پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست شناسی – بیوشیمی

دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه مرکز تهران

گروه علمی زیست شناسی

عنوان پایان نامه:

بررسی اثر مهارکنندگی برخی از مشتقات فنلی سنتزی روی تیروزیناز قارچی

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر رضا حسن ساجدی

استاد مشاور:

جناب آقای پروفسور نصرت اله محمودی و جناب آقای دکتر رضا حاجی حسینی

نگارش: معصومه باقری کالمرزی

ماه و سال

بهمن ۸۸

سپاس بی قیاس بر آستان با عظمت معبودی مفروض است که جلال خداوندی را به ذات لایزال و به صفات با کمال خود سزاست و ایزد احد و واحدی که در ذات صفات بی همتاست و صمدی که قدرت بی کران و بی چونش جهان بی انتها را به فرمان خویش در آورده و از طریق جود و کرم ما خاکیان ضعیف را خلف فرموده است.

آنچه اینک لحاظ می گردد در واقع پاسخ گوی ذرّه ای از موهبت های الهی و کوششهای مدرسین محترم اعم از گذشته و حال می باشد، بالاخص استاد راهنمای محترمم جناب آقای دکتر رضا حسن ساجدی که زحمت بسیار زیادی را متحمل شدند و جناب آقای پروفوسور نصرت له محمودی و جناب آقای دکتر رضا حاجی حسینی اساتید مشاور گرامیم که به گونه ای مؤثر در این پژوهش نقش ایفا نموده اند کمال تشکر را دارم.

بدین وسیله از همه عزیزانی که مرا در این راه یاری نمودند قدر دانی می کنم، از جناب آقای دکتر لامع راد و جناب آقای دکتر عطایی که قبول زحمت فرمودند و داوری پایان نامه اینجانب را پذیرفتند سپاسگزارم.

همچنین از خانواده عزیزم بخصوص پدر و مادر مهربانم که همیشه پشتیبانم بودند بسیار متشکرم.

از اساتید محترم ورزشی ام جناب آقای محمد رضا پدیدار و سرکارخانم زیبا دودانگه که همیشه و همه جا یار و یاورم بودند بسیار سپاسگزارم.

از سرکار خانم اسدالهی که زحمت سنتز و تهیه مواد مورد استفاده در این پژوهش را قبول کردند بسیار متشکرم.

از راهنماییهای جناب آقای مهندس علی شیاری در نوشتن این پایان نامه بسیار متشکرم.

از دوست خوبم خانم فاطمه شعبانی که در این راه خیلی کمکم کردند بسیار متشکرم و همچنین از خانم لیلا گلعلی زاده، بیتا مصدق و دیگر دوستان خوبم در دانشگاه علوم پایه سپاسگزارم.

فهرست مطالب

عنوان

فصل اول : مقدمه ۱
۱-۱-مقدمه ۲
۱-۲-خصوصیات بیوشیمیایی تیروزیناز ۲
۱-۳-واکنشهای تیروزیناز ٤
۱-۳-۱-منوفنل اکسیداز، منوفنولاز یا کرسولاز ٤
۱-۳-۲-دی فنل اکسیداز، دی فنولاز یا کتکولاز ٥
۱-۳-۳-پلی فنل اکسیداز ٦
۱-۳-٤-لاکاز ۷
۱-۳-٥-مکانیسم فعالیت منوفنولازی و دی فنولی ۸
۱-۳-٥-۱- فعالیت منوفنولازی ۸
۱-۳-٥-۲- فعالیت دی فنولازی ۸
۱-٤- مسیر بیوسنتز ملانین در پستانداران ۸
۱-٥- قهوه ای شدن آنزیمی مواد غذایی گیاهی ۱۰
۱-٦-اثرات مفید آنزیم پلی فنل اکسیداز ۱۰
۱-۷- نقش فیزیولوژیکی تولید رنگدانه ۱۰
۱-۷-۱- نقش آنزیم در گیاهان ۱۰
۱-۷-۲- نقش تیروزیناز در جانوران ۱۱
۱-۸- ساختار جایگاه فعال ۱۲
۱-۹- مقایسه خصوصیات تیروزینازهای قارچی و گیاهی ۱۲
۱-۱۰- مهار کننده های تیروزیناز ۱٤
۱-۱۰-۱- کنترل سوبسترا ۱٤
۱-۱۰-۲- کنترل تشکیل کوئینون ۱٤
۱-۱۰-۳- عوامل احیا کننده بعنوان آنتی اکسیدانت ۱٥
۱-۱۰-٤- اسیدی کننده ها ۱٥
۱-۱۰-٥- کنترل آنزیمی ۱٦
۱-۱۱- آنالوگهای سوبسترا ۲۰

۱-۱۲- آمین های آروماتیک، O- دی آمین ها و O-آمینوفنول ها ۲۲
۱-۱۳- خانواده سالیسیلیک اسید ۲۳
۱-۱٤- ٥، ٦و۷- تری هیدروکسی فلاون ها ۲٥
۱-۱٥-کوپفرون ۲۷
۱-۱٦- مجموعه های جدید bipiperidine ۲۸
۱-۱۷- کانجوگیت های کوجیک اسید-آمینواسید به عنوان مهارکننده های تیروزیناز ۲۹
۱-۱۸- روش RNA آنتی سنس ۳۳
۱-۱۹- اهمیت و کاربرد بازدارنده های تیروزیناز ۳٤
۱-۱۹-۱- کاربرد در زمینه کشاورزی و صنایع غذایی ۳٤
۱-۱۹-۲- کاربرد در زمینه مواد آرایشی و پزشکی ۳٤
۱-۲۰- هدف از این تحقیق ۳٥
فصل دوم: مواد و روشها ۳۷
۲-۱- دستگاه های مورد استفاده ۳۸
۲-۲- مواد شیمیایی ۳۸
۲-۳- محلولهای مورد نیاز برای سنجش آنزیم ۳۸
۲-٤- محلول سوبسترا ۳۸
۲-٥- ترکیبات مورد استفاده در این تحقیق بعنوان مهار کننده ۳۹
۲-٦- سنجش آنزیمی ۳۹
۲-۷- اثر مهارکننده ها روی فعالیت آنزیم ۳۹
۲-۸- تعیین IC_{50} ٤۰
۲-۹- آنالیز سینتیکی (تعیین K_m و V_{max}) ٤۰
۲-۱۰- تعیین غلظت پروتئین (روش برادفورد) ٤۰
فصل سوم: نتایج ٤۲
۳-۱- منحنی درصد فعالیت آنزیمی ٤٥
۳-۱-۱- وانیلین ٤٥
۳-۱-۲- بیس-وانیلین ٤٦
۳-۱-۳- وانیلیل الکل ٤۷
۳-۱-٤- وانیلیک اسید ٤۸
۳-۱-٥- ۲-نیتروآنیلین ٤۹

۳-۱-٦- ۳-نیتروآنیلین ٥٠
۳-۱-۷- ٤-نیتروآنیلین ٥١
۳-۱-۸- ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات ٥۲
۳-۱-۹- ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات ٥۳
۳-۱-۱۰- ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات ٥٤
۳-۲- منحنی Dose-response جهت بدست آوردن IC_{50} ٥٦
۳-۲-۱- مشتقات وانیلین ٥٦
۳-۲-۲- مشتقات نیتروآنیلین ٥٨
۳-۲-۳- مشتقات نیتروآنیلین در ترکیب با وانیلین ٥٩
۳-۳- پارامترهای سنتیکی K_m و V_{max} ٦۳
۳-٤- منحنی های دیکسون ٦٩
فصل چهارم: بحث ۷٥
ارائه پیشنهادات ۸۳
منابع ۸٤

فهرست شکل ها

عنوان

شکل (۱-۱) : مکانیسم فعالیت منوفنولازی و دی فنولازی تیروزیناز ۳
شکل (۱-۲) : واکنش تبدیل منوفنل به دی فنل ٤
شکل (۱-۳) : واکنش اکسید شدن آمین آروماتیک ٥
شکل (۱-٤) : واکنش اکسیداسیون دی فنل ها به کوئینون ٥
شکل (۱-٥) : تشکیل ملانین بوسیله تیروزیناز ٦
شکل (۱-٦) : تفاوت عملکرد کتکولاز و لاکاز ۷
شکل (۱-۷) : نقش تیروزیناز در ملانوژنز ۹
شکل (۱-۸) : ساختار جایگاه فعال آنزیم تیروزیناز ۱۲
شکل (۱-۹) : تطبیق توالی های آمینواسیدی جایگاه های CuA و CuB تیروزینازهای مختلف ۲۰
شکل(۱-۱۲): ساختار شیمیای ترکیباتی به عنوان سوبسترا و آنالوگهای سوبسترای تیروزیناز ۲۱
شکل(۱-۱۳): ساختار آمین های آروماتیک، *O*- دی آمین ها و *O*- آمینو فنول ها ۲۳
شکل (۱-۱٤) : ساختار شیمیایی ترکیبات خانواده سالیسیلیک اسید ۲٤
شکل (۱-۱٥) : ساختار شیمیایی بایکالین (۱) و هیدروکسی فلاون ها (۲-۱٤) ۲٦
شکل (۱-۱٦) : ساختار bipiperidine های جدید که اثر مهاری روی تیروزیناز دارند ۲۸
شکل (۱-۱۷) : فعالیت مهاری KA و KA-F -NH_2 روی تیروزیناز قارچی ۳۰
شکل (۱-۱۸) : نمودارهای لاین ویور-برک تیروزیناز قارچی با استفاده از در حضور (A) و (B) ۳۰
شکل (۱-۱۹) : مقایسه پایداری KA و KA -F -NH_2 . ..... ۳۱
شکل (۱-۲۰) : میانکنش KA -AA-NH_2 در نزدیکی جایگاه اتصال تیروزیناز بعد از docking ۳۲
شکل (۱-۲۱) : مراحل تشکیل RNA آنتی سنس ۳۳
شکل (۳-۱) : ساختار ترکیبات مورد مطالعه در این تحقیق ٤٤
شکل (۳-۲) : منحنی درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظت های مختلف وانیلین ٤٥
شکل (۳-۳) : منحنی درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف بیس-وانیلین ٤٦
شکل (۳-٤) : منحنی درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف وانیلیل الکل ٤۷
شکل (۳-٥) : منحنی درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف وانیلیک اسید ٤۸
شکل (۳-٦) : منحنی درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف ۲-نیتروآنیلین ٤۹
شکل (۳-۷) : منحنی درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف ۳-نیتروآنیلین ٥۰
شکل (۳-۸) : منحنی درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف ٤-نیتروآنیلین ٥۱
شکل (۳-۹) : منحنی درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف 2-NBA 4-F-2-MPH ٥۲
شکل (۳-۱۰) : منحنی درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف 3-NBA 4-F-2-MPH ٥۳
شکل (۳-۱۱) : منحنی درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف 4-NBA 4-F-2-MPH ٥٤

شکل (۳-۱۲) : منحنی های درصد فعالیت آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف ترکیبات مهار کننده..... ۵۵
شکل (۳-۱۳) : منحنیDose-response آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف وانیلین ۵۶
شکل (۳-۱٤) : منحنیDose-response آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف بیس-وانیلین ۵۶
شکل (۳-۱۵) : منحنیDose-response آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف وانیلیل الکل ۵۷
شکل (۳-۱٦) : منحنیDose-response آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف وانیلیک اسید ۵۷
شکل (۳-۱۷) : منحنیDose-response آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف ۲-نیتروآنیلین ۵۸
شکل (۳-۱۸) : منحنیDose-response آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف ۳-نیتروآنیلین ۵۸
شکل (۳-۱۹) : منحنیDose-response آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف ٤-نیتروآنیلین ۵۹
شکل (۳-۲۰) : منحنیDose-response آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف 2-NBA 4-F-2-MPH ۵۹
شکل (۳-۲۱) : منحنیDose-response آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف 3-NBA 4-F-2-MPH ٦۰
شکل (۳-۲۲) : منحنیDose-response آنزیم تیروزیناز در حضور غلظتهای مختلف 4-NBA 4-F-2-MPH ٦۰
شکل (۳-۲۳) : منحنی های Dose-response هفت ترکیب مهار کننده مورد بررسی ٦۱
شکل (۳-۲٤) : منحنی لینویور-برک برای آنزیم تیروزیناز قارچی در عدم حضور مهارکننده ٦۳
شکل (۳-۲۵) : منحنی لینویور-برک آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور وانیلیل الکل(•) و عدم حضور آن(○)..... ٦٤
شکل (۳-۲٦) : منحنی لینویور-برک آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور وانیلیک اسید(•) و عدم حضور آن(○)..... ٦۵
شکل (۳-۲۷) : منحنی لینویور-برک آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور ۲-نیتروآنیلین(•) و عدم حضور آن(○)..... ٦۵
شکل (۳-۲۸) : منحنی لینویور-برک آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور ۳-نیتروآنیلین(•) و عدم حضور آن(○)..... ٦٦
شکل (۳-۲۹) : منحنی لینویور-برک آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور ٤-نیتروآنیلین(•) و عدم حضورآن(○).. ..... ٦٦
شکل(۳-۳۰) : منحنی لینویور-برک آنزیم تیروزیناز قارچی درحضور3-NBA 4-F-2-MPH(•)و عدم حضور(○)..... ٦۷
شکل(۳-۳۱) : منحنی لینویور-برک آنزیم تیروزیناز قارچی درحضور4-NBA 4-F-2-MPH(•)و عدم حضور(○) ٦۷
شکل (۳-۳۲) : منحنی دیکسون آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور وانیلیل الکل ۷۰
شکل (۳-۳۳) : منحنی دیکسون آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور وانیلیک اسید..... ۷۰
شکل (۳-۳٤) : منحنی دیکسون آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور ۲-نیتروآنیلین ۷۱
شکل (۳-۳۵) : منحنی دیکسون آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور ۳-نیتروآنیلین ۷۱
شکل (۳-۳٦) : منحنی دیکسون آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور ٤-نیتروآنیلین ۷۲
شکل (۳-۳۷) : منحنی دیکسون آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور 3-NBA 4-F-2-MPH..... ۷۲
شکل (۳-۳۸) : منحنی دیکسون آنزیم تیروزیناز قارچی در حضور 4-NBA 4-F-2-MPH..... ۷۳

فهرست جدول ها

عنوان

جدول (۱-۱) : تقیسم بندی عوامل مهاری تیروزیناز مورد استفاده در صنایع ۱۷
جدول (۱-۲) : خلاصه ای از خصوصیات مهاری مهار کننده های مختلف از منابع طبیعی ۱۹
جدول (۱-۳) : اثرات مهاری ترکیبات خانواده سالیسیلیک اسید روی تیروزیناز قارچی ۲۵
جدول (۱-٤) : اثر مهاری هیدروکسی فلاون ها روی تیروزیناز قارچی ۲۷
جدول (۲-۱) : نحوه آماده سازی محلول های استاندارد و نمونه برای تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد. ٤۱
جدول (۳-۱) : مقادیر IC_{50} ترکیبات مختلف مهار کننده برحسب میکرومولار ٦۲
جدول (۳-۲) : مقایسه پارامترهای سنیتیکی K_m و V_{max} در IC_{50} مهار کننده ها با IC_{50} و ساختار شیمیاییشان ٦۸
جدول (۳-۳) : ساختار شیمیایی ترکیبات فعال کننده ٦۹

خلاصه:

تیروزیناز یا پلی فنل اکسیداز (PPO) 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 حائز اهمیت بوده و جستجو برای مهارکننده های جدید تیروزیناز جذاب بوده است. در این تحقیق، برای اولین بار اثر ۲-نیتروآنیلین (a)، ۳-نیتروآنیلین (b) و ٤-نیتروآنیلین (c)، وانیلین (d)، وانیلیل الکل (e)، وانیلیک اسید(f)، همچنین مشتقات سنتزی جدیدی از وانیلین یعنی بیس-وانیلین (g)، ۲-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات (h)، ۳-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات (i) و ٤-نیتروبنزن آمینیوم ٤-فرمیل-۲-متوکسی فنولات (j)، روی فعالیت دی فنلازی تیروزیناز با استفاده از دوپامین هیدروکلرید مورد بررسی قرار گرفت. از میان آنها ترکیب c قویترین مهارکننده شناخته شد در حالیکه ترکیبات d، g و h به عنوان فعال کننده شناخته شدند. IC_{50} این ترکیبات به ترتیب زیر بود: b> e> j = f = a> i> c. ترکیبات a، b و j مهارکننده های رقابتی بودند اما ترکیبات c و i نارقابتی و e و f نیز مهارکننده های مختلط بودند. نتایج نشان داد موقعیت گروههای آمینو و نیترو و قدرت الکترون کشندگی گروههای عاملی در کربن شماره ۱ به ترتیب در نیتروآنیلین ها و مشتقات وانیلین در قدرت مهاری آنها مهم است.

کلمات کلیدی: تیروزیناز، مهارکنندگی، نیتروآنیلین، وانیلین

فصل اول

مقدمه

مقدمه

۱-۱ مقدمه

قهوه ای شدن[1] توسط آنزیم در سبزیجات، میوه ها و غذاهای دریایی بواسطه فعالیت آنزیم تیروزیناز می باشد. تیروزیناز (EC 1.14.18.1)، که بعنوان پلی فنل اکسیداز نیز شناخته می شود، یک آنزیم منواکسیژناز چند مسی[2] است که در طبیعت به طور گسترده در باکتری ها، قارچ ها، گیاهان عالی و جانوران وجود دارد. عملکرد آن شامل فعالیت منوفنولازی[3] (کرسولازی)[4] و دی فنولازی[5] (کتکولازی)[6] می باشد که باعث بیوسنتز ملانین و کاتالیز اورتو-هیدروکسیلاسیون تیروزین (منوفنول) به ۳و٤-دی هیدروکسی فنیل آلانین یا DOPA (ارتو- دی فنول) و اکسیداسیون DOPA به دوپاکوئینون (ارتو-کوئینون) می شود. سپس *O*- کوئینون می تواند از طریق یک سری واکنش های آنزیمی و غیرآنزیمی به پیگمان های ملانین تبدیل شود (شکل۱-۱) [۱].

تیروزیناز در پستانداران، مسئول پیگمانتاسیون پوست، چشم ها و مو می باشد [۱]. این آنزیم در گیاهان، باعث رنگ قهوه ای ناخواسته محصولات کشاورزی، مانند سبزیجات و میوه های بریده شده و ضربه خورده گردیده منجر به کاهش چشمگیری در ارزش غذایی و فروش آنها می گردد [۳و۲]. در حشرات، تیروزیناز برای اسکلروتیزاسیون[7] اسکلت خارجی، ترمیم زخم و کپسول سازی[8] انگل ضروری است [٥و٤].

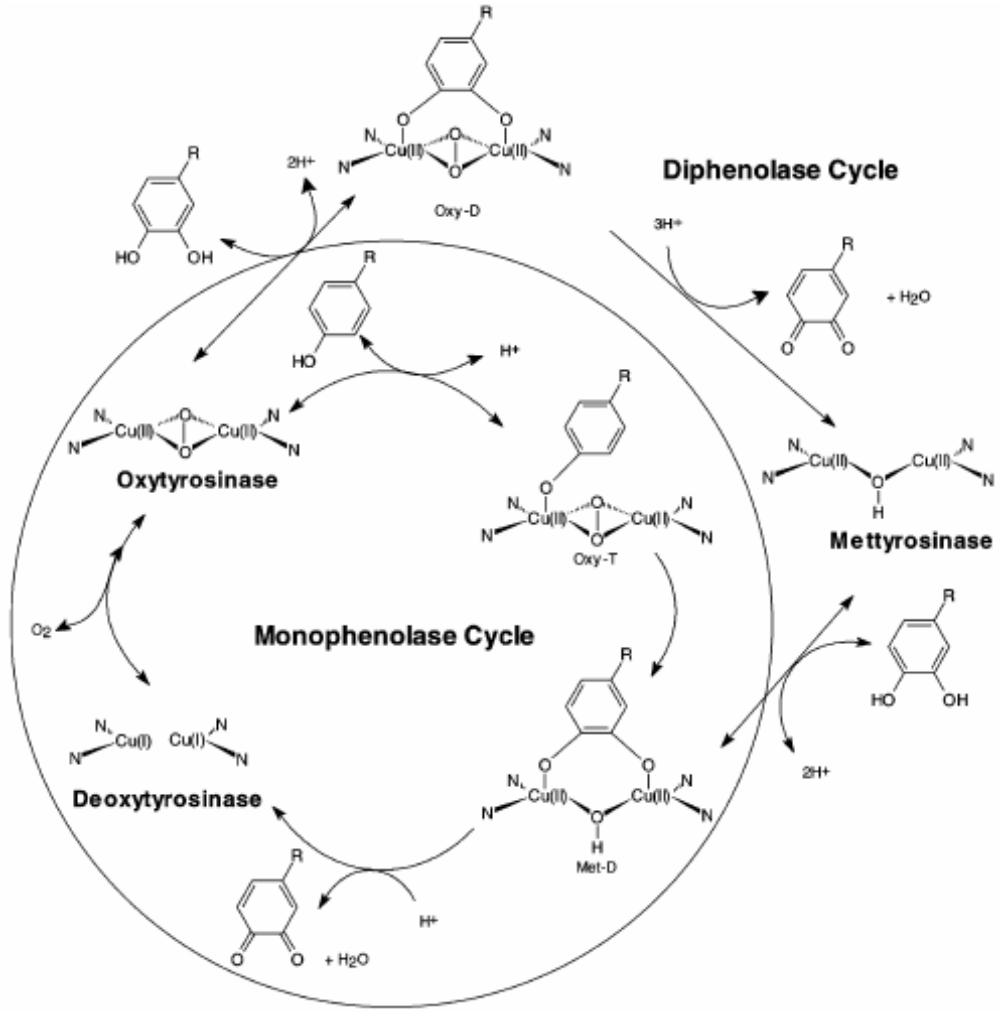
۱-۲ خصوصیات بیوشیمیایی تیروزیناز

نتایج تجربی بدست آمده روی تیروزیناز تا به امروز نشان داده همه تیروزینازها از منابع مختلف منومر با بیش از یک ایزوفرم هستند [۹-٦]. هر دو فعالیت منوفنولازی و دی فنولازی آنزیم نیازمند اکسیژن مولکولی می باشد [٦ و ۱۰]. 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[9] در نرم تنان و بندپایان

---

1 - Enzymatic browning
2 - Multicopper monooxygenase
3 - Monophenolase
4 - Cresolase
5 - Diphenolase
6 - Catecholase
7 - Sclerotization
8 - Encapsulation
9 - Bluish copper-containing protein

است، روشن شده است [۷ و۱۱]. دو اتم مس در جایگاه فعال قرار دارند و هندسه و ساختار الکترونیک این مرکز حاوی دو مس در فعالیت آنزیمی نقش بسیار مهمی دارد. این مرکز حاوی دو مس در سه حالت مختلف در تیروزیناز آرایش می یابد. به عبارت دیگر سه ایزوفرم از تیروزیناز یعنی اکسی تیروزیناز، مت تیروزیناز و داکسی تیروزیناز وجود دارد (شکل۱-۱).



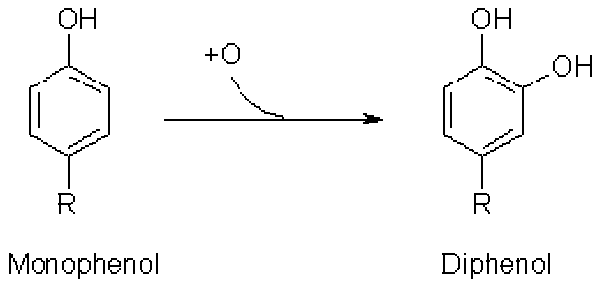
شکل۱-۱: مکانیسم فعالیت منوفنولازی و دی فنولازی تیروزیناز

اکسی تیروزیناز حاوی دو اتم مس ((Cu (II)) چهار وجهی است. هر اتم مس به وسیله سه لیگاند با نیتروژن هیستیدین کوردینه شده است. اکسیژن مولکولی (O_2) به صورت پراکسید به این سایت متصل شده و پلی بین دو یون مس ایجاد می کند (یک ملکول اکسیژن خارجی). در مت تیروزیناز یک اتم اکسیژن بین دو مس چهار وجهی پل می زند (یک اکسیژن داخلی). آنزیم خالص شده مخلوطی از مت تیروزیناز و اکسی تیروزیناز به نسبت ۸۵:۱۵ می باشد. داکسی تیروزیناز دو مس به صورت Cu(I)-Cu(I) دارد و پل اکسیژنی در این ساختار وجود ندارد. احیاء این سایت دیوکسی deoxy با انتقال دو الکترون که با اتصال اکسیژن مولکولی دنبال می شود منجر به تشکیل مجدد اکسی تیروزیناز می شود [۱۴-۱،۱۲] .

۱-۳ واکنش های تیروزیناز

۱-۳-۱ منوفنل اکسیداز، منوفنولاز یا کرسولاز

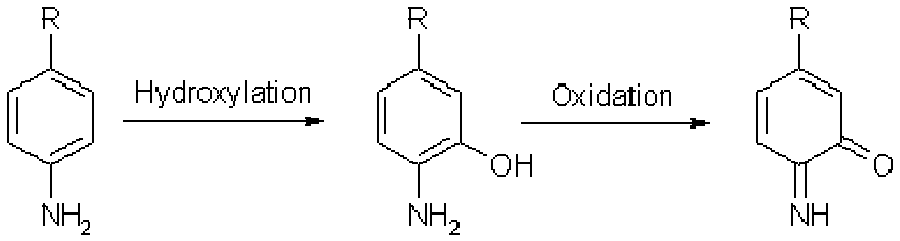
فعالیت منوفنولازی تیروزیناز شامل ارتو هیدروکسیلاسیون منوفنل به ارتو- دی فنول، اولین مرحله در مسیر ملانیزاسیون است. منوفنل اکسیداز، هیدروکسیلاسیون منوفنل ها به دی فنل ها را کاتالیزمی کند (شکل ۱-۲). این آنزیم در جانوران به تیروزیناز نسبت داده می شود، به علت آنکه تیروزین بعنوان سوبسترای اصلی منوفنلی است. منوفنل اکسیداز در سخت شدن کوتیکول بسیار مؤثر می باشد. این آنزیم در گیاهان کرسلاز هم نامیده می شود که نشان دهنده توانایی آنزیم در استفاده از سوبسترای منوفنلی کرسول[1] است [۱].



شکل۱-۲: واکنش تبدیل منوفنل به دی فنل

[1] -Cresol

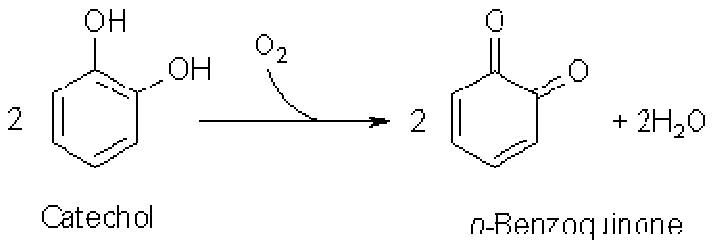
همچنین این آنزیمها قادر به اکسیداسیون آمین هـای آروماتیـک و ارتـو- آمینوفنـل مـی باشـند ایـن واکنش ها شبیه به واکنشهای منو فنل و دی فنل هستند (شکل ۱-۳) [۱۵].



شکل۱-۳: واکنش اکسید شدن آمین آروماتیک

۱-۳-۲ دی فنل اکسیداز، دی فنولاز یا کتکولاز

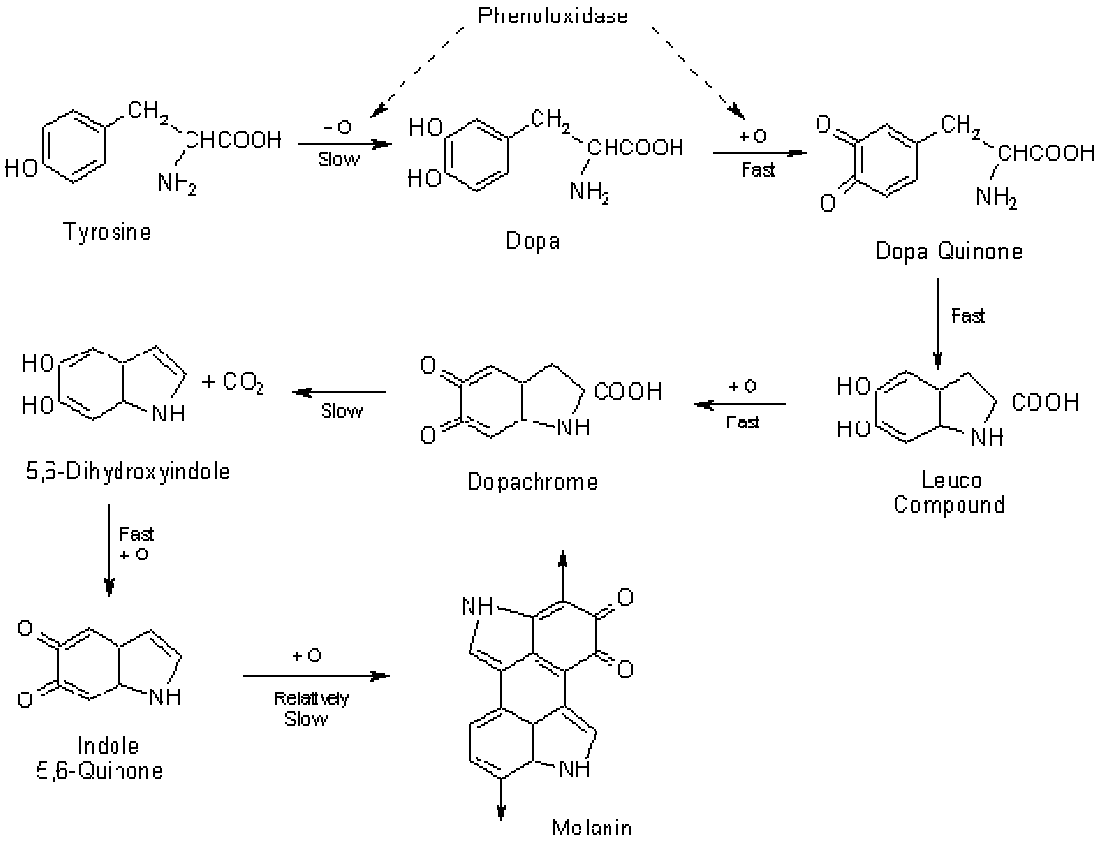
فعالیت دی فنولازی شامل اکسیداسیون دو مولکول ارتو- دی فنول به دو مولکول ارتو- کوئینون بـه همراه احیاء چهار الکترون به O_2 و تشکیل دو مولکول آب است. اکسیداسـیون سوبسـترای دی فنلـی بـه کوئینون ها در حضور اکسیژن بوسیله دی فنل اکسیداز کاتالیز مـی شـود (شـکل۱-٤). دی فنـل اکسـیداز بخاطر تمایل زیاد، سرعت کاتالتیک و شرکت آن در تشکیل کوئینون، به تولید پیگمان قهوه ای منجـر مـی شود.



شکل۱-٤: واکنش اکسیداسیون دی فنل ها به کوئینون

۱-۳-۳ پلی فنل اکسیداز

تیروزیناز یک آنزیم حاوی مس می باشد که دو واکنش مجزا در مسیر تولید ملانین را کاتالیز می کند (شکل۱-۵). عمل هیدروکسیلاسیون تیروزیناز بوسیله فعالیت منوفنولازی و اکسیداسیون ۳و٤-دی هیدروکسی فنیل آلانین (L-Dopa) به *O*- دوپاکوئینون بوسیله فعالیت دی فنولازی میسر می گردد. *O*- دوپاکوئینون ناپایدار است و در اثر فعالیت غیرآنزیمی تبدیل به دوپاکروم می شود. در هر دو واکنش فوق اکسیژن مولکولی بعنوان کمک سوبسترا استفاده می شود. در واقع آنزیم تیروزیناز یک آنزیم دو سوبسترایی می باشد. این که چگونه یک سیستم آنزیمی قادر است هر دو فعالیت منو و دی فنول اکسیدازی را انجام دهد هنوز نامشخص است [۱٦].

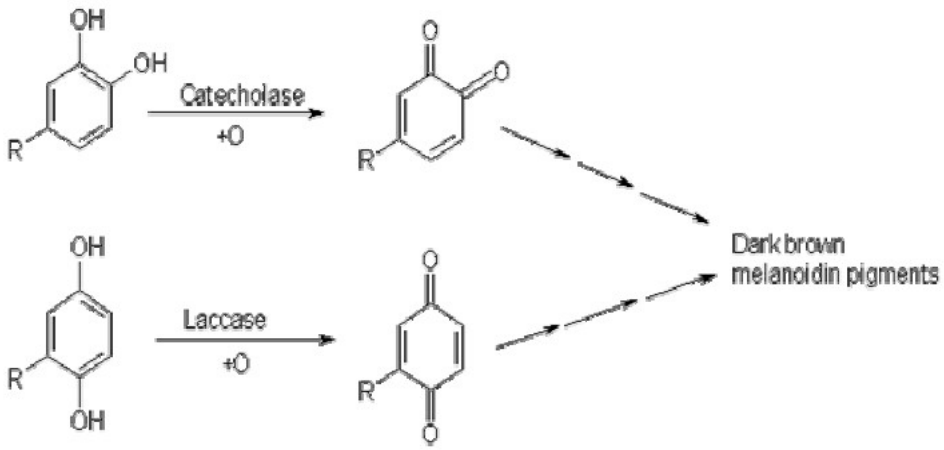


شکل۱-۵: تشکیل ملانین بوسیله تیروزیناز

آنزیم پلی فنل اکسیداز ابتدا از قارچ[1] که حاوی ایزوآنزیم های مختلفی است جدا شد. پلی فنل اکسیداز جدا شده از انبه شامل دو ایزوآنزیم است. این ایزوآنزیم ها نسبت به *O*– دی فنل ویژگی نشان می دهند. پلی فنل اکسیدازی که از موز جدا شده قادر به اکسیداسیون *O*– دی فنل بوده اما قادر به اکسیداسیون منودی فنل ها نبوده است در حالیکه سایر واریته ها قادر به فعالیت منوفنولازی و دی فنولازی بوده اند [۱۷]. در حشرات پلی فنل اکسیدازی که از کوتیکول جدا شده فقط فعالیت دی فنل اکسیدازی دارد در حالیکه پلی فنل اکسیدازی که از همولنف جدا شده فعالیت منوفنل اکسیدازی را نشان می دهد. پلی فنل اکسیدازی که در کوتیکول میگو حضور دارد هر دو فعالیت را نشان می دهد [۱۸].

۱-۳-٤ لاکاز

لاکازها یا *ρ*– دی فنول اکسیداز (EC 1.10.3.2) برخلاف کتکولازها که *O*– دی فنول ها را اکسید می کنند، توانایی اکسید کردن ترکیبات *ρ*– دی فنولی را دارند (شکل۱-٦). این آنزیم ها بصورت گلیکوپروتئین می باشند و وزن مولکولی آنها بین ٦۰ تا ۸۰ کیلو دالتون می باشد. هر مولکول آنزیم ۲ تا ٤ اتم مس دارد. Yashidia برای اولین بار در سال ۱۸۸۳ این آنزیم را از درخت Lacquer استخراج کرد، بعد از آن در سال ۱۸۹٦ آن را از قارچ جدا کردند. وجود لاکاز در باکتری در سال ۱۹۹۳ گزارش شده است. لاکاز در بسیاری از قارچها و در برخی از گیاهان عالی وجود دارد اما در سبزیجات و میوه ها (به استثناء هلو و زردآلو) تاکنون گزارش نشده است [۲۰و۱۹].



شکل۱-٦: تفاوت عملکرد کتکولاز و لاکاز

[1] - Mushroom

۱-۳-۵ مکانیسم فعالیت منوفنولازی و دی فنولازی

۱-۳-۵-۱ فعالیت منوفنولازی

همانطور که در شکل۱-۱ مشاهده می شود، فعالیت منوفنولازی با اتصال سوبسترای منوفنول به یکی از اتم های مس اکسی تیروزیناز آغاز می گردد (Oxy-T) [۷ و۲۱]. سپس،*O*- هیدروکسیلاسیون منوفنول از طریق اتصال پراکسید بوقوع می پیوندد و یک آنزیم کوؤردینه شده با *O*- دی فنول (Met-D) تشکیل می شود. سپس Met-D اکسایش بیشتری یافته*O*- کوئینون و آنزیم به شکل deoxy (داکسی تیروزیناز) می دهد. به شکل اکسیژنه شده انتقال می یابد و یا *O*- دی فنول آزاد و آنزیم به شکل met (مت تیروزیناز) تبدیل شده و وارد چرخه دی فنولازی می شود. باید متذکر شویم منوفنول می تواند با اکسی تیروزیناز واکنش دهد اما نمی تواند با مت تیروزیناز واکنش دهد تا محصول*O*- کوئینون تولید گردد.

۱-۳-۵-۲ فعالیت دی فنولازی

در چرخه دی فنولازی، *O*- دی فنول قادر است با هر دو شکل oxy و met واکنش دهد و تولید *O*- کوئینون نماید [۷]. بدون توجه به سوبسترا، فعالیت دی فنولازی ($k = ۱۰^{۷}$ per s) با سرعت بیشتری نسبت به فعالیت منوفنولازی ($k = ۱۰^{۳}$ per s) صورت می گیرید [۲۳و۲۲]. واکنش دی فنول با مت تیروزیناز آنزیم را به deoxy تغییر داده و آن را وارد چرخه منوفنولازی می کند [۷].

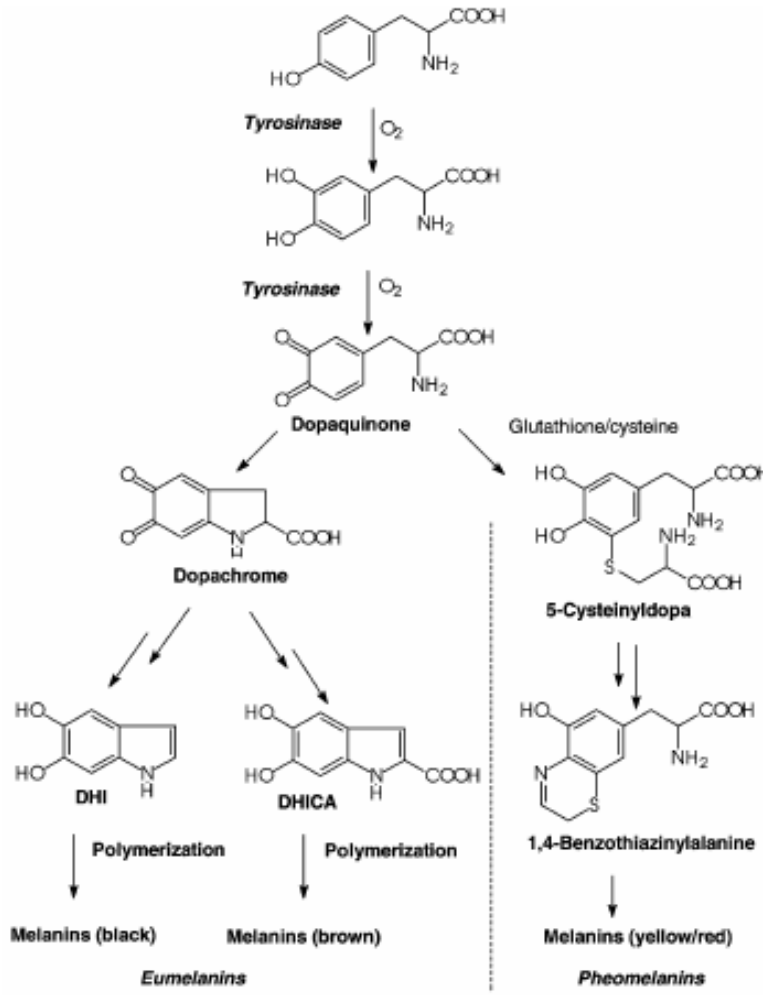
۱-٤ مسیر بیوسنتز ملانین در پستانداران

ملانین ها در ملانوزومای ملانوسیت ها سنتز می شوند. قبل از بالغ شدن، ملانوزوم ها از ملانوسیت ها به کراتینوسیت ها انتقال می یابند [۲٤]. ملانوژنز[1] با تشکیل دوپاکوئینون از L- تیروزین یا DOPA شروع می شود (شکل۱-۷). دو نوع ملانین تولید می شود. یوملانین (سیاه یا قهوه ای) و فئوملانین (زرد یا قهوه ای مایل به قرمز) [2][۲۵ و۱]. در یوملانوژنز، دوپاکوئینون تحت واکنش های حلقوی شدن و اکسایشی قرار گرفته به دوپاکروم[3] تبدیل می شود. سپس، ۵ و٦- دی هیدروکسی ایندول و ۵ و٦-دی هیدروکسی ایندول-۲-کربوکسیلیک اسید (DHICA) تولید و پلیمریزه شده یوملانین را بوجود می آورد. در طول فئوملانوژنز، دوپاکوئینون به وسیله گروه تیول نوکلئوفیل گلوتاتیون یا سیستئین مورد حمله قرار

---

[1] - Melanognesis
[2] - Yellow or reddish-brown
[3] - Dopachrome

می گیرد و منجر بـه تشـکیل ۱و٤-بنزوتیازینیـل آلانـین مـی شـود. پلیمریزاسـیون واحـدهای منومریـک فئوملانین را تشکیل می دهد [۲۷و۲٦].



شکل۱-۷: نقش تیروزیناز در ملانوژنز

۱-۵ قهوه ای شدن آنزیمی مواد غذایی گیاهی

در گیاهان، تیروزیناز در کلروپلاست بافتهای گیاهی سالم قرار دارد درحالیکه سوبستراهایش در واکوئل واقع شده اند [۲۹و۲۸]. خراش دادن، پوست کندن یا له کردن بافت های گیاهی این قسم بندی[1] را از بین برده باعث انجام واکنش های قهوه ای کننده که بواسطه فعالیت آنزیمی اتفاق می افتد می گردد. کلروژنیک اسید، یک ترکیب فنولی می باشد که به طور گسترده ای در میوه ها و سبزیجات وجود دارد، نیز توسط این آنزیم اکسید شده نقاط سیاه یا قهوه ای تشکیل می شود [۲].

۱-٦ اثرات مفید آنزیم پلی فنل اکسیداز

تشکیل رنگدانه های قهوه ای بوسیله آنزیم پلی فنل اکسیداز در برخی از گیاهان از جمله چای، کاکائو و قهوه بسیار مفید می باشد. در فرآیند های تخمیر و خشک شدن، فعالیت این آنزیم باعث افزایش بازده بهبود در رنگ این محصولات می شود. پلی فنل اکسیداز همچنین در تشکیل رنگدانه های قهوه ای طلایی در میوه های خشک مانند کشمش، خرما، آلو و انجیر نقش مهمی دارد [۳۰]. همچنین این آنزیم مانع حمله حشرات و میکروارگانیسم ها به گیاهان می شود. بعلت آنکه ترکیبات فنلی در میوه ها و سبزی های رسیده کاهش می یابد، نسبت به بیماری و عفونت حساس تر هستند [۳۱].

۱-۷ نقش فیزیولوژیکی تولید رنگدانه

۱-۷-۱ نقش آنزیم در گیاهان

مطالعات تعین توالی و کلونینگ در گیاهان و جانوران و میکروارگانیسم ها نشان داد، ناحیه ای که مس به آنزیم متصل می شود بسیار حفاظت شده است. پلی فنل اکسیداز نقش مهمی در مقاومت گیاهان به میکروبها و آلودگی های ویروسی و شرایط آب و هوایی نامساعد دارد. فنل هایی نظیر کلروژنیک اسید[2]، کافئیک اسید[3]، اکسیپولین[4] بعنوان سوبسترای این آنزیم بوده خواص ضد قارچی دارند. پلی فنل اکسیداز مرحله پلیمریزاسیون فنل ها برای تولید کوئینون را کاتالیز می کند. پلیمریزاسیون بیشتر منجر به تولید محصول تیره می شود که همان ملانین است. ملانین بعنوان یک سد است و خواص آنتی میکروبی آن از انتشار آلودگی یا کوفتگی ها در گیاهان جلوگیری می کند. گیاهانی که پلی فنل اکسیداز بیشتری

---

[1] - Compartment
[2] - Chlorogenic acid
[3] - Caffeic acid
[4] - Scopolin

دارند مقاومت بیشتری نسبت به استرس های آب و هوایی نشان می دهند. آنزیم هایی مانند پراکسیداز و لیپواکسیژناز نیز در شرایط استرس افزایش می یابند. پاسخ آنزیم ها به استرس و آلودگی به عوامل زیادی بستگی دارد که یکی از این عوامل خود میزبان می باشد. در پایه هایی از گیاه توتون که به ویروس موزاییک توتون آلوده شده اند میزان پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز کمتر است، اما هیبرید دو گونه از توتون باعث افزایش پلی فنل اکسیداز و نهایتا افزایش مقاومت توتون می گردد. همچنین ایجاد هیبرید باعث افزایش مقاومت نسبت به حمله ویروس و قارچ در مقایسه با والدین خواهد بود. تحقیقات نشان داده که آنزیم پلی فنل اکسیداز نقش مهمی در متابولیسم و رشد کلروپلاست و تنظیم رشد گیاه دارد [۳۲].

۱-۷-۲ نقش تیروزیناز در جانوران

پلی فنل اکسیداز در حشرات و سخت پوستان بصورت زیموژن[1] یا پروفنل اکسیداز[2] حضور داشته پس از فعال شدن مقاومت جانور را نسبت به بیماریها افزایش می دهد. متابولیت های ثانویه مانند گلوکان، گلیکوپروتئین ها، لامینارین و لیپوپلی ساکاریدها موجب فعال شدن پروتئازها شده و فعال شدن پروتئاز ها منجر به فعال شدن آنزیم پلی فنل اکسیداز می شود. مشخص شده است در میگو و خرچنگ دریایی این آنزیم بوسیله تریپسین و در حشرات توسط کیموتریپسین فعال می شود [۳۳]. نقش اصلی آنزیم در سخت پوستان و حشرات مربوط به سخت شدن و تولید کیتین طی چرخه رشد آنها می باشد. فعال شدن این آنزیم یک مکانیسم اساسی برای کنترل مراحل مختلف پوست اندازی است. همچنین یک سیستم ایمنی ذاتی و بی نظیر در بند پایان در پاسخ به انگل ها و بیماریزاها محسوب می شود [۳۵و۳٤]. بیوسنتز پیگمان های ملانین در حشرات نظیر پستانداران است بجز عدم توانایی آن در تبدیل دوپاکروم به DHICA [۳٦]. در طی مرحله تولید کیتین، دی فنل ها بوسیله پلی فنل اکسیداز اکسید می شوند و تشکیل کینون می دهند و کینون های تشکیل شده با گروه های جانبی پروتئین ها واکنش داده و اتصال بوجود آمده باعث سختی می شود. در طی مراحل رشد، خرچنگ ها صدف خود را از دست می دهند و یک صدف بزرگتر جایگزین صدف قبلی می شود [۳۳].

---

[1] - Zymogen
[2] - Prophenol oxidase