

استخراج و بررسی مشخصات آنزیم تایروزیناز بادام‌زمینی شمال ایران

معصومه فریدی^۱، ریحانه سریری^{۱*}، وهب جعفریان^۱، حبیب‌الله ناظم^۲

^۱ بخش زیست‌شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲ بخش زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

تشکیل رنگدانه‌های قهوه‌ای به وسیله آنزیم تایروزیناز، یکی از مهمترین علت‌های تغییر رنگ میوه‌ها و سبزی‌ها و در نتیجه کاهش کیفیت آنهاست. این آنزیم در مراکز تحقیقاتی، صنایع دارویی و آرایشی کاربرد فراوان داشته، در حال حاضر تنها منبع آنزیم مذکور تایروزیناز قارچ خوراکی است. از آنجایی که بادام‌زمینی از محصولات مهم کشاورزی استان گیلان است و از طرفی، با توجه به تجربه و تخصص گروه ما در مورد تایروزیناز، هدف این تحقیق بررسی امکان جایگزینی تایروزیناز بادام‌زمینی با نوع قارچی در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و تحقیقاتی است. در این پروژه، آنزیم مذکور از دانه بادام‌زمینی استخراج و خالص‌سازی و خواص آن از جمله فعالیت بیولوژیکی، دما و pH بهینه تعیین گردید و با تایروزیناز سایر منابع مقایسه شد. نتایج الکتروفورز نشان داد که آنزیم تایروزیناز بادام‌زمینی دارای دو ایزوفرم با اوزان مولکولی بیشتر از تایروزیناز قارچ بوده، دما و pH بهینه فعالیت آنزیم به ترتیب ۴۰°C و ۵/۲ است. مقادیر ثابت میکائیلیس متن ۲۵۷/۵ میلی‌مولار و سرعت ماکزیمم ۰/۰۰۴۲۱ میلی‌مولار بر دقیقه محاسبه گردید.

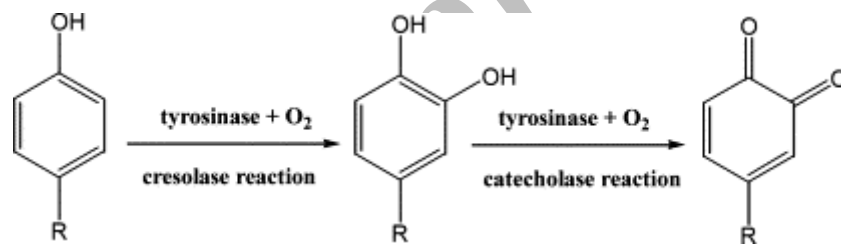
واژه‌های کلیدی: استخراج، خالص‌سازی، تایروزیناز، ثابت‌های میکائیلیس

مقدمه

ناپایدار بوده، متعاقباً با خودشان، آمینو اسیدها یا پروتئین‌ها، فنل‌ها و دیگر ترکیبات سلولی اتصال عرضی برقرار می‌کنند و سبب ایجاد پلیمرهای غیر همگون قرمز، سیاه و قهوه‌ای می‌شوند. تشکیل رنگدانه‌های قهوه‌ای به وسیله آنزیم پلی فنل اکسیداز، یکی از مهمترین واکنش‌هایی است که در انسان و برخی جانوران عالی موجب کدر و

پلی فنل اکسیدازها (Polyphenol Oxidases: PPOs) دسته وسیع و مهمی از متالو پروتئین‌ها هستند با شماره کمیته آنزیمی (EC 1.14.18.1) که واکنش تبدیل هیدروکسی فنل‌ها را به مشتقات کوئینون کاتالیز می‌کنند (Van Gelder *et al.*, 1997). اورتو کوئینون‌ها به شدت واکنش‌گر و

کاتکولاز، لاکاز و کرسولاز (Garcia-Borrón and Solano, 2002). آنزیم تایروزیناز حداقل دو نوع واکنش را کاتالیز می‌کند که در هر دو نوع واکنش از اکسیژن مولکولی و ترکیبات فنلی به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند. این واکنش‌ها عبارتند از هیدروکسیله کردن منوفنل‌ها به ارتو-دی‌فنل‌ها (فعالیت مونو فنلاز یا کاتالاز) و اکسید کردن ارتو-دی‌فنل‌ها یا پارا-دی‌فنل‌ها به ارتو-کوئینون (فعالیت دی‌فنلاز یا کاتکولاز). شکل ۱ این دو نوع واکنش را در حضور تایروزین به عنوان سوبسترا نشان داده است.



شکل ۱- فعالیت کرسولازی و کاتکولازی آنزیم تایروزیناز (Julivet *et al.*, 1998)

خوراکی (Nakamura *et al.*, 1966; Strothkamp *et al.*, 1976) و یا سایر قارچ‌ها است (Fan *et al.*, 2004)، ولی در حد تحقیقاتی نیز تاکنون این آنزیم را از منابع گوناگون جانوری (Garcia Borrón *et al.*, 1985; Kwon *et al.*, 1987) و گیاهی مانند سیب‌زمینی (Matheis and Belitz, 1977) و توتون (Sariri *et al.*, 2007) و یا میوه‌ها مانند هلو (Wong *et al.*, 1971)، گلابی (Espin *et al.*, 2001) و سیب (Rocha and Morais, 2001) استخراج نموده و خواص آن را بررسی کرده‌اند. از طرف دیگر، مطالعات در مورد سینتیک واکنش آنزیم و اثر کننده‌های آن نیز بیشتر

لکه‌دار شدن پوست (Del Marmol and Beermann, 1996) و در گیاهان موجب تغییر رنگ آنها شده، عامل از دست رفتن کیفیت در بیشتر غذاهاست (Fraignier, 1995). بنابراین، بررسی انواع، ویژگی‌های مربوطه و بازدارنده‌های این آنزیم می‌تواند از نظر اقتصادی و همچنین از جنبه‌های تحقیقاتی حایز اهمیت زیادی باشد (Espin and Witchers, 1999; Espin *et al.*, 1999; Espin *et al.*, 2000a). تشکیل کوئینون در محصولات کشاورزی بسیار اهمیت دارد و این امر مهمترین علت تمایل گسترده و روز افزون دانشمندان برای مطالعه ویژگی‌های پلی‌فنل اکسیداز است. پلی‌فنل اکسیدازها دارای سه نوع فعالیت شناخته شده هستند که عبارتند از: فعالیت‌های

چنانکه در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، در هر دو واکنش فوق اکسیژن مولکولی نقش کمک کننده سوبسترا را دارد. در واقع، آنزیم تایروزیناز یک آنزیم دو سوبسترای است و این که چگونه یک سیستم آنزیمی قادر است هر دو فعالیت مونو و دی‌فنل اکسیدازی را انجام دهد، تا مدت‌ها نامشخص و موضوع تحقیق برخی دانشمندان بوده است (Friedman and Daron, 1977).

آنزیم تایروزیناز برای استفاده تحقیقاتی در صنایع دارویی و آرایشی کاربرد فراوان داشته، در هر حال، برای اغلب کاربردهای فوق، منبع آنزیم مذکور تایروزیناز قارچ

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانتی در پوسته آن (Lou et al., 2004) | را می‌توان نام برد.

هدف

از آنجایی که بادام زمینی از محصولات مهم کشاورزی استان گیلان بوده، با توجه به تجربه و تخصص گروه ما در دانشگاه گیلان در مورد تایروزیناز، عزم بر این شد که آنزیم این گیاه بررسی و با منابع دیگر مقایسه شود. به علاوه، بر اساس تحقیق از تولید کنندگان محلی و مشاهدات و بررسی‌های طولانی مدت توسط نویسندگان، مشخص شده است که بادام زمینی دارای عمر کوتاهی بوده، بررسی ارتباط عمر بادام با میزان آنزیم تایروزیناز، در بازار پسند نمودن محصول و افزایش بهره‌وری می‌تواند موثر باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد که تولید فرآورده‌های بادام زمینی، از قبیل روغن، کره و یا استخراج مواد بیوشیمیایی مهم آن، مانند تایروزیناز بتواند در این منطقه از کشور سبب تحول اقتصادی گردد. با توجه به فاکتورهای ذکر شده، هدف این تحقیق استخراج آنزیم تایروزیناز از انواع بادام زمینی تازه و یک ساله و بررسی خصوصیات آن در مقایسه با تایروزیناز قارچ - که مصرف تجاری فراوانی دارد - بوده است.

روش کار

عصاره‌گیری از دانه بادام زمینی

دانه‌های سالم و بدون پوست بادام زمینی، ابتدا درون یک هاون چینی تمیز کمی خرد و سپس با استفاده از نیتروژن مایع به صورت پودر در آورده شدند. در مرحله بعدی، ۵/۰ گرم از پودر حاصل در ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با $\text{pH}=6/8$ همراه با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۱ میلی مولار) به مخلوط

در مورد تایروزیناز قارچ بوده است (Hsu et al., 2007; Chen et al., 2003). این در حالی است که آنزیم تایروزیناز موجود در حبوبات کمتر مطالعه شده است. جستجو در مورد وجود و یا بررسی آنزیم تایروزیناز در میان حبوبات به یافتن تنها یک گزارش قدیمی (Miller, 1929) | برای استخراج آنزیم تایروزیناز کم محلول از برگ‌های پهن نوعی لویا انجامید. از طرفی، چند مقاله جدید نیز در مورد حبوباتی، از قبیل باقلا (Waliszewski, 2000; Paul and Gowda, 2009; et al., 2009) | و جوانه نخود (Marcio and Fabricio, 2008) اخیراً چاپ شده است. در هر صورت، بر اساس بررسی‌های انجام شده توسط گروه ما، تاکنون در مورد پلی فنل اکسیداز بادام زمینی تحقیقات کمتری صورت گرفته است.

بادام زمینی با نام علمی *Arachis Hypogaea* گیاهی

است از تیره نخود (Leguminosae)، کوتاه و یک ساله که، چنانچه در ناحیه‌های فاقد یخبندان باشد، ظرفیت چند ساله شدن را دارد. میوه بادام زمینی به طول تقریبی ۴ سانتی‌متر بوده، در یک پوسته شکننده به رنگ خاکستری مایل به زرد قرار دارد. بر روی پوسته یک تا سه برجستگی مشاهده می‌شود که هر یک محل دانه‌ها را نشان می‌دهد. دانه بادام زمینی تقریباً مانند فندق به رنگ سفید مایل به زرد بوده ولی تخم‌مرغی شکل است. پوسته نازکی دانه را پوشانده که به رنگ قرمز قهوه‌ای است. بادام زمینی در طب قدیم ایران برای تقویت ریه و طحال، افزایش کلسترول خوب خون، کاهش درد معده و ناراحتی‌های گوارشی، بر طرف کردن سرفه خشک، ازدیاد شیر در مادران شیرده، به عنوان ملین و تقویت قوای دماغی مفید استفاده می‌شده است. به علاوه، برخی خواص دیگر این گیاه دارویی نیز مورد توجه و مطالعه قرار گرفته است که از جمله آنها

مدل BIORAD و ستون (UNO-Q1) که فاز ثابت (رزین) آن Q- سفاروز بود، استفاده شد. برای انجام این کروماتوگرافی، از دو نوع بافر A و B استفاده شد و سرعت جریان (Flow Rate) بافر یک میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید. بافر A شامل تریس با غلظت ۲۰ میلی‌مولار $pH=7.2$ و بافر B متشکل از تریس با غلظت ۲۰ میلی‌مولار و NaCl یک مولار $pH=7.2$ است. پس از انجام کروماتوگرافی، فعالیت آنزیم تیروزیناز در فراکشن‌های هر پیک سنجیده شده، فراکشن‌هایی که حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز بودند برای انجام مراحل بعدی در دمای $20^{\circ}C$ منتقل شدند.

تغلیظ به روش اولترافیلتراسیون

با توجه به اینکه نمونه پروتئین خارج شده از FPLC رقیق شده، جهت تشخیص میزان خلوص، بر روی ژل SDS-PAGE قابل رؤیت نخواهد بود، بنابراین، بعد از انجام کروماتوگرافی تبادل یونی فراکشن‌های حاوی آنزیم تیروزیناز که با سنجش فعالیت آنزیمی مشخص شده بودند، به وسیله روش اولترافیلتراسیون با میکروتیوب سنتریکون تغلیظ گردید. برای تغلیظ در این روش از سانتریفیوژ با سرعت چرخش 12000 rpm در دمای $4^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد.

سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز SDS-PAGE

به منظور مشاهده ایزوفرم‌های آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) و میزان خلوص آنزیم از عمل الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۱۲٪ استفاده شد. الکتروفورز SDS-PAGE از نمونه‌های تغلیظ شده پس از انجام کروماتوگرافی تبادل آنیونی انجام گردید. پس از انجام

تبدیل و مدت ۱۵ دقیقه در 14000 rpm در دمای $4^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جدا شده، دوباره به مدت ۵ دقیقه در 14000 rpm در دمای $4^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز به آرامی با سمپلر برداشته و در میکروتیوب‌های جدید ریخته شد.

رسوب‌گیری با سولفات آمونیم

برای رسوب دادن پروتئین‌ها از سولفات آمونیم ۸۵ درصد استفاده شد. نمونه‌های استخراجی درون استوانه مدرج ریخته شد و روی همزن مغناطیسی قرار گرفت و با قرار دادن در یخچال، سولفات آمونیم طی شش مرحله 10 دقیقه‌ای به محلول پروتئینی افزوده شد. بعد از انحلال کامل سولفات آمونیم، محلول در دمای $4^{\circ}C$ و با دور 1000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب پروتئینی در حداقل بافر فسفات حل گردید.

دیالیز

دیالیز با استفاده از کیسه دیالیز با اندازه منافذ 12 کیلو دالتون جهت حذف نمک آمونیم سولفات از رسوب پروتئینی و همچنین جدا کردن پروتئین‌هایی با اوزان مولکولی بیشتر از 12 کیلو دالتون انجام شد. پس از آماده‌سازی کیسه‌ها، دیالیز در بافر فسفات (50 میلی‌مولار با $pH=6.8$) بر روی استیرر در دمای $4^{\circ}C$ درجه سانتی‌گراد با سه بار تعویض بافر انجام شد (Scotter *et al.*, 2006).

تخلیص تیروزیناز

برای تخلیص آنزیم تیروزیناز از کروماتوگرافی تبادل آنیونی استفاده شد. برای انجام این کار از دستگاه FPLC

شد. ابتدا یکی از میکروتیوب‌ها در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شده و سپس سنجش آنزیمی سه بار انجام گردید. میکروتیوب دوم در دمای ۲۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شد و مانند روش قبل سه بار سنجش آنزیمی روی آن انجام گرفت و به همین ترتیب، بر روی مابقی میکروتیوب‌ها دمای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه با مدت زمان ۲۰ دقیقه اعمال نموده، مورد سنجش قرار گرفتند. سپس با مقادیر جذب‌های به دست آمده، از طریق رسم نمودار در برنامه Excel میزان دمای بهینه فعالیت آنزیم محاسبه گردید.

اندازه‌گیری pH بهینه

برای تعیین pH بهینه آنزیم ابتدا با استفاده از منوهیدروژن دی سدیم فسفات، سیتریک اسید و آب دیونیزه، بافرهایی با pHهای مشخص تهیه شدند (جدول ۱) و سپس فعالیت آنزیمی نمونه‌ها با استفاده از سوبسترای دوپامین هیدروکلرید طبق روش فوق حداقل ۳ بار در هر یک از این بافرها اندازه‌گیری شد.

تعیین غلظت پروتئین و محاسبه فعالیت ویژه

برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. بعد از هر مرحله جدا سازی، تغلیظ و تخلیص، غلظت پروتئین محاسبه شد و همچنین در هر مرحله از جداسازی، تغلیظ و تخلیص، فعالیت پلی فنل اکسیداز در یک مخلوط سنجش یک میلی‌لیتری با روش اسپکتروفتومتری از طریق اندازه‌گیری افزایش جذب در طول موج ۵۰۵ نانومتر در یک دوره زمانی ۲ دقیقه‌ای بررسی گردیده، فعالیت ویژه پروتئین در هر مرحله به دست آمد (Mayer and Staples, 2002).

الکتروفورز، ژل حاصل با روش کوماسی بریلینت بلو G-250 رنگ آمیزی گردید.

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم از سوبسترای دوپامین هیدروکلراید با غلظت ۵۵ میلی‌مولار، ۳-متیل - ۲-بنزوتیازولینون هیدرازون (MBTH) (Merek) با غلظت ۵ میلی‌مولار، دی‌متیل فرم آمید (DMF) ۲ درصد حجمی و اسید فسفریک ۰/۰۸ درصد حجمی و بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۶/۸ استفاده شد (Sanchez-Ferrer, 1988). محلول سوبسترا به شدت، نسبت به نور حساس است، بنابراین، باید از تابش نور به آن جلوگیری نموده، درون ظرف تیره نگهداری شود. با توجه به ناپایدار بودن این سوبسترا می‌باید برای هر نوبت سنجش فعالیت آنزیمی، محلول سوبسترای تازه تهیه نمود. محیط سنجش یک میلی‌لیتری حاوی ۹۹۰ μL سوبسترا و ۱۰ μL آنزیم (نمونه استخراجی) است. تغییرات جذب بر روی زمان در طول موج ۵۰۵ نانومتر در مقابل بلانک حاوی ۹۹۰ μL سوبسترا و ۱۰ μL بافر استخراج، بررسی شد.

محاسبه Km و Vmax

برای این آزمایش غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵ میلی‌مولار از سوبسترای تایروزیناز تهیه شد. سوبسترای اصلی تایروزیناز دوپامین هیدروکلراید بود و نمونه آنزیمی بعد از FPLC جهت محاسبه Km و Vmax با سه بار تکرار استفاده شد.

محاسبه دمای بهینه

ابتدا رقت مناسب نمونه آنزیمی تهیه شد و سپس در ۷ میکروتیوب ۴۰ میکرولیتر از آنزیم با رقت مناسب ریخته

زایموگرام تایروزیناز

داده شد. در ابتدا، دوپامین به سوبسترا اضافه نشد و ۱۵ دقیقه ژل در سوبسترای بدون دوپامین قرار گرفت و سپس در چند مرحله دوپامین به آن اضافه گردید. با این کار، از شدت رنگ گرفتن ژل (با رنگ آمیزی به روش روش کوماسی بریلیانت بلو (G-250) جلوگیری شد. ژل در محلول سوبسترا به مدت ۱۰-۱۲ ساعت قرار گرفت. بر اثر واکنش بین آنزیم با سوبسترا باندهای پروتئین تایروزیناز گرفته، پس از ظهور اولیه باند به منظور کاهش رنگ پذیری ژل با فرسفات بیشتری به سوبسترا اضافه گردید.

به منظور انجام زایموگرام از روش Native gel electrophoresis استفاده شده است. بافرهای مورد نیاز در این نوع الکتروفورز، همانند بافرهای مربوط در روش SDS-PAGE بوده؛ با این تفاوت که در اینجا SDS به کار برده نشد. نمونه‌ها بدون اعمال حرارت در ته چاهک بارگذاری شدند و شرایط دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد برای نمونه‌ها در تمامی مراحل آزمایش فراهم گردید تا فعالیت آنزیم حفظ گردد. ولتاژ دستگاه نیز روی ۱۰۰ تنظیم شد. بعد از اتمام الکتروفورز ژل در محلول سوبسترای آنزیم غوطه‌ور و جهت رنگ آمیزی در شرایط دمایی ۴°C قرار

جدول ۱- روش تهیه بافر با pHهای مختلف استفاده شده برای تعیین pH بهینه آنزیم

pH	سیتریک اسید (میلی لیتر)	منوهیدروژن دی سدیم فسفات (میلی لیتر)	آب دیونیزه (میلی لیتر)
۹/۲	۰	۴۰	۱۰
۸/۱	۱	۵۰	۱۳
۷/۱	۲۰	۶۸	۲۲
۶/۱	۲۰	۴۰	۱۵
۵/۲	۲۰	۲۰	۱۰
۳/۹	۲۰	۱۰	۷/۵
۲/۵	۴۰	۰	۱۰

تایروزیناز نیز به همین مقدار افزایش یافته است و این امر نشان‌دهنده راندمان بسیار خوب عمل خالص سازی است. از طرفی، با توجه به وجود دو باند مجزا در ژل زایموگرام الکتروفورز پلی آکریل آمید (شکل ۲)، حضور دو ایزوفرم برای آنزیم پلی فنل اکسیداز بادام زمینی پیش بینی می‌شود. به منظور تعیین میزان تخلیص، فراکشن‌های تغلیظ شده حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز بعد از مرحله کروماتوگرافی

نتایج

در پایان هر مرحله هموژنیزاسیون، رسوب‌دهی و تخلیص پروتئین، مقدار پروتئین توتال، فعالیت آنزیمی توتال و فعالیت ویژه تایروزیناز، درجه تخلیص و میزان راندمان کار محاسبه گردید (جدول ۲). با توجه به داده‌های جدول ۲ ملاحظه می‌شود که با افزایش میزان تخلیص به حدود ۷ برابر مقدار شروع عمل، فعالیت ویژه آنزیم

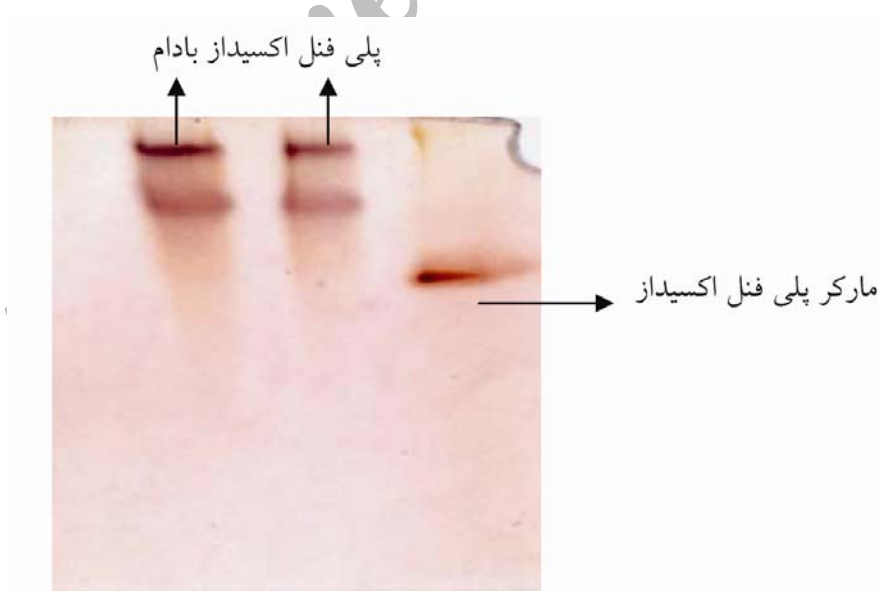
محدوده یک درجه است (شکل ۴). از طرفی، فعالیت آنزیم در pHهای اسیدی بالاتر از قلیایی بود و سنجش فعالیت آنزیم در بافرهایی با pHهای مختلف نشان داد که pH بهینه فعالیت آنزیم ۵/۲ است (شکل ۵).

تبادل آنیونی با استفاده از بافرهای احیایی و غیر احیایی الکتروفورز SDS-PAGE با استفاده از ژل ۱۲٪ انجام و ژل حاصل با کوماسی آبی جی-۲۵۰ رنگ آمیزی شد (شکل ۳).

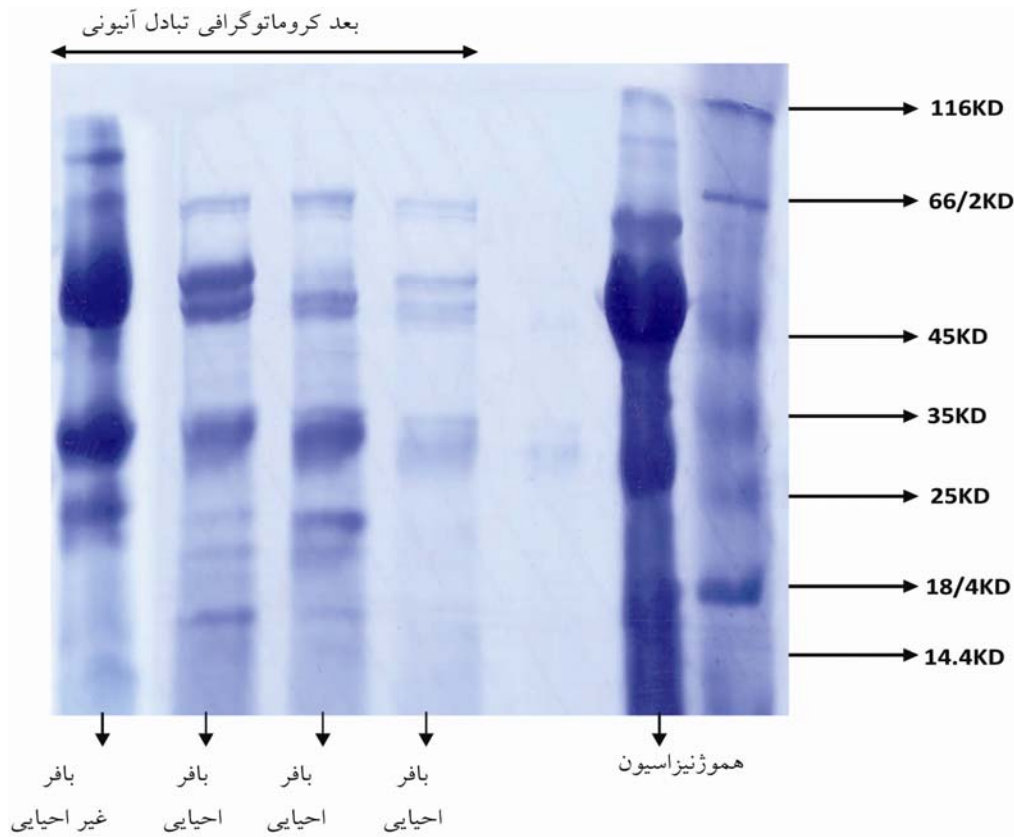
بررسی فعالیت آنزیم در دماهای مختلف نشان داد که دمای بهینه فعالیت آنزیم در حدود ۴۰°C با تغییراتی در

جدول ۲- تغییرات فعالیت کل و فعالیت ویژه آنزیم پلی فنل اکسیداز در مراحل مختلف جداسازی

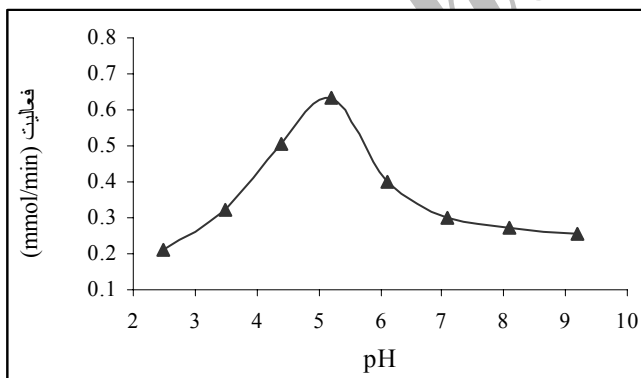
	A/min Δ	پروتئین کل mg/mL	فعالیت کل $\mu\text{mol}/\text{min}$	فعالیت ویژه $\mu\text{mol}/\text{min mg}$	راندمان	میزان تخلیص
هموژنیزاسیون	۰/۲۳۷	۳۴/۵	۰/۱۳۸	۰/۰۰۴	۱۰۰	۱
بعد از جداسازی نمکی	۰/۲۸۷	۴۰/۸۶	۰/۳۳۵	۰/۰۰۸۱	۲۴/۲۷	۲/۰۲۵
بعد از کروماتوگرافی تبادل آنیونی	۰/۱۳۶	۰/۵۷۳	۰/۰۱۵۹	۰/۰۲۷	۱۱/۵۲	۶/۹۲۵



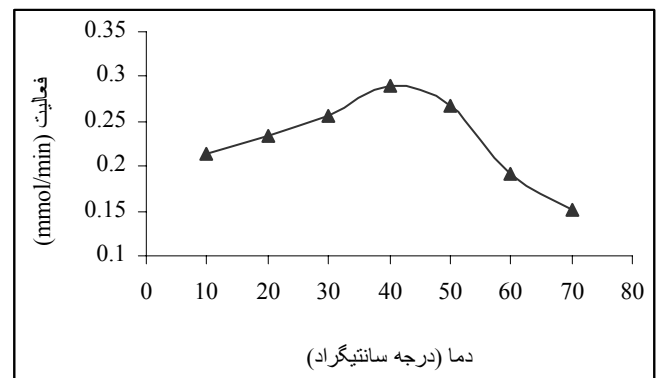
شکل ۲- زیموگرام حاصل از تایروزیناز بادام زمینی. استاندارد (مارکر پلی فنل اکسیداز) دارای وزن مولکولی ۵۸ کیلو دالتون است.



شکل ۳- الکتروفورگرام حاصل از عمل الکتروفورز SDS-PAGE بعد از انجام کروماتوگرافی آنیونی. نمونه سمت راست مربوط به مارکر وزن مولکولی است.



شکل ۵- نمودار تعیین pH بهینه آنزیم پلی فنل اکسیداز بادام زمینی

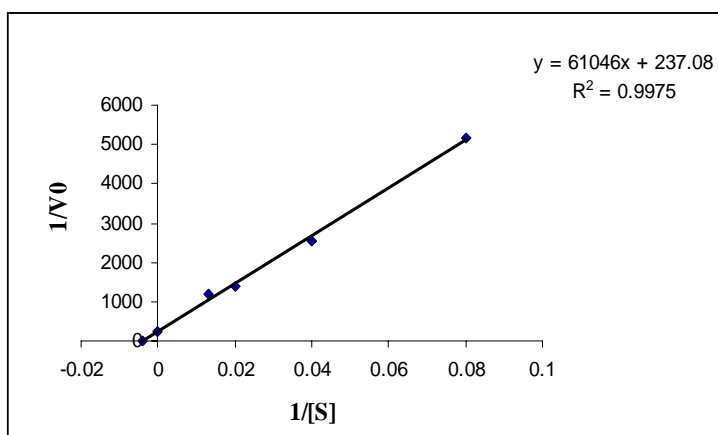


شکل ۴- نمودار اثر دما بر آنزیم پلی فنل اکسیداز

$$K_m = 257.5 \text{ mmol}$$

$$V_{max} = 0.00421 \text{ mmol/min}$$

پارامترهای سینتیکی، K_m و V_{max} برای آنزیم پلی فنل اکسیداز بادام با استفاده از نمودار لاینویور برک (شکل ۶) به دست آمدند که عبارت بودند از:



شکل ۶- نمودار لینویور برک فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

نتیجه گیری و بحث

بیشتری داشته باشد، محکم تر به ماتریکس متصل می شود و برای جدا شدن آن به درصد بالاتری از بافر B نیاز است. از طرفی، سنجش آنزیمی در فراکشن سوم نشان داد که این قسمت فاقد فعالیت پلی فنل اکسیدازی بود. در مرحله بعد، فراکشن دوم حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز توسط روش اولترافیلتراسیون با میکروتیوب سنتریگون که فقط پروتئین هایی با وزن ملکولی ۳۰ کیلو دالتون را از خود عبور می داد، تغلیظ شد. سپس از هر دو نمونه بالا و پایین صافی سنجش فعالیت آنزیمی صورت گرفت و مشخص شد تنها محلول روی صافی فعالیت پلی فنل اکسیدازی دارد و بنابراین، از آن برای مراحل بعدی استفاده شد.

به منظور مشاهده حضور پلی فنل اکسیداز، الکتروفورز ژل پلی آکرلامید PAGE در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد و پس از اتمام الکتروفورز، ژل در مجاورت سوپسترا قرار گرفت و در نهایت، باندهای پروتئینی آن ظاهر شد. مارکر مورد استفاده تیروزیناز قارچ *Agaricus bisporus* با وزن ملکولی ۵۸ کیلو دالتون بود (شکل ۳). از آنجایی که آنزیم در فرم ساختمانی کامل خود با سوپسترا واکنش می دهد، بنابراین وجود دو باند در ژل ممکن است

بر اساس بررسی های انجام شده، با آن که آنزیم تایروزیناز از برخی میوه ها و سبزی ها جدا سازی و تخلیص شده (Rast *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 1995; Marcio and Fabricio, 2008) ولی تاکنون در مورد پلی فنل اکسیداز بادام زمینی گزارشی موجود نبود. در این تحقیق، نتایج خالص سازی پروتئین با FPLC با استفاده از دتکتور ماورای بنفش ۳ فراکشن جداسازی شد. هر کدام از این پیک ها مربوط به پروتئین هایی هستند که در حدود درصد های خاصی از بافر B از ستون جدا شده اند. در فراکشن های جمع آوری شده سنجش فعالیت آنزیمی تایروزیناز به عمل آمد. در فراکشن های ۱ و ۲ فعالیت پلی فنل اکسیدازی مشاهده شد. فراکشن اول در ناحیه با گرادیان صفر بافر B قرار دارد که آنزیم این ناحیه با ستون اتصال برقرار نکرده است، بنابراین، در فراکشن دوم آنزیم جداسازی شده است و از آنجایی که در این فراکشن درصد بافر نمکی کم بوده است، بنابراین، نتیجه می شود که بار منفی روی سطح پروتئین ناچیز بوده است، زیرا با توجه به جنس ماتریکس، هر چه پروتئین مورد نظر بار منفی

از طرفی، pH بهینه آنزیم استخراج شده از بادام‌زمینی در حدود ۵/۲ تعیین گردید (شکل ۵). این نوع رفتار در مقابل pH در مقایسه با برخی تایروزینازهای گیاهی گزارش، اندکی تفاوت دارد. برای مثال، pH بهینه آنزیم پلی فنل اکسیداز گوجه فرنگی در محدوده کمی قلیایی است (Thipyapong and Steffen, 1997). از طرفی، آنزیم پلی فنل اکسیداز در نوعی لوبیا به نام *Vanilla bean* دارای pH بهینه در محدوده قلیایی (حدود ۸-۱۰) است (Waliszewski, et al., 2009)، ولی چنانکه ملاحظه می‌شود، pH بهینه آنزیم استخراج شده از بادام‌زمینی در محدوده اسیدی است که دال بر فعالیت بیشتر آنزیم در محیط‌های اندکی اسیدی در مقایسه با محیط‌های قلیایی است. این رفتار را می‌توان تا حدی بر اساس تغییر ماهیت ساختمان پروتئینی آنزیم در نواحی نزدیک به جایگاه فعال توجیه نمود. با توجه به شکل ۵ ملاحظه می‌شود که آنزیم تایروزیناز بادام‌زمینی در محیط‌های اندکی قلیایی تا قلیایی متوسط (pHهای ۲/۷ تا ۱۰) حدود ۶۰٪ فعالیت خود را از دست داده است و این در حالی است که در محیط اسیدی (pHهای ۴ تا ۵) بیش از ۸۰٪ فعالیت آنزیمی خود را حفظ نموده است. حفظ درصد بیشتری از فعالیت بیولوژیک آنزیم در محیط‌های اسیدی در مقایسه با محیط‌های قلیایی، می‌تواند نشان‌دهنده تغییرات ساختمانی در اطراف جایگاه فعال آنزیم در محیط‌های قلیایی و مقاومت در مقابل محیط اسیدی باشد. مقادیر دما و pH بهینه یک آنزیم می‌توانند معیار مناسبی برای سنجش پایداری و یا حساسیت آن بوده، در نتیجه، تصمیم‌گیری در مورد کاربردهای طبیعی و صنعتی آن جنبه‌های علمی تری پیدا خواهند نمود.

مطالعات سینتیکی نشان داد که در غلظت‌های متفاوت سوبسترای دوپامین هیدروکلراید میزان Km و Vmax برای

نشان دهنده حضور دو ایزوform مختلف آنزیم پلی فنل اکسیداز در بادام‌زمینی باشد. موقعیت باندهای ظاهر شده بالاتر از باندهای مربوط به تایروزیناز قارچ است. بنابر این، وزن ملکولی تایروزیناز استخراج شده از بادام‌زمینی شمال کشور، اندکی بیشتر از ۵۸ کیلودالتون است. برای تعیین دقیقتر وزن مولکولی آنزیم استخراج شده، در مرحله بعدی الکتروفورز SDS-PAGE از این نمونه‌ها در حضور بافر نمونه‌های احیایی و غیر احیایی انجام گرفت و با روش کوماسی بلو شد. در اثر الکتروفورز PAGE حاصل جایگاه باندهای آنزیم پلی فنل اکسیداز مشخص است (شکل ۳). چنانکه در این شکل ملاحظه می‌گردد، باندهای هم‌ردیف مارکر با وزن ملکولی ۶۶/۲ کیلو دالتون متعلق به آنزیم پلی فنل اکسیداز بادام‌زمینی هستند. وزن مولکولی تایروزیناز استخراج و تخلیص شده از انواعی قارچ به نام *Portabella mushrooms* حدود ۷۰ کیلو دالتون گزارش شده است که اندکی بیشتر از آنزیم بادام‌زمینی است (Fan and Flurkey, 2004).

دمای بهینه فعالیت برای این آنزیم ۴۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (شکل ۴)، این مقدار مشابه با دمای بهینه آنزیم‌های تایروزیناز گیاهی، مانند توتون (Sariri et al., 2007) و یا هلو (Wong, et al. 1971)، گلابی (Espin et al., 2001) و سیب (Rocha and Morais, 2001) است. شکل ۴ نشان می‌دهد که دمای ۳۰-۵۰ درجه بهترین محدوده دمایی برای فعالیت آنزیم است و از طرفی، آنزیم تایروزیناز بادام‌زمینی در دماهای پایین تر از دمای بهینه در مقایسه با دماهای بالاتر از دمای بهینه فعالیت بیشتری نشان می‌دهد؛ به طوری که در دمای حدود ۷۰ درجه سانتی‌گراد فعالیت آن تا حدود ۵۰٪ کاهش می‌یابد.

کاهش اندکی در کیفیت غذایی و ارزش‌های آنتی‌اکسیدانتی آن می‌گردد. چنین تغییراتی تحت شرایط موجود فرآوری مواد غذایی و در علوم تغذیه‌ای تا حدی اجتناب‌ناپذیر است و بهترین نظارت در این مورد، نمونه‌برداری و کنترل کیفیت محصول بسته‌بندی شده است. از طرفی، مطالعات مشابه در مورد مقایسه فعالیت و سینتیک بادام زمینی تازه و یک یا دو سال کهنه شده نیز انجام شد که نتایج جالب توجهی در جهت اثر گذشت زمان روی فاکتورهای مختلف آنزیم روشن کرد. تحقیق مذکور راه تازه‌ای برای استفاده صنعتی و تحقیقاتی از بادام‌های تاریخ گذشته و ارزان قیمت پیشنهاد می‌کند و نتایج آن به زودی منتشر خواهد شد.

تشکر و قدردانی

همکاری مؤثر دانشگاه پیام نور تهران و دانشگاه گیلان شایان تشکر و قدردانی است.

آنزیم پلی فنل اکسیداز به ترتیب $257/5$ mmol و $0/0421$ mmol/min محاسبه شد (شکل ۶).

در یک سری تحقیقات موازی، از دانه تفت داده بادام زمینی نیز توسط نیتروژن مایع عمل استخراج انجام گرفت و سپس مانند حالت قبل مورد سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز قرار گرفت، ولی این بار هیچ فعالیتی مشاهده نشد که نشان‌دهنده غیر فعال شدن پلی فنل اکسیداز در طی فرآیند به عمل آوری بادام زمینی است. بررسی‌های محلی نشان‌دهنده این واقعیت بودند که عمل فرآوری (تفت دادن) بادام زمینی در مرحله روی شن‌های داغ با دمای حدود 400 درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرد. قرار گرفتن محصول بادام زمینی حدود 6 ساعت در چنین شرایطی به احتمال زیاد سبب تغییر ماهیت بسیاری از پروتئین‌ها و کاهش و از بین رفتن فعالیت برخی آنزیم‌ها می‌گردد. در هر صورت، مانند بسیاری از اعمال فرآوری مواد غذایی، عمل تفت دادن این محصول با ارزش موجب مناسب‌تر شدن و بازار پسندتر شدن محصول و به بهای

منابع

- Chemistry 47:3518-3525.
- Espin, J. C., Van Leeuwen, J. and Wichers, H. J. (1999) Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 3509-3517.
- Espin, J. C., Soler-Rivas, S., Wichers, H. J. (2000a) Maturation and activation of latent tyrosinase from *Agaricus bisporus*. International Society Mushroom Science Proceeding. May 15-19.
- Fan, Y. and Flurkey, W. H. (2004) Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. Phytochemistry 65: 671-676.
- Fraignier, M. P., Marques, L., Fleuriet, A. and Chen, Q. X., Liu, X. D. and Huang, H. (2003) Inactivation kinetics of Mushroom tyrosinase in the dimethyl sulfoxide solution. Biochemistry (Moscow) 68(6): 644-649.
- Del Marmol, V. and Beermann, F. (1996) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. FEBS Letters 38:165-168.
- Espin, J. C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J. and Gracia-Canovas, F. (1997) Monophenolase activity of polyphenol oxidase from blanquilla pear. Phytochemistry 44 (1): 17-22.
- Espin, J. C. and Wichers, H. J. (1999) Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium doceyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. Journal of Agricultural and Food

- polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2058-2063.
- Matheis, G. and Belitz, H. D. (1977) Studies on enzymic browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*) III. Kinetics of Potato Phenoloxidase. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und -Forschung A*. 163: 191 - 195.
- Miller, E. R. (1929) The insoluble tyrosinase of the Velvet bean seed coat. *Plant Physiology* 4(4): 507-517.
- Nakamura, T., Sho S. and Ogura Y. (1966) On the purification and properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biochemistry* 59 (5): 481-486.
- Paul, B. and Gowda, L. R. (2000) Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48(9): 3839-3846.
- Rast, D. M., Baumgartner, D., Mayer, C. and Hollenstein, G. O. (2003) Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry* 64: 339-366.
- Rocha, A. M. C. N. and Morais, A. M. M. B. (2001) Characterization of polyphenol oxidase extracted from 'Jonagored' apple. *Food Control* 12(2): 85-90.
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., Cabanes, J. and García-Carmona, F. (1988) Characterization of cresolase and catecholase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 27:319-321.
- Sariri, R., Mozafarzadeh, Z. and Jafarian, V. (2008) Extraction, purification and characterization of polyphenol oxidase from tobacco leaves grown in north of Iran. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 2(2): 337-342.
- Scotter, A. J., Kuntz, D. A., Saul, M., Graham, L. A., Davies P. L. and Rose D. R. (2006) Expression and purification of sea raven type II antifreeze protein from *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Protein Expression and Purification* 47: 374-383.
- Strothkamp, K. G., Lolley, R. L. and Manson, H. S. (1976) Quaternary Structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical Biophysical Research*
- Macheix, J. J. (1995) Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2375-2380.
- Friedman, M. E. and Daron, H. H. (1977) Tyrosinase: An introductory experiment with enzymes. *Journal of Chemical Education* 4: 56.
- Garcia Borrón, J. C., Solano, F., Iborra J. L. and Lozano, J. A. (1985) Aggregation equilibria of tyrosinase of Harding-Passey mouse melanoma. *Biochemical Journal* 228: 95-101.
- Garcia-Borrón, J. and Solano, F. (2002) Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Research* 15:162-173.
- Hsu, C. K., Chang, C. T., Lu, H. Y. and Chung, Y. C. (2007) Inhibitory effects of water extracts of *Lavendula* sp. on Mushroom tyrosinase activity. *Food Chemistry* 105: 1099-1105.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H. J. and Pellon, G. (1998) *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycological Research* 102: 1459-1483.
- Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. H. and Halaban R. (1987) Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proceedings of National Academy of Science* 84 (21): 7473-7477.
- Lou, H., Yuan, H., Ma, B., Ren, D., Ji, M. and Oka, S. (2004) Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. *Phytochemistry* 65(16): 2391-2399.
- Marcio, S. T., and Fabricio P. (2008) A wounding-induced PPO from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48 (9): 3839-3846.
- Marques, L., Fleuriet, A. and Machiex, J. J. (1995) Characterization of multiple forms of polyphenol-oxidase from apple fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* 33:193-200.
- Nunez-Delicado, E., Sojo, M. M., Garcia-Carmona, F. and Sanchez-Ferrer, A. (2003) Partial purification of latent persimmon fruit

Communication 70: 519-524.

Thipyapong, P. and Steffen, J. C. (1997) Tomato polyphenol oxidase: Differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiology* 115(2): 409-418.

Van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H. and Wichers, H. J. (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45:1309-1323.

Waliszewski, K. N., Marquez, O. and Pardo, V. T. (2009) Quantification and characterization of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry* 117(2): 196-203.

Wong, T. C., Luh, B. S. and Whitaker, J. R. (1971) Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of clingstone peach. *Plant Physiology* 48(1): 19-23.

Mayer, A. M. and Staples, R. C. (2002) Laccase: New function for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.

Archive of SID

Extraction and characterization of tyrosinase from peanut grown in north of Iran

Masoumeh Faridi,^{1*} Reyhaneh Sariri, Vahab Jafarian and ² Habiolah Nazem

^{1*} Department of Biology, Tehran Payame Noor University, Tehran, Iran

² Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

Abstract

Formation of brownish yellow pigments in damaged fruits and vegetables by tyrosinase enzyme is one of the main causes of their quality loss. Tyrosinase is a metalloprotein and is used in researches, regarding food, pharmacology and cosmetics. Peanut is one of the most important strategic agricultural products of northern Iran. In a general survey from the local farmers and producers, it was found that many of older peanuts lose their market and are reduced in quality and price when the new crop product is entered into the market. Considering the experience and the expertise within our group on tyrosinase extraction and characterization, the aim of this research was focused on peanut tyrosinase. Peanut was grounded in liquid nitrogen, followed by precipitation by ammonium sulphate and dialysis. Electrophoresis showed the presence of two possible isozymes. Enzyme activity was determined during various stages of purification. Some important physical properties of the enzymes were also measured. It was shown that the optimum pH for peanut tyrosinase was 5.2 and that optimum temperature was 40 °C. Kinetics studies determined the Michaelis-Menton constants, i.e. $K_m = 257.5$ mmol and $V_{max} = 0.00421$ mmol/min. The ultimate goal of this research was to investigate the possibility of replacing peanut tyrosinase for mushroom tyrosinase in various industrial and research applications.

Key words: Extraction, Purification, Tyrosinase, Michaelis constants

* Corresponding Author: sariri@guilan.ac.ir