قارچ‌ها، تایروزیناز در ایزوفرم‌های متنوع از جمله نوع نابالغ، بالغ نیهفته و فرم فعال یافت می‌شود [۱۱،۱۲].

مطالعه‌های اولیه تایروزیناز از قارچ خوراکی متداول گونه Agaricus bisporus نشان می‌دهد که آنزیم دارای وزن مولکولی ۱۱۰ تا ۱۳۰ هزار دالتون است [۱۳]، همچنین آنزیم به‌عنوان یک پروتئین تترامر مرکب از زیرواحد‌های یکسان کاتالیتیکی ۳۲ هزار دالتونی است. در دهه ۱۹۷۰ میلادی، ساختار تترامریک حاوی دو زیرواحد ۴۳ هزار دالتونی (H) و دو واحد ۱۳ هزار دالتونی (L) بیان شد [۱۴]. ساختار چهارم آنزیم به‌صورت تترامریک H_2L_2 با وزن مولکولی به تقریب ۱۱۰ هزار دالتون و حاوی چهار اتم مس است [۱۵].

اگرچه ۹۸ تا ۹۹ درصد تایروزیناز در قارچ به حالت نیهفته وجود دارد ولی مقدار اندک آنزیم فعال، پتانسیل سیاه کردن قارچ در طی بلوغ یا آسیب هنگام برداشت را دارد. این پدیده باعث خسارت‌های اقتصادی به صنایع تولید قارچ می‌شود و به این لحاظ بازدارندگی آنزیم اهمیت می‌یابد. رایج‌ترین بازدارنده برای جلوگیری از سیاه شدن، سولفیت است [۱۶]، افزون بر این بازدارنده‌های تایروزیناز ممکن است برای درمان برخی اختلال‌های پوستی که همراه با تولید بیش از حد ملانین هستند به کار رود. هم چنین استفاده از بازدارنده‌های تایروزیناز در مواد آرایشی با خاصیت سفیدکنندگی پوست امکان‌پذیر است [۱۹ - ۱۷]. بنابراین، نیاز برای مشخص کردن ترکیب‌هایی که بازدارنده فعالیت تایروزیناز هستند وجود دارد. برخی از بازدارنده‌های پلی فنلی قوی تایروزیناز مثل Kaempferol [۲۰ - ۲۲]، Quercetin [۲۳ و ۲۴]، Kurarinone و Kushnol [۲۵] از گیاهان گوناگون استخراج شده‌اند. پژوهش‌های بسیار زیادی توسط کوبو^(۱) و همکارانش برای شناسایی بازدارنده‌های طبیعی و ارتباط بین فعالیت و توان بازدارندگی آن‌ها با ساختار این ترکیب‌ها انجام شده است [۲۶]. این پژوهش‌ها نشان داده است همه فلاوونوئیدها بازدارندگی خود را بر روی آنزیم از راه توانایی شلاته کردن

(۱) Kubo



شکل ۱- فرمول باز شده ترکیب‌های دی تیوکارباماتی ان - بوتیل دی تیو کاربامات (a)، ان - هگزیل دی تیوکاربامات (b) و ان - اکتیل دی تیوکاربامات (c).

$\text{CH}_2\text{-CO-COOH}$	Pyruvic acid
$\text{CH}_2=\text{CH-COOH}$	Acrylic acid
$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	Propanoic acid
$\text{CH}_2\text{-CH=C(OH)-COOH}$	2-Oxo-butanoic acid
$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=C(OH)-COOH}$	2-Oxo-octanoic acid

شکل ۲- فرمول باز شیمیایی اسیدهای به کار گرفته شده در مطالعه.

بخش تجربی

مواد

مهار تایروزیناز به وسیله ترکیب‌های بازدارنده دی تیوکارباماتی در سه ترکیب ان - بوتیل (I)، ان - هگزیل (II) و ان - اکتیل (III) دی تیوکاربامات به کمک سوبسترای کافئیک اسید در واکنش کاتکولازی و پاراکوماریک اسید در واکنش‌های کروزولازی صورت پذیرفت.

فعالیت کاتکولازی با برداشت سوبسترای کافئیک اسید در بیشترین طول موج آن یعنی ۳۱۱ نانومتر، زمان ۲ دقیقه و با غلظت آنزیمی ۱۱/۸ میکرومولار یا ۴۰ واحد آنزیمی در میلی‌لیتر صورت گرفت. فعالیت کروزولازی نیز با برداشت پاراکوماریک اسید در بیشترین طول موجش یعنی ۲۸۸ نانومتر، زمان ۱۰ دقیقه و غلظت آنزیمی ۱۷/۷ میکرومولار یا ۶۰ واحد آنزیمی در میلی‌لیتر سنجش شد.

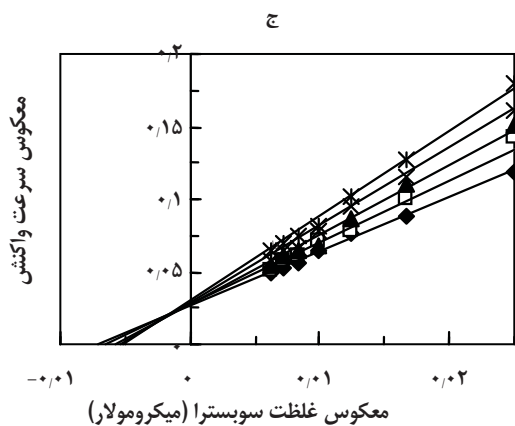
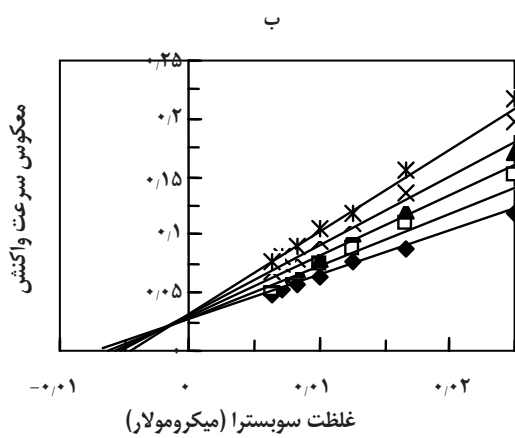
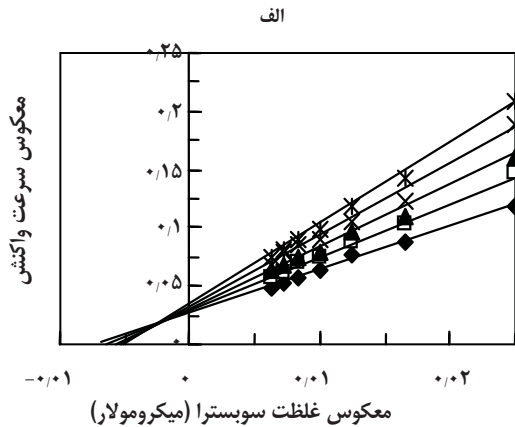
سنجش فعالیت آنزیم در مجاورت اسیدهای کربوکسیلیک

واکنش‌های کاتکولازی و کروزولازی در مجاورت سوبسترهای MePAPh (4-[4-Methylphenyl] azo) phenol و MePACat (4-[(4-methylphenyl) azo]-1,2- benzenediol) به ترتیب در طول موج‌های ۳۵۲ و ۳۶۴ نانومتر و در بازه‌های زمانی ۱۰ و ۲ دقیقه در تامپون فسفات با pH=۶/۸ و دمای ۲۹۳ کلوین انجام شد. غلظت آنزیم ۱۱/۸ میکرومولار یا ۴۰ واحد در میلی‌لیتر در واکنش کاتکولاز و ۷۰/۸ میکرومولار یا ۲۴۰ واحد در میلی‌لیتر در واکنش کروزولاز استفاده شد. فعالیت‌های کاتکولاز و کروزولاز آنزیم در مجاورت اسیدهای

تایروزیناز قارچ خوراکی (کد آنزیمی: ۱،۱،۱،۱۴) با وزن مولکولی $M_w = 120 \text{ KD}$ جامد و با فعالیت ویژه ۳۴۰۰ واحد بر میلی‌گرم خریداری از سیگما (T-۷۷۵۵). ترکیب‌های ان - بوتیل دی تیو کاربامات (I)، ان - هگزیل دی تیوکاربامات (II)، ان - اکتیل دی تیوکاربامات (III)، (۴- متیل فنیل) آزو] - فنل (MePAPh) و (۴- متیل بنزو) آزو] ۱ و ۲ - بنزن دی آل (MeBACat) توسط این گروه سنتز شدند. اسیدهای پیروویک اسید، آکرلیک اسید، پروپانویک اسید، بوتانویک اسید، ۲-اکسوبوتانویک اسید و ۲-اکسواکتانویک اسید، Na_2HPO_4 و NaH_2PO_4 برای تهیه تامپون فسفات، پاراکوماریک اسید و کافئیک اسید همگی با خلوص بالا از فراورده‌های مرک، خریداری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم در مجاورت بازدارنده‌های دی تیوکارباماتی

سنجش سنتتیک و واکنش‌های کاتکولازی و کروزولازی در آزمایش‌ها مهار به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر Cary مدل Bio 100 صورت گرفت. در آزمایش‌ها از غلظت‌های تازه سوبسترا، بازدارنده و آنزیم استفاده شد. تمام واکنش‌های آنزیمی در تامپون فسفات ۱۰ میلی‌مولار در pH=۶/۸ در کووت‌های یک سی‌سی کوارتز و به کمک سامانه‌ی تنظیم حرارتی در دمای ۲۹۳ کلوین انجام شد.



شکل ۳- منحنی‌های جفت معکوس لاینووربرک برای فعالیت کاتکولاز تایروزیناز در غلظت‌های ثابت مهارکننده در هر سری سوبسترا ترسیم شده است. غلظت‌های مهارکننده عبارت‌اند از (الف) برای I صفر (■)، ۲ (□)، ۴ (▲)، ۶ (X)، ۸ (Ж) میکرومولار (ب) برای II صفر (■)، ۲ (□)، ۴ (▲)، ۶ (X)، ۱۲ (Ж) (ج) برای III صفر (■)، ۴ (□)، ۸ (▲)، ۱۲ (X)، ۱۶ (Ж) میکرومولار.

کربوکسیلیک، پیروویک اسید، آکرلیک اسید، پروپانویک اسید، ۲-اکسو - بوتانویک اسید، ۲-اکسو - اکتانویک اسید انجام شد. فعالیت کاتکولازی با سوبسترای Me BACat با غلظت مشخص ۵۰ میکرومولار و در غلظت‌های متفاوت اسیدهای مذکور مورد بررسی قرار گرفت. در واکنش‌های کروزولاز فرایند بازدارندگی آنزیم با سوبسترای Me PAPh در غلظت‌های متفاوت و نیز مجاورت اسیدهای مذکور مورد آزمایش قرار گرفت.

نتیجه‌ها و بحث

اثر بازدارندگی ترکیب‌های دی تیوکارباماتی سنتز شده به صورت نمک‌های سدیم، شامل ان - بوتیل دی تیو کاربامات (I)، ان-هگزیل دی تیو کاربامات (II) و ان-اکتیل دی یو کاربامات (III) و اسیدهای پیروویک، آکرلیک، پروپانویک، ۲-اکسوبوتانویک و ۲-اکسو اکتانویک با در نظر گرفتن دم آلفاتیک و سر قطبی یکسان آن‌ها در دو واکنش کاتکولازی و کروزولازی آنزیم تایروزیناز با منشأ قارچ خوراکی بررسی شدند.

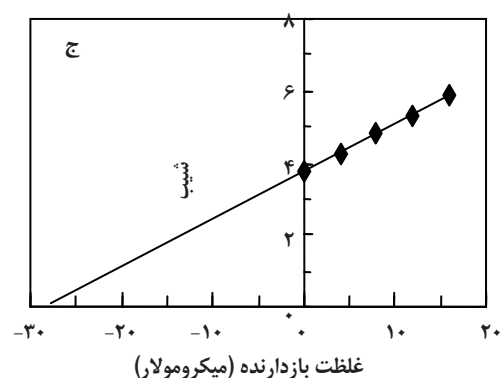
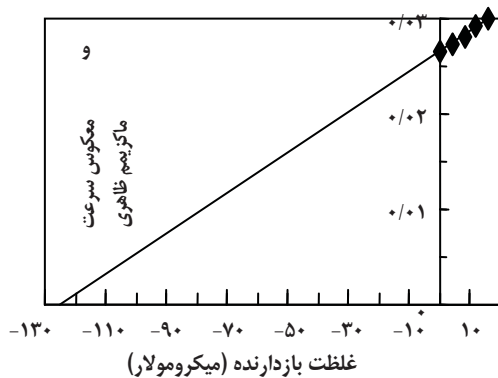
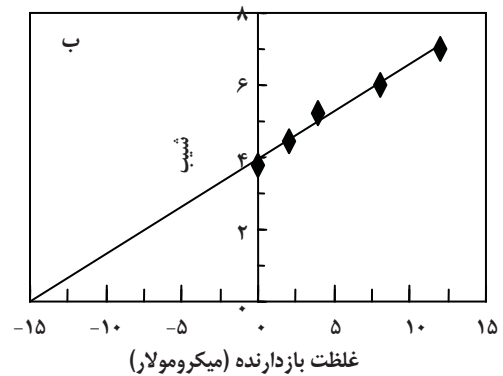
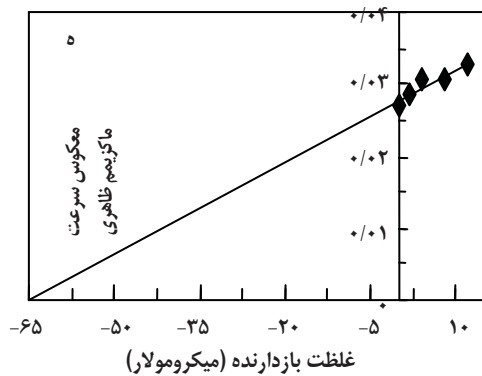
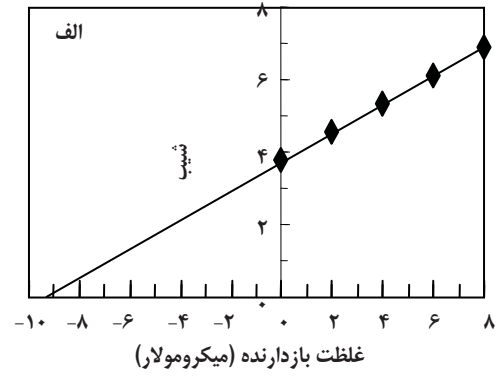
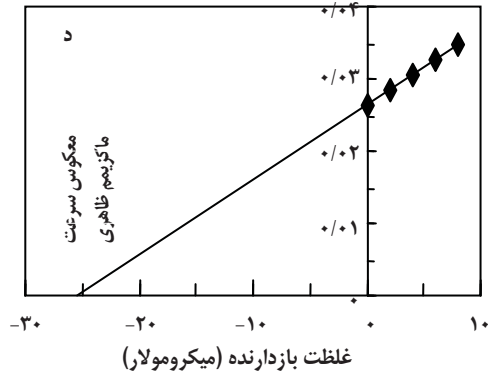
در شکل ۳ (الف، ب و ج) منحنی‌های جفت معکوس لاینووربرک برای فعالیت کاتکولاز تایروزیناز در غلظت‌های ثابت مهارکننده‌های I، II و III در هر سری سوبسترا ترسیم شده است. این منحنی‌ها خطوطی را نشان می‌دهند که در سمت چپ محور عمودی همدیگر را قطع کرده‌اند و مدل مختلط را برای مهار بیان می‌کنند.

مقدارهای سرعت بیشینه‌ی ظاهری (V'_{max})، ثابت میکائیلیس ظاهری (K'_m) و هم‌چنین شیب این خط‌ها (K'_m/V'_{max}) را می‌توان در غلظت ثابت هر کدام از مهارکننده‌ها به دست آورد. منحنی‌های ثانویه شیب را در برابر غلظت مهارکننده در شکل ۴ (الف، ب و ج) نشان می‌دهند.

طول از مبدأ این منحنی‌ها $-K_i$ را نشان می‌دهد. منحنی‌های ثانویه دیگر یعنی ($1/V'_{max}$) در برابر غلظت مهارکننده در شکل ۴ (د، ه و) ترسیم شده‌اند.

طول از مبدأ این منحنی‌ها نیز $-\alpha K_i$ را نشان می‌دهد. K_i ثابت مهارکنندگی و α فاکتور برهم کنش بین سوبسترا و مهارکننده است. مقدارهای K_i و α برای مهارکننده‌های I، II و III در جدول ۱ خلاصه شده است.

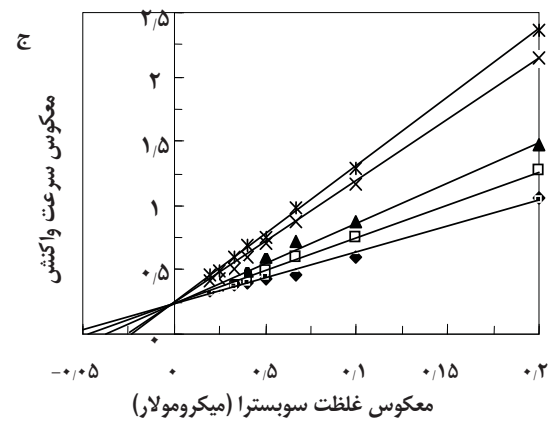
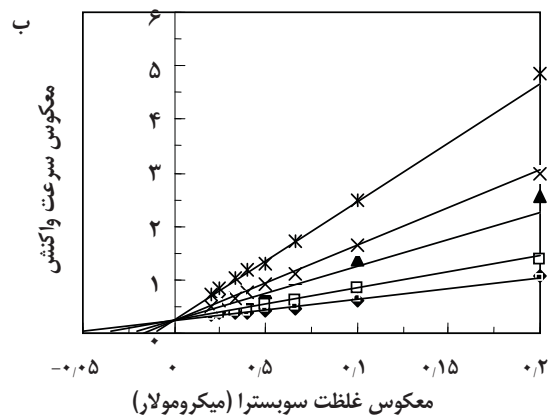
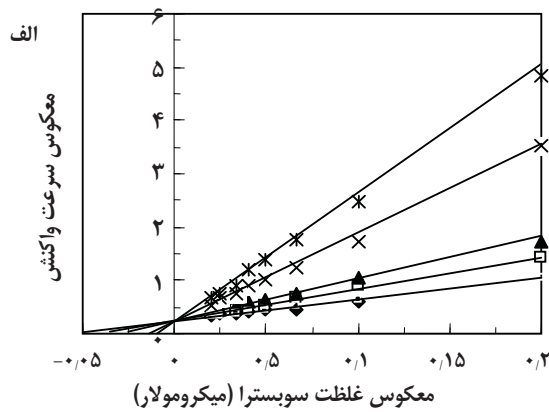
منحنی‌های جفت معکوس لاینووربرک برای فعالیت کروزولازی در مجاورت مهارکننده‌های I، II و III در شکل ۵ (الف، ب و ج)



شکل ۴- منحنی‌های ثانویه شیب نمودارهای ۲ را در برابر غلظت مهارکننده I (الف)، II (ب) و III (ج) نشان می‌دهند. طول از مبدأ این منحنی‌ها $-K_i$ را نشان می‌دهد. منحنی‌های ثانویه دیگر یعنی $(1/V'_{max})$ در برابر غلظت مهارکننده (ه، د، و) ترسیم شده‌اند. طول از مبدأ این منحنی‌ها نیز αK_i را نشان می‌دهد. K_i ثابت مهارکنندگی و α فاکتور اندرکنش بین سوبسترا و مهارکننده است.

طول از مبدأ این منحنی‌های ثانویه مقدار ثابت مهار (K_i) را برای واکنش‌های کروزولازی نشان می‌دهد. مقدارهای K_i در جدول ۱ خلاصه شده‌اند. مقایسه بین مقدارهای K_i در جدول ۱ با سایر مهارکننده‌های رایج تایروزیناز، آنها را در ردیف قوی‌ترین مهارکننده‌های فعالیت‌های کروزولازی و کاتکولازی قرار می‌دهد. اثر بازدارندگی در واکنش‌های کروزولازی بیشتر است و مقدارهای K_i با افزایش طول دم آلیفاتیک ترکیب‌ها، در هر دو فعالیت افزایش می‌یابد که نشان از کاهش اثر مهارکنندگی است.

به ترتیب، ترسیم شده‌اند. این نمودارها یک سری خط‌ها مستقیمی را نشان می‌دهند که به‌طور دقیقی روی نمودار عمودی همدیگر را قطع کرده‌اند. نمودارها نشان می‌دهند که مقدار سرعت بیشینه با تغییر غلظت مهارکننده بدون تغییر، و مقدار K'_m افزایش یافته است، و این تغییرها حاکی از مدل مهار رقابتی آنزیم هستند. شیب این نمودارها در برابر غلظت مهارکننده به صورت منحنی‌های ثانویه در شکل ۶ (الف، ب و ج) برای ترکیب‌های I، II و III به ترتیب ترسیم شده‌اند.



شکل ۵ - منحنی‌های جفت معکوس لاینووربرک برای فعالیت کروزولاز تایروزیناز در غلظت‌های ثابت مهارکننده‌های I (الف)، II (ب) و III (ج) در هر سری سوبسترا ترسیم شده است. غلظت‌های ثابت مهار مهارکننده عبارت‌اند از: (الف) برای I صفر (■)، ۰/۴ (□)، ۰/۸ (▲)، ۰/۵ (X)، ۴ (X) میکرومولار (ب) برای II صفر (■)، ۰/۵ (□)، ۱/۵ (▲)، ۲/۵ (X)، ۴/۵ (X) میکرومولار (ج) برای III صفر (■)، ۰/۵ (□)، ۱ (▲)، ۲/۵ (X)، ۳ (X) میکرومولار.

پیوند این ترکیب‌ها با مس در موضع فعال آنزیم مهار رقابتی آن‌ها در واکنش کروزولاز را نشان می‌دهد. مدل مهار مختلط در واکنش‌های کاتکولازی نشان می‌دهد که مهارکننده می‌تواند در مجاورت سوبسترا با آنزیم پیوند یابد، اما پیوند آن همراه با تعاونی منفی بین موضع‌ها است، α فاکتور اندرکنش بین سوبسترا و مهارکننده است و با توجه به مقدارهای آن در جدول ۱ که بیشتر از یک به دست آمده است ($\alpha > 1$). در کاربرد این ترکیب‌ها تعاونی منفی برای پیوند سوبسترا و مهارکننده در موضع‌شان با افزایش دم آلیفاتیک، افزایش می‌یابد. مقدارهای پایین α نشان از تمایل زیاد سوبسترا یا مهارکننده به موضع فعال آنزیم است، این ترکیب‌ها مقدارهای بالای α از خود نشان دادند و با افزودن گروه‌های $-CH_2-$ به مهارکننده‌ها از ۲/۸ برای ان - بوتیل دی تیو کاربامات به ۴/۵ برای ان - هگزیل و ۴/۶ برای ان - اکتیل دی تیو کاربامات افزایش یافت که این افزایش α کاهش تمایل مهارکننده و در مقابل تمایل بیشتر سوبسترا را به ترتیب نشان می‌دهد.

بیشتر ترکیب‌های تایولی اثر مهارکنندگی خود را با توانایی شلاته کردن Cu^{2+} اعمال می‌کنند [۳۲]. ترکیب‌های تیولی متعددی به عنوان مهارکننده تایروزیناز شناسایی شدند که از آن جمله سیستئین، گلوکاتینون، متیمازول، دی اتیل دی تیو کاربامات و ۲- مرکاپتوبینوزوتیازول را می‌توان نام برد [۳۳-۳۷]. این ترکیب‌ها مشابه ترکیب‌های دی تیو کارباماتی در مطالعه‌ی کنونی، به دلیل سمی بودن و وجود گروه گوگرد کاربرد تغذیه‌ای ندارند، ولی سولفیت در غلظت پایین به عنوان ترکیب نگهدارنده در انبارهای میوه‌هایی چون سیب و موز به کار می‌رود. در این مطالعه‌ها تلاش می‌شود تا با بررسی این ترکیب‌های شناخت مناسبی از ارتباط ساختار و عملکرد آنزیم تایروزیناز به دست آید. سایر مطالعه‌های گروه ما روی ترکیب بنزوتیول در pHهای متفاوت و ترکیب‌های گزانتات روی واکنش‌های کاتکولازی و کروزولازی آنزیم تایروزیناز انجام گرفته است [۳۹، ۳۸].

در این ترکیب‌های دی تیو کارباماتی، گروه $-NH-$ جای خود را به اکسیژن در گزانتات‌ها می‌دهد. مقایسه ترکیب‌های I، II و III با سایر مهارکننده‌های تایروزینازی حاوی گوگرد و نیز مدل مهار این ترکیب‌ها می‌تواند حاکی از شلاته کردن مس در جایگاه فعال آنزیم باشد. سر قطبی این ترکیب‌های دهنده‌ی الکترون است که روی Cu^{2+} با کوئوردینانس مناسب عمل می‌کند.

جدول ۱- مقدارهای ثابت مهار کنندگی ترکیب‌های دی تیوکارباماتی در واکنش‌های کاتکولاز و کروزولاز تایروزیناز.

نوع واکنش	کاتکولاز		کروزولاز
	ثابت بازدارندگی (میکرومولار)	ضریب اندرکنش	ثابت بازدارندگی (میکرومولار)
ان - بوتیل دی تیوکاربامات	۹٫۴	۲٫۸	۰٫۸
ان - هگزیل دی تیوکاربامات	۱۵٫۱	۴٫۵	۱
ان - اکتیل دی تیوکاربامات	۲۸٫۵	۴٫۶	۱٫۸

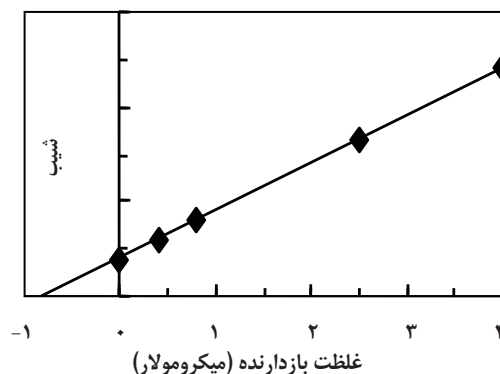
مطالعه‌ها نشان می‌دهند که سوبستراهای مونو فنل و دی فنل با الگوی متفاوتی با هسته دو مسی تایروزیناز پیوند می‌شوند. مونوفنل‌ها از راه اکسیژن با یک مس پیوند می‌شود، اما دی‌فنل‌ها با هر دو مس موضع فعال کوئوردینانس پیدا می‌کند و ساختار پل‌مانند تشکیل می‌دهند [۴۰].

پیشنهاد شده است که در هدایت مونو و دی فنل‌ها به موضع فعال تایروزیناز تفاوت فیزیکی وجود دارد و این تفاوت یک ضرورت تعیین‌کننده برای پیشرفت چرخه‌ی کاتالیتیکی است. مونوفنل‌ها به سمت CuA و دی‌فنل‌ها به سمت CuB از راه جهت‌گیری یکی از گروه‌های هیدروکسیلی خود هدایت می‌شوند [۴۱]. احتمال دارد که ترکیب‌های I، II و III به سمت CuA در موضع فعال هدایت و با کوئوردینانس مناسب از راه گوگرد و مس باعث نشان دادن یک الگوی رقابتی مهار در فرایند کروزولازی آنزیم می‌شوند. در مورد فعالیت کاتکولازی الگوی مهاری مختلط نشان از ترکیب مهارکننده با آنزیم به تنهایی (E) و کمپلکس آنزیم-سوبسترا (ES) است.

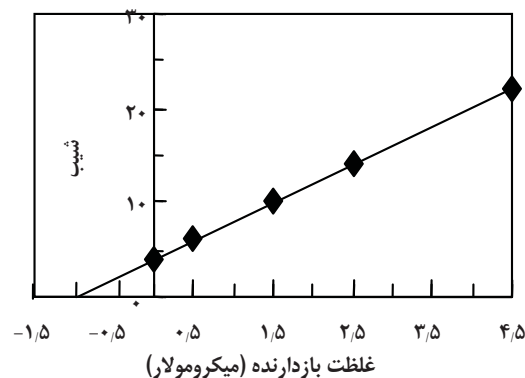
سوبسترای دی فنلی با هدایت به CuB با این ناحیه اتصال می‌یابد، در حالی که مهارکننده دارای کوئوردینانس با CuA است. از طرفی مونوفنل‌ها تنها با شکل اکسی تایروزیناز پیوند می‌یابند، در حالی که دی‌فنل‌ها با هر دو شکل اکسی و مت قابلیت پیوند دارند [۴۰]. از این رو، اگر این مهارکننده‌ها دارای یک ترجیح پیوند با شکل اکسی باشند، مدل مختلط مهار در فعالیت کاتکولاز می‌تواند منتج از استوکیومتری واکنش باشد. از نظر دیگر، دم آلیفاتیک مهار کننده‌های I، II و III می‌تواند تغییر قدرت مهار یا ثابت مهار را توجیه کند.

مطالعات بلور شناسی برای تعیین ساختار هموسیانین و در سال‌های اخیر کاتکول اکسیداز از سب‌زمینی شیرین یک مدل سه بُعدی ساختاری را برای تایروزیناز پیشنهاد می‌کند. در این مدل مس‌های موضع کاتالیتیک در مرکز چهار دسته هلیکس در یک پاکت هیدروفوب جایگیری می‌کنند که نزدیک به سطح آنزیم است [۴۱].

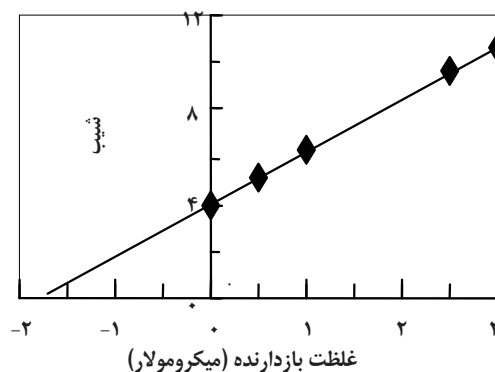
الف



ب



ج



شکل ۶ - منحنی‌های ثانویه شیب نمودارهای ۴ را در برابر غلظت مهارکننده‌های I (الف)، II (ب) و III (ج) نشان می‌دهند. طول از مبدأ این منحنی‌ها K_i - را نشان می‌دهد.

به بیشترین فعالیت نسبی افزایش می‌یابد. از طرفی میزان افزایش فعالیت نسبی برای اسیدهای مذکور به ترتیب ۲/۲، ۳/۴، ۲/۵، ۱/۴ و ۱/۶ برابر شده است. یعنی اسیدهای با تعداد کربن کمتر افزایش بیشتری را در فعالیت آنزیم القا می‌کنند.

در یک نگاه می‌توان گفت این اسیدها به عنوان یک متأثرکننده یا به عبارت بهتر یک فعال‌کننده فعالیت کاتکولازی، در غلظت‌های پایین با یک تغییر کوچک در ساختار منجر به افزایش دستیابی سوبسترا به موضع فعال آنزیم و در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم می‌شوند، و در غلظت‌های بالا نیز با برهم زدن ساختار آنزیم باعث افت فعالیت آن می‌شوند. در نگاه دوم می‌توان به اهمیت بخش کربوکسیلیک این گروه اسیدها اشاره کرد.

در اینجا فعالیت کروزولازی آنزیم در مجاورت سوبسترای منوفنلی MePAPh و بعد از آنکوباسیون آن با غلظت مناسب از هر یک از اسیدهای مذکور سنجش شد.

این اسیدها اثر مهاری در فعالیت آنزیم نشان دادند. پس از ترسیم نمودارهای جفت معکوس لاینوربرک برای شناخت دم مهارکنندگی این آنزیم‌ها نمودارهای مربوط در شکل ۸ رسم شدند. در اینجا بهترین خط‌ها قابل انطباق بر نقاط به دست آمده با روش جایگزینی رسم و با کمک این خط‌ها نمودارهای ثانویه به دست آمدند.

این نقاط با استفاده از میانگین سه عدد به دست آمده از فعالیت آنزیم ترسیم شده‌اند.

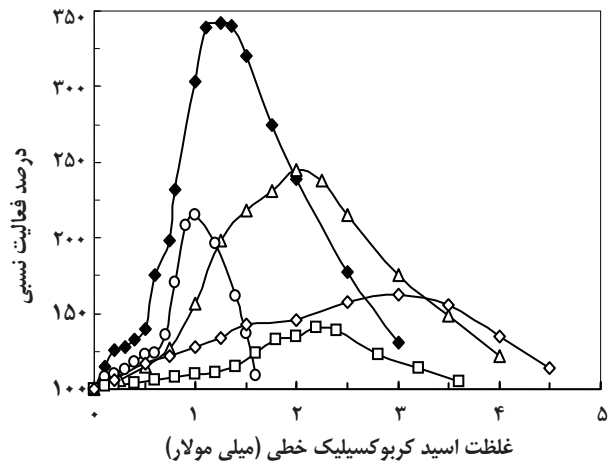
نمودارهای الحاقی مربوط به این شکل‌ها همان نمودارهای ثانویه در شکل ۹ هستند که از ترسیم شیب خط‌ها حاصل از نمودارهای اولیه در برابر غلظت مهارکننده به دست آمده‌اند.

طول از مبدأ این نقاط ثابت مهارکنندگی یا K_i این اسیدها را نشان می‌دهد. مقدارهای K_i برای اسیدهای پیروویک، آکرلیک، ۲-اکسوبوتانوویک و ۲-اکسواکتانوویک اسید به ترتیب ۰/۳۶، ۰/۷۵، ۳/۶ و ۴/۵ میلی‌مولار به دست آمد.

این ترکیب‌ها دارای الگوی مهار رقابتی بودند. اما پروپانوویک اسید الگوی مهار ضد رقابتی نشان داد.

در بررسی دلیل این مهار باید به اهمیت همان بخش کربوکسیلیک این اسیدها و نیز نحوه عملکرد موضع فعال آنزیم تایروزیناز با سوبستراهای منوفنلی و دی فنلی پرداخت.

در پیش واکنش یون‌های فلزی از جمله Cu^{2+} و Ni^{2+} با اسیدهایی مانند کافئیک اسید و کوماریک اسید به عنوان سوبستراهای دی‌فنلی و منوفنلی تایروزیناز مطالعه شدند [۴۲].

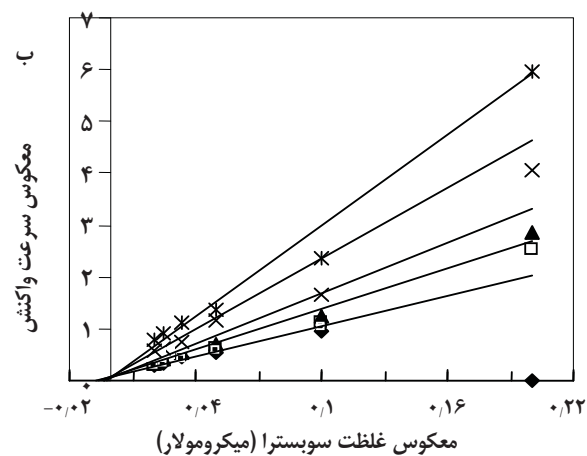
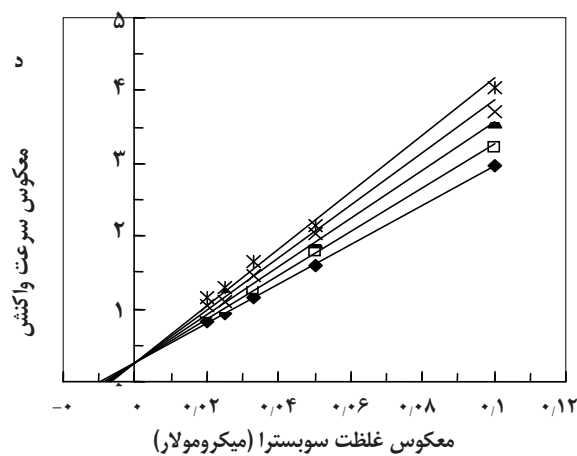
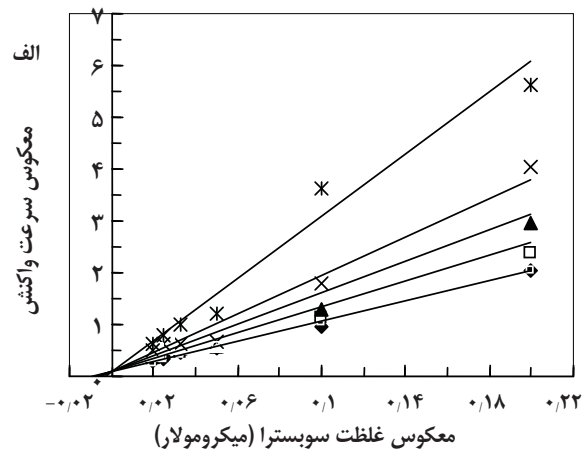
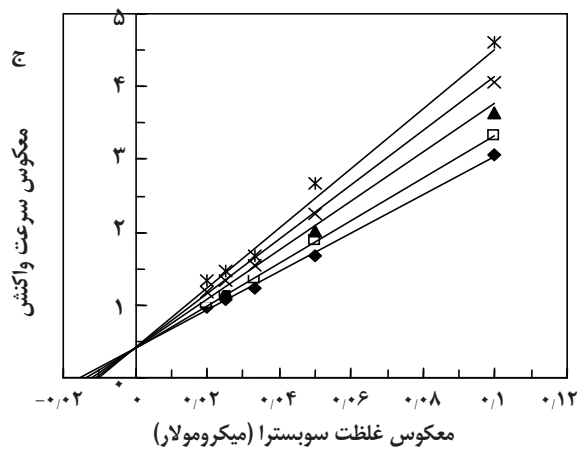


شکل ۷- تغییر فعالیت کاتکولازی تایروزیناز در یک الگوی وابسته به غلظت در مجاورت اسیدهای پیروویک (○)، آکرلیک (◆)، پروپانوویک (△)، ۲-اکسوبوتانوویک (□) و ۲-اکسواکتانوویک (◇) مقدارهای فعالیت نسبی بر اساس نسبت فعالیت در مجاورت اسید به فعالیت بدون مجاورت آن ترسیم شده است.

K_i ثابت تفکیک کمپلکس آنزیم مهارکننده است و شناخت ارتباط افزایش مقدار آن با افزایش دم مهارکننده نیاز به مطالعه‌های ساختاری بیشتر با در نظر گرفتن این پاکت هیدروفوب است.

جهت شناخت اثر بخش کربوکسیلیک اسیدها و تأکید بر اثر بخش‌های غیر اشباع آن‌ها روی فعالیت آنزیم تایروزیناز، دو فعالیت کاتکولاز و کروزولازی آنزیم به ترتیب با استفاده از سوبستراهای MePAPh و MeBACat در مجاورت غلظت‌های متفاوت پیروویک، آکرلیک، پروپانوویک، ۲-اکسوبوتانوویک و ۲-اکسواکتانوویک مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از آنکوباسیون آنزیم با غلظت‌های متفاوت هر اسید، با اضافه نمودن سوبسترای کاتکولازی MeBACat فعالیت سینتیکی آنزیم مورد سنجش قرار گرفت. نمودارهای مربوط به فعالیت کاتکولازی آنزیم در شکل ۷ نشان داده شده‌اند. چنانچه مشاهده می‌شود بسته به نوع اسید و تعداد کربن آن، با افزایش غلظت اسید تا حد مشخصی فعالیت نسبی آنزیم به ازای غلظت ثابتی از سوبسترا ابتدا روند افزایشی و سپس کاهش تدریجی را نشان داد. نقاط با بیشترین فعالیت نسبی برای اسیدهای پیروویک، آکرلیک، پروپانوویک، ۲-اکسوبوتانوویک و ۲-اکسواکتانوویک به ترتیب در غلظت‌های ۱، ۱/۲۵، ۲، ۲/۲ و ۳ میلی‌مولار به دست آمده است. این روند افزایش نشان می‌دهد که با افزایش تعداد کربن اسیدهای مذکور غلظت مورد نیاز برای رسیدن



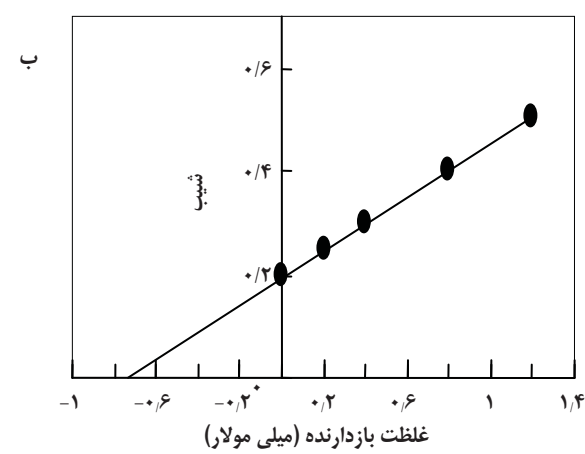
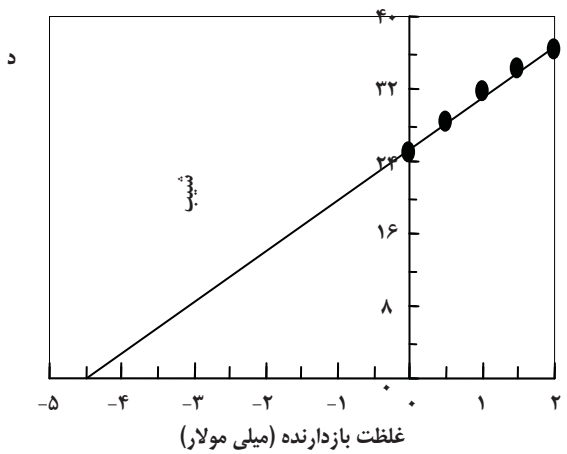
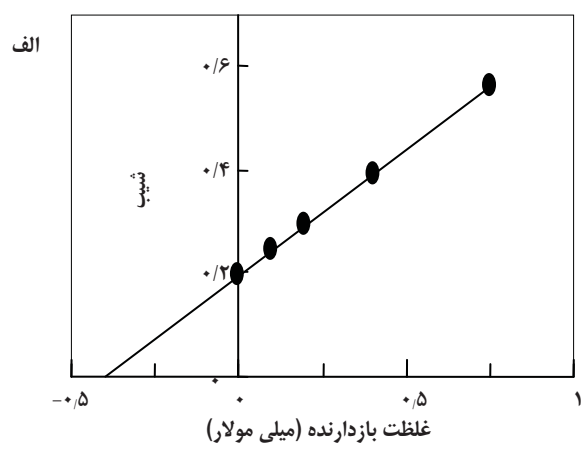
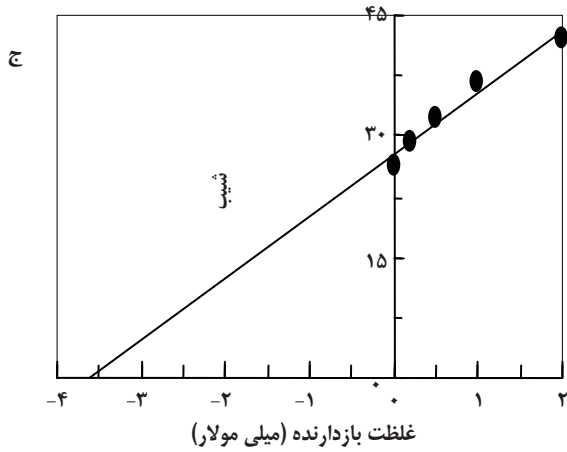
شکل ۸ - منحنی‌های جفت معکوس لاینووربرک برای فعالیت کروزولاز تاپروزیناز در غلظت‌های ثابت مهارکننده در هر سری سوبسترا ترسیم شده است. غلظت‌های ثابت مهارکننده عبارت‌اند از: (الف) صفر (■)، (ب) ۰/۱ (□)، (ج) ۰/۲ (▲)، (د) ۰/۴ (X)، (ه) ۰/۷۵ (Ж) میلی مولار برای اسید پیروویک؛ (ب) صفر (■)، (ب) ۰/۲ (□)، (ب) ۰/۴ (▲)، (ب) ۰/۸ (X)، (ب) ۱/۲ (Ж) میلی مولار برای اسید اکریلیک؛ (ج) صفر (■)، (ج) ۰/۲ (□)، (ج) ۰/۵ (▲)، (ج) ۱ (X)، (ج) ۲ (Ж) میلی مولار برای ۲-اکسوتانویک اسید؛ (د) صفر (■)، (د) ۰/۵ (□)، (د) ۱ (▲)، (د) ۱/۵ (X)، (د) ۲ (Ж) میلی مولار برای ۲-اکسوتانویک اسید.

(سری‌های بنزوویک اسید) و یا به صورت مزدوج با یک پیوند دوگانه (گروه‌های سینامیک یا سوربیک اسید) اتصال دارد، این گروه کربوکسیلیک می‌تواند با مس موجود در موضع فعال کمپلکس تشکیل دهد چنین اثری در مورد کافئیک اسید و پروتوکاتکویک اسید دیده می‌شود [۴۶-۴۴]. در اینجا باید به موقعیت کربوکسیلیک اسیدهای به کار برده شده اشاره کرد که چسبیده به کربن sp^2 می‌باشد و این ساختار به‌ویژه در نحوه جهت‌گیری و اتصال با مس موجود در موضع فعال آنزیم بسیار حائز اهمیت است. چنانچه در پیش بیان شد آنزیم تاپروزیناز دارای موضع فعال با هسته دو مسی است که ساختار این موضع فعال می‌تواند از شکل‌های اکسی (oxy)، دی‌اکسی (dioxy) و مت (met) پیروی کند [۴۷]. سوبسترهای مونوفنلی و دی فنلی با الگوی متفاوتی به موضع فعال آنزیم اتصال می‌یابند.

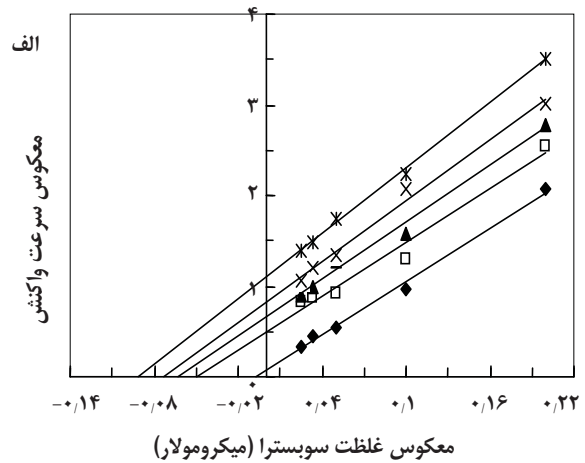
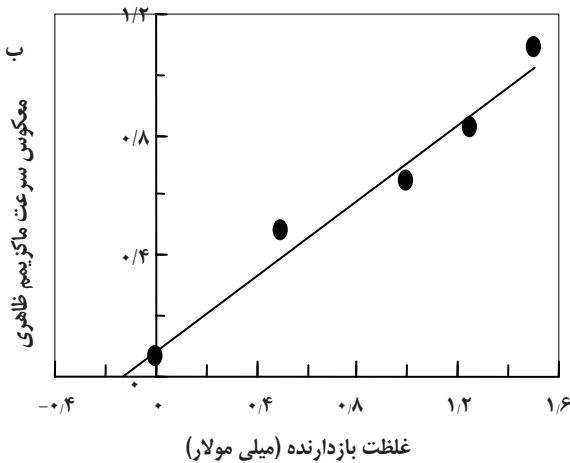
آن‌ها متوسط انتهای فنلی یا کربوکسیلی خود با موضع فعال آنزیم واکنش می‌دهند.

از طرفی در بررسی ما اسپارتیک اسید به عنوان یک اسمولیت در غلظت بالا اثر مهاری از خود نشان می‌دهد. مهم‌ترین مشخصه قابل اشاره در این ترکیب نیز بخش کربوکسیلی آن بود.

نقطه مشترک همه مطالعه‌ها در مورد تأثیر اسیدهای کربوکسیلیک آروماتیک روی آنزیم تاپروزیناز، بر اثر مهاری آن‌ها تأکید دارد. در سری‌های بنزوویک اسید، استریفیه کردن گروه کربوکسیل به‌طور وسیعی خاصیت مهاری را کاهش می‌دهد، اما آن را به طور کامل بلوکه نمی‌کند و تمایل مولکول برای آنزیم هنوز وجود دارد [۴۳]. وقتی یک گروه کربوکسیلیک به‌طور مستقیم به یک حلقه بنزی



شکل ۹- منحنی ثانویه شیب نمودارهای بالا را در برابر غلظت مهارکننده با طول از مبدأ $-K_i$ را برای مهارکننده‌های: اسید پیروئیک (الف)؛ اسید اکریلیک (ب)؛ ۲- اکسوبوتانویک اسید (ج) و ۲- اکسواتانویک اسید (د) نشان می‌دهد.



شکل ۱۰- منحنی‌های جفت معکوس لاینووربرک برای فعالیت کروزولاز تایروزیناز در غلظت‌های ثابت اسید پروپانویک به‌عنوان مهارکننده در هر سری سوبسترا رسم شده است (الف)؛ منحنی ثانویه شیب نمودارهای بالا را در برابر غلظت مهارکننده با طول از مبدأ $-K_i$ نشان می‌دهد (ب)؛ غلظت‌های ثابت مهارکننده عبارت‌اند از: صفر (■)، ۰/۱ (□)، ۰/۲ (▲)، ۰/۴ (X)، ۰/۷۵ (XK) میلی مولار.

جدول ۲- نوع عملکرد اسیدها بر روی دو واکنش کاتکولاز و کرزولاز آنزیم

کرزولاز		کاتکولاز		نوع فعالیت نوع اسید
نوع بازدارندگی	ثابت بازدارندگی (میلی مولار)	غلظت اپتیمم (مولار)	ماکسیمم فعالیت نسبی (درصد)	
رقابتی	۰٫۳۶	۱	۲۱۵	پیروئیک اسید
رقابتی	۰٫۷۵	۱٫۲۵	۳۴۲	آکریلیک اسید
ضد رقابتی	۰٫۱۴	۲	۲۴۵	پروپانویک اسید
رقابتی	۳٫۶	۲٫۲	۱۴۰	۲-اکسو بوتانویک اسید
رقابتی	۴٫۵	۳٫۲	۱۶۳	۲-اکسو اکتانویک اسید

در پروپانویک اسید نشان می‌دهد که این ترکیب پس از پیوستن سوبسترا به آنزیم قابلیت پیوند را دارد.

این به معنی احتمال تغییر در ساختار آنزیم و در دسترس قرار گرفتن مکانی جهت پیوند بازدارنده است. از آنجا که هم سوبستراهای مونوفنلی و احتمالاً هم اسیدهای مذکور، تمایل به پیوند با CuA را دارند، برای رسیدن به موضع مذکور با هم رقابت می‌کنند. در همه این اسیدها ثابت بازدارندگی (K_i) با طول شدن دم آلیفاتیک روند افزایشی نشان می‌دهد. احتمالاً سوبستراهای مونوفنلی و دی فنلی در دست یابی به موضع فعال آنزیم متفاوت عمل می‌کنند، و این تفاوت با در نظر گرفتن سر قطبی بازدارنده عامل اصلی تعیین کننده نوع بازدارندگی است. این ثابت مهار در واقع عکس ثابت تمایل مهارکننده به آنزیم (K_a) است، یعنی این کاهش تمایل اسیدها به آنزیم با افزایش دم کربنی و یا هیدروفوبیسیته آنهاست. برای آنزیمی مانند تایروزیناز که به عنوان کاتالیز کننده سوبستراهای متعددی عمل می‌کند، برهم کنش خود سوبسترا با پاکت هیدروفوب اطراف موضع فعال اساساً دستیابی آنها را جهت ایجاد کوئوردینانس مناسب با مس موجود در این موضع تحت تأثیر قرار می‌دهند.

اگر چه نحوه هدایت سوبستراهای فنلی با اندازه‌ی متفاوت به سمت موضع فعال نباید خیلی متفاوت باشد ولی روشی که باقیمانده‌های این سوبستراها در پاکت هیدروفوب موضع فعال مدفون می‌شوند، به نحو قابل توجهی می‌تواند متفاوت باشد.

بنابراین، تغییرهای کلی در ساختار سه بُعدی (صورت بندی) آنزیم ناشی از برهم کنش سر و اسکلت سوبستراها با پاکت هیدروفوب آنزیم هستند. به روش مشابهی این تفسیر را می‌توان برای مهارکننده‌های آنزیم به کاربرد، به ویژه آن‌هایی که ساختار مشابه سوبسترا دارند. بر همین اساس افزایش ثابت بازدارندگی (K_i) این اسیدهای

مونوفنل‌ها از راه اکسیژن فنلی خود با یک مس اتصال می‌یابند، در صورتی که دی فنل از راه هر دو اکسیژن فنلی با موضع فعال کوئوردینانس تشکیل می‌دهند و یک ساختار پل مانند می‌سازند [۴۰]. چنین پیشنهاد شده که یک تفاوت فیزیکی در مورد هدایت گروه‌های هیدروکسیلی به موضع فعال تایروزیناز وجود دارد [۴۸]. مونوفنل‌ها تنها با اکسی تایروزیناز پیوند می‌یابند و دی فنل‌ها هم با شکل مت و هم اکسی ترکیب می‌شوند [۴۰]. در مورد دی فنل‌ها در واکنش کاتکولاز با توجه به ساختار خود و نحوه هدایت ابتدا با CuB اتصال می‌یابد، در حالی که هدایت مونوفنل‌ها در واکنش کرزولاز به سمت CuA می‌باشد [۴۰]. اطلاعات بلور شناسی هموسیانین‌ها و در سال‌های اخیر کاتکول اکسیداز سبب‌زمینی شیرین نشان می‌دهند که در مدل ساختار سه بُعدی خانواده تایروزیناز، موضع کاتالیتیک حاوی مس در یک مرکز حاوی چهار دسته هلیکس در یک پاکت هیدروفوب نزدیک سطح قرار می‌گیرد [۴۱]. در هر حال این موضع فعال طوری واقع است که ترکیب‌های مونوفنلی به وسیله‌ی مناسبی به سمت CuA در انتهای این پاکت هدایت می‌شوند. از طرفی طبق مطالعه‌های اشاره شده نگاه دوم به اسیدهای به کار برده شده به کوئوردینانس بخش هیدروکسیلیک آنها با مس موجود در موضع فعال است. هدایت این اسیدهای خطی با داشتن بخش هیدروکسیلیک متصل به یک کربن sp^2 احتمالاً به سمت CuA است. شواهدی که نشان از اختصاصی بودن سوبستراها و مهارکننده‌های تایروزیناز است، با جایگزینی‌های متفاوت پلی فنل‌ها و اسیدهای کربوکسیلیک آروماتیک به دست آمده است [۴۹ و ۵۰]. اسیدهای دی کربوکسیلیک آلیفاتیک با تعداد کربن ۸ تا ۱۳ به‌عنوان مهارکننده‌های پلی فنل اکسیداز گزارش شده‌اند [۵۱]. مد مهار رقابتی این اسیدها در فعالیت کرزولازی آنزیم رقابت آنها با سوبسترای مونوفنلی در دسترسی به موضع فعال آنزیم را نشان می‌دهد و وجود الگوی ضد رقابتی

دم غیرقطبی با دسته‌های هلیکس تشکیل‌دهنده پاکت هیدروفوب اطراف این موضع فعال آنزیم و در نتیجه تغییر ثابت مهار با تغییر طول دم ترکیب‌ها، نیاز به مطالعه بیشتر از جمله استفاده از فن طیف سنجی جذب پرتو ایکس (EXAFS) است.

Abbreviations: Mushroom Tyrosinase (MT);
Inhibition constants (K_i); Agaricus bisporus (A. bisporus);
4-[4-methylphenyl azo]-phenol (MePAPh);
4-[4-methylbenzo azo]-1,2-benzenediol (MeBACat);
Phosphate buffer solution (PBS);
Enzyme-substrate (ES): Enzyme (E);
3,4-Dihydroxyphenylalanine (DOPA);
Extended X-ray Absorption Fine Structure (EXAFS);
Copper A (CuA); Copper B (CuB)

تاریخ دریافت: ۱۶/۱۱/۱۰ ، تاریخ پذیرش: ۲۰/۸/۸۷

خطی در جدول ۲ به معنای کاهش تمایل آن‌ها به موضع فعال است و این اثر به ویژه زمانی اهمیت پیدا می‌کند که آن‌ها به عنوان متأثر کننده فعالیت آنزیم در کنار سوبسترا در نظر گرفته شوند و اثرشان در این شرایط مهاری است.

نتیجه گیری

مقایسه قدرت بازدارندگی مقدارهای ثابت بازدارندگی (K_i) ترکیب‌های دی تیوکارباماتی و اسیدهای به کار رفته نشان می‌دهد که در هر دوی این سری ترکیب‌ها با افزایش طول دم غیر قطبی ثابت مهار افزایش و در نتیجه تمایل بازدارنده به آنزیم کم می‌شود. نقطه مشترک دیگر در این مطالعه نوع مهار رقابتی این ترکیب‌ها در بیشتر واکنش‌ها بود که نشان از درگیر شدن سر قطبی این ترکیب‌ها با مس موجود در موضع فعال آنزیم می‌باشد. تغییرهای ساختاری آنزیم و به ویژه دست‌یابی سر قطبی ترکیب‌ها با مس موجود در موضع فعال و نیز احتمال درگیری

مراجع

- [1] Bourquelot, E. and Bertrand, A.A., Re-Examination of the Raper's Scheme: Cyclodopa as a Biological Precursor of Eumelanin, *C.R. Soc. Biol.*, **47**, p. 582 (1895).
- [2] Vanneste, W.H. and Zuberbuhler, A., Copper Containing Oxygenases. In "Molecular Mechanism of Oxygen Activation", Nayaishi, O., ed.; Academic Press: New York, pp. 371-404 (1974).
- [3] Lerch, K., Copper Monooxygenases: Tyrosinase and Dopamine α -Monooxygenase. In "Metal Ions in Biological Systems", Sigel, H., Ed.; Dekker: New York, pp. 143-186 (1981).
- [4] Mayer, A.M., Polyphenol Oxidases in Plants: Recent Progress, *Phytochemistry*, **26**, p. 11 (1987).
- [5] Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. and Eskin, N.A.M., Polyphen-Oloxidase. In "Oxidative Enzymes in Foods", Robinson, D.S., Eskin, N.A.M., ed., Elsevier Science: London, U.K., pp. 217-273 (1991).
- [6] Pawelek, J.M. and Korner, A., The Biosynthesis of Mammalian Melanin, *Am. Sci.*, **70**, p. 136 (1982).
- [7] Mayer, A.M. and Harel, E., Polyphenoloxidases in Plants, *Phytochemistry*, **18**, p. 193 (1979).
- [8] Korner, A. and Pawelek, J., Mammalian Tyrosinase Catalyzes Three Reactions in the Biosynthesis of Melanin, *Science*, **217**, p. 1163 (1982).
- [9] Schoot-Uiterkamp, A.J.M. and Mason, H.S., Magnetic Dipole-Dipole Coupled Cu(II) Pairs in Nitric Oxide-Treated Tyrosinase: A Structural Relationship Between the Active Sites of Tyrosinase and Hemocyanin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, p. 993 (1973).
- [10] Nishioka, K., Particulate Tyrosinase of Human Malignant Mela-Noma Solubilization Purification Following Trypsin Treatment and Characterization, *Eur. J. Biochem.*, **85**, p. 137 (1978).
- [11] Sanchez-Ferrer, A., Villalba, J. and Garcia-Carmona, F., Triton X-114 as a Tool for Purifying Spinach Polyphenol Oxidase, *Phytochemistry*, **28**, p. 1321 (1989).

- [12] Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. and Garcia-Carmona, F., Partial Purification of a Thylakoid-Bound Enzyme Using Temperature-Induced Phase Partitioning, *Anal. Biochem.*, **184**, p. 279 (1990).
- [13] van Gelder, C.W., Flurkey, W.H., Wichers, H.J., Sequence and Structural Features of Plant and Fungal Tyrosinases, *Phytochemistry*, **45**, p. 1309 (1997).
- [14] Bouchilloux, S., McMahon, P. and Mason, H.S., The Multiple Forms of Mushroom Tyrosinase, *J. Biol. Chem.*, **238**, p. 1690 (1963).
- [15] Jolley, R.L., Robb D.A. and Mason, H.S., The Multiple Forms of Mushroom Tyrosinase. Association-Dissociation phenomena., *J. Biol. Chem.*, **244**, p. 1593 (1969).
- [16] Taylor, S.L. and Bush, R.K., Sulfites as Food Ingredients, *Food Technol.*, **40**, p. 47 (1986).
- [17] Ohyama, Y. and Mishima, Y., Melanogenesis Inhibitory Effects of Kojic Acid and Its Action Mechanism, *Fragrance J.*, **6**, p. 53 (1990).
- [18] Palumbo, A., d'Ischia, M., Misuraca, G. and Prota, G., Mechanism of Inhibition of Melanogenesis by Hydroquinone, *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, p. 85 (1991).
- [19] Maeda, K. and Fukuda, M., In Vitro Effectiveness of Several Whitening Cosmetic Components in Human Melanocytes, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, p. 361 (1991).
- [20] Kubo, I. and Yokokawa, Y., Two Tyrosinase Inhibiting Flavonol Glycosides from Buddleia Coriacea, *Phytochemistry*, **31**, p. 1075 (1992).
- [21] Kubo, I., Yokokawa, Y. and Kinst-Hori, I., Tyrosinase Inhibitors from Bolivian Medicinal Plants, *J. Nat. Prod.*, **58**, p. 739 (1995).
- [22] Kubo, I. and Kinst-Hori, I., Flavonols from Saffron Flower: Tyrosinase Inhibitory Activity and Inhibition Mechanism, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, p. 4121 (1999).
- [23] Kubo, I., Kinst-Hori, I., Ishiguro, K., Chaudhuri, S.K., Sanchez, Y. and Ogura, T., Tyrosinase Inhibitory Flavonoids from Heterothecainuloides and Their Structural Functions, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, p. 1443 (1994).
- [24] Chen, Q.X. and Kubo, I., Kinetics of Mushroom Tyrosinase Inhibition by Quercetin, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, p. 4108 (2002).
- [25] Ha, T.J., Yang, M.S., Jang, D.S., Choi, S.U. and Park, K.H., Inhibitory Activities of Flavanone Derivatives Isolated from Sophora Flavescens for Melanogenesis, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **22**, p. 97 (2001).
- [26] Kubo, I., Kinst-Hori, I., Chaudhuri, S.K., Kubo, Y., Sanchez, Y. and Ogura, T., Flavonols from Heterotheca inuloides: Tyrosinase Inhibitory Activity and Structural Criteria, *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, p. 1749 (2000).
- [27] Badria, F.A. and Gayyar, M.A., A New Type of Tyrosinase Inhibitors from Natural Products as Potential Treatments for Hyperpigmentation, *Boll. Chim. Farma.*, **140**, p. 267 (2001).
- [28] No, J.K., Soung, D.Y., Kim, Y.J., Shim, K.H., Jun, Y.S., Rhee, S.H., Yokozawa, T. and Chung, H.Y., Inhibition of Tyrosinase by Green Tea Components, *Life Sci.*, **65**, p. 241 (1999).
- [29] Kim, J.H., Sapers, G.M. and Choi, S.W., Identification of Tyrosinase Inhibitor from Galla Rhois, *Food Sci. Biotechnol.*, **7**, p. 56 (1998).

- [30] Menon, S., Fleck, R.W., Yong, G. and Strothkamp, K.G., Benzoic Acid Inhibition of R, α and ϵ Isozymes of Agaricus Bisporus Tyrosinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **280**, p. 27 (1990).
- [31] Kermasha, S., Goetghebeur, M., Monfette, A., Metchet, M. and Rovelt, M., Inhibitory Effects of Cysteine and Aromatic Acids on Tyrosinase Activity, *Phytochemistry*, **34**, p. 349 (1993).
- [32] Hanlon, D.P. and Shuman, S., Copper Ion Binding and Enzyme Inhibitory Properties of the Antithyroid Drug Methimazole, *Experientia*, **31**, p. 1005 (1975).
- [33] Pierpoint, W.S., The Enzymic Oxidation of Chlorogenic Acid and Some Reactions of the Quinine Produced, *Biochem. J.*, **98**, p. 567 (1966).
- [34] Seiji, M., Yashida, T., Itakura, H. and Irimajiri, T., Inhibition of Melanin Formation By Sulfhydryl Compounds, *J. Investig. Dermatol.*, **52**, p. 280 (1969).
- [35] Hanlon, D.P. and Shuman, S., Copper Ion Binding and Enzyme Inhibitory Properties of the Antithyroid Drug Methimazole, *Experientia*, **31**, p. 1005 (1975).
- [36] Anderson, J.W., Extraction of Enzyme and Sub Cellular Organelles from Plant Tissues, *Phytochemistry*, **7**, p. 1973 (1968).
- [37] Palmer, J.K. and Robbert, J.B., Inhibition of Banana Polyphenol Oxidase by 2-Mercapto-benzothiazole, *Science*, **157**, p. 200 (1967).
- [38] Saboury, A.A., Zolghadri, S., Haghbeen, K. and Moosavi-movahedi, A.A., The Inhibitory Effect of Benzenethiol on the Cresolase and Catecholase Activities of Mushroom Tyrosinase, *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, **21**, p. 711 (2006).
- [39] Alijanzadeh, M., Saboury, A.A., Mansuri-Torshizi, H., Haghbeen, K. and Moosavi-Movahedi, A.A., The Inhibitory Effect of Some New Synthesized Xanthates on Mushroom Tyrosinase Activities, *J. Enz. Inh. Med. Chem.*, **22**, p. 239 (2007).
- [40] Wilcox, D.E., Porras, A.G., Hawang, Y.T., Lerch, K., Winker, M.E. and Solomon, E.I., Substrate Analogue Binding to Coupled Binuclear Copper Active Site in Tyrosinase, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, p. 4015 (1985).
- [41] Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C. and Krebs, B., Crystal Structure of a Plant Catechol Oxidase Containing a Dicopper Center, *Nat. Struct. Biol.*, **5**, p. 1084.
- [42] Gheibi, N., Saboury, A.A. and Haghbeen, K., Substrate Construes the Copper and Nickel Ions Impacts on the Mushroom Tyrosinase Activities, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **27**, p. 642 (2006).
- [43] Colaco, C., Sen, S., Tangavelu, M., Pinder, S., and Roser, B., Extraordinary Stability of Enzymes Dried in Trehalose: Simplified Molecular Biology, *Biotechnology*, **10**, p. 1007 (1992).
- [44] Pifferi, P.G., Baldassari, L. and Cultera, R., Inhibition by Carboxylic Acids of an O-Diphenol Oxidase from Prunus Avium fruits, *J. Sci. Food Agric.*, **25**, p. 263 (1974).
- [45] Janovitz-Klapp, A., Richard, F., Goupy, P. and Nicolas, J., Inhibition Studies on Apple Polyphenol Oxidase., *J. Agric. Food Chem.*, **38**, p. 926 (1990).
- [46] Janovitz-Klapp, A., Richard, F. and Nicolas, J. J., Polyphenol Oxidase from Apple Partial Purification and sSme Properties, *Phytochemistry*, **28**, p. 2903 (1989).

- [47] Fenoll, L.G., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Sevilla, F., Garcia-Ruis, P.A., Varon, A., Garcia-Canovas, F. and Tudela, J., Analysis and Interpretation of the Action Mechanism of Mushroom Tyrosinase on Monophenols and Diphenols Generating Highly Unstable O-Quinone, *Biochim. Biophys. Acta*, **1545**, p. 1 (2001).
- [48] Olivares, C., Garcia-Boron, J.C. and Solano, F., Identification of Active Site Residues Involved in Metal Cofactor Binding and Stereospecific Substrate Recognition in Mammalian Tyrosinase: Implication to the Catalytic Cycle, *Biochemistry*, **41**, p. 679 (2002).
- [49] Meon, S., Fleck, R.W., Yong, G. and Strothkamp, K.G., Benzoic Acid Inhibition of the α , β and γ Isosymes of Agaricus Bisporus Tyrosinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **280**, p. 27 (1990).
- [50] Kermasha, S., Goetghebeur, M., Monfette, A., Metchet, M. and Rovelt, M., Inhibitory Effects of Cysteine and Aromatic Acid on Tyrosinase Activity, *Phytochemistry*, **34**, p. 349 (1993).
- [51] Protá, G., "Melanins and Melanogenesis", Academic Press, San Diego (1992).