بازدارندگي تركيب‌هاي ان ـ بوتيل، ان ـ هگزيل و ان ـ اكتيل دي تيوكاربامات و برخي اسيدي‌هاي خطي روي فعاليت آنزيم تايروزيناز قارچ خوراكي

نعمت اله غيبي+*

قزوين، دانشگاه علوم پزشكي قزوين، دانشكده پزشكي، گروه فيزيولوژي و فيزيک پزشكي

علي اكبر صبوري

تهران، دانشگاه تهران، مركز تحقيقات بيوشيمي و بيوفيزيک، گروه بيوفيزيک

چكيده: اثر بازدارندگي سه تركيب ان ـ بوتيل (I)، ان ـ هگزيل (II) و ان ـ اكتيل (III) دي‌تيوكاربامات روي دو فعاليت كاتكولازي و كرزولازي آنزيم تايروزيناز با منشأ قارچ خوراكي مورد بررسي قرار گرفت. بازدارندگي اين تركيب‌ها در واكنش كاتكولازي از نوع مختلط بوده و ثابت بازدارندگي اين تركيب‌ها به ترتيب ۹/٤، ۱۵/۱ و ۲۸/٥ ميكرومولار و مقدارهاي فاكتور برهمكنش بين سوبسترا و بازدارنده (α) به‌ترتيب ۲/۸، ٤/ ٥ و ٤/٦ به دست آمد. عملكرد بخش كربوكسيليك اسيدها روي فعاليت‌هاي كاتكولازي و كرزولازي آنزيم در مجاورت برخي از اسيدهاي آليفاتيک انجام گرفت. بيشترين فعاليت كاتكولازي آنزيم در مجاورت اسيدهاي پيروييك، اكريليك، پروپانوييك، ۲ـ اكسوبوتانوييك و ۲ـ اكسواكتانوييك به‌ترتيب در غلظت‌هاي ۱، ۱/۲۵، ۲، ۲/۲ و ۳ ميلي‌مولار به‌دست آمد. اسيدهاي مذكور در واكنش‌هاي كرزولازي، اثر بازدارندگي از خود نشان دادند. پروپانوييك اسيد داراي الگوي بازدارندگي ضد رقابتي است (K_i = ۰/۱۴). اما در اسيدهاي پيروييك، اكريليك، ۲ـ اكسوبوتانوييك و ۲ـ اكسواكتانوييك اسيد بازدارندگي از نوع رقابتي است. ثابت بازدارندگي (K_i) اين چهار اسيد به‌ترتيب ۰/۳٦، ۰/۷٥، ۳/٦ و ٤/٥ ميلي مولار به‌دست آمد.

واژه‌هاي كليدي: تايروزيناز قارچي، بازدارندگي، دي تيوكاربامات‌ها، اسيدهاي كربوكسيليک خطي.

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

مقدمه

در سي سال اخير آنزيم تايروزيناز (پلي فنل اكسيداز: EC 1.14.18.1) به عنوان يك نمونه مناسب جهت بررسي طيف وسيعي از موضوع‌هاي علمي مورد توجه فراوان قرار گرفته است. نخستين مطالعه‌هاي بيوشيميايي در اين خصوص به سال ۱۸۹۵ ميلادي برمي‌گردد كه قارچ خوراكي آسيب‌ديده هنگامي كه در معرض هوا قرار مي‌گرفت سياه مي‌شد [۱]. مطالعه‌هاي زيادي براي يافتن علت تغيير رنگ در سطوح متفاوت حيات از سطوح پايين تا موجودهاي عالي‌تر انجام گرفته است [٦ ـ ۲] ، بدان علت كه

---

*عهده دار مكاتبات

+E-mail :gheibi_n@yahoo.com

اين تغيير مربوط به بازدارنده‌هاي درون‌زاد است، رديابي آن در برخي موارد امكان‌پذير نيست [۷،۸]. آنزيم مربوط به اين تغييرهاي رنگ بعدها تايروزيناز نام گرفت كه داراي يك موضع فعال حاوي دو اتم مس در قارچ خوراكي متداول و هم چنين در تايروزيناز ملانوماي بدخيم انساني است [۱۰،۹]. در گياهان عالي‌تر و قارچ‌ها، تايروزيناز در ايزوفرم‌هاي متنوع از جمله نوع نابالغ، بالغ نهفته و فرم فعال يافت مي‌شود [۱۲،۱۱].

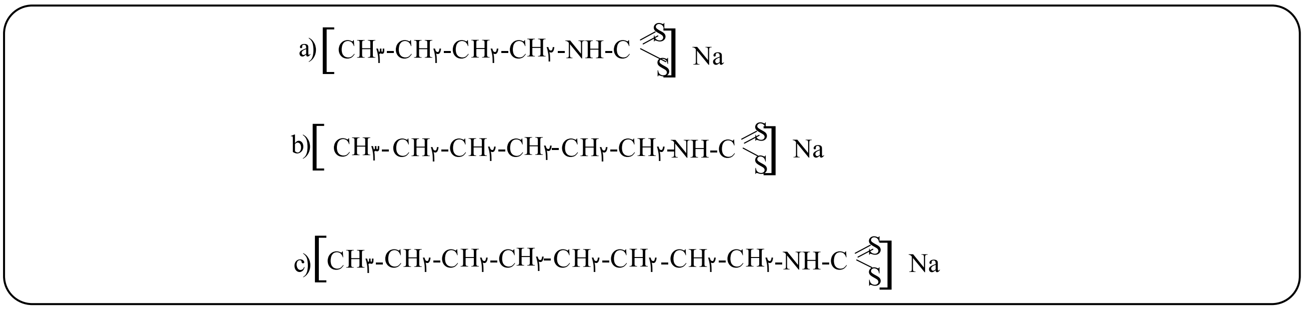
مطالعه‌هاي اوليه تايروزيناز از قارچ خوراكي متداول گونه Agaricus bisporus نشان مي‌دهد كه آنزيم داراي وزن مولكولي ۱۱۰ تا ۱۳۰ هزار دالتون است [۱۳]، همچنين آنزيم به‌عنوان يك پروتئين تترامر مركب از زيرواحدهاي يكسان كاتاليتيكي ۳۲ هزار دالتوني است. در دهه ۱۹۷۰ ميلادي، ساختار تترامريك حاوي دو زيرواحد ۴۳ هزار دالتوني (H) و دو واحد ۱۳هزار دالتوني (L) بيان شد [۱۴]. ساختار چهارم آنزيم به‌صورت تترامريك H_2L_2 با وزن مولكولي به تقريب ۱۱۰ هزار دالتون و حاوي چهار اتم مس است [۱۵].

اگرچه ۹۸ تا ۹۹ درصد تايروزيناز در قارچ به حالت نهفته وجود دارد ولي مقدار اندك آنزيم فعال، پتانسيل سياه‌كردن قارچ در طي بلوغ يا آسيب هنگام برداشت را دارد. اين پديده باعث خسارت‌هاي اقتصادي به صنايع توليد قارچ مي‌شود و به اين لحاظ بازدارندگي آنزيم اهميت مي‌يابد. رايج‌ترين بازدارنده براي جلوگيري از سياه‌شدن، سولفيت است [۱۶] ، افزون بر اين بازدارنده‌هاي تايروزيناز ممكن است براي درمان برخي اختلال‌هاي پوستي كه همراه با توليد بيش از حد ملانين هستند به كار رود. هم چنين استفاده از بازدارنده‌هاي تايروزيناز در مواد آرايشي با خاصيت سفيدكنندگي پوست امكان‌پذير است [۱۹ ـ ۱۷]. بنابراين، نياز براي مشخص‌كردن تركيب‌هايي كه بازدارنده فعاليت تايروزيناز هستند وجود دارد. برخي از بازدارنده‌هاي پلي فنلي قوي تايروزيناز مثل Kaempferol [۲۲ ـ ۲۰]، Querction [۲۳و۲۴]، Kurarinone و Kushnol [۲۵] از گياهان گوناگون استخراج شده‌اند. پژوهش‌هاي بسيار زيادي توسط *كوبو*(۱) و *همكارانش* براي شناسايي بازدارنده‌هاي طبيعي و ارتباط بين فعاليت و توان بازدارندگي آن‌ها با ساختار اين تركيب‌ها انجام شده است [۲۶]. اين پژوهش‌ها نشان داده است همه فلاوونوييدها بازدارندگي خود را بر روي آنزيم از راه توانايي شلاته‌كردن مس در جايگاه فعال آنزيم اعمال مي‌كنند. در عين حال اين شرط وقتي برقرار است كه گروه ۳ـ هيدروكسي، آزاد باشد. هم چنين اين پژوهشگران نشان داده‌اند كه گروه ۳ـ هيدروكسي يك نياز ضروري براي بازدارندگي آنزيم نيست. چنان كه برخي فلاوونوييدها مانند luteolin 4'-o-glucoside و 7-o-glucoside فاقد گروه ۳ـ هيدروكسي هستند اما در عين حال ويژگي‌هاي بازدارندگي از خود نشان مي‌دهند [۲۱]. در سال‌هاي اخير نشان داده شده است فلاوونوييدهايي كه داراي گروه α- كتو هستند ويژگي‌هاي بازدارندگي قوي از خود نشان مي‌دهند [۲۷]. يك تركيب مهم ديگر اين گروه گاليك اسيد است كه به صورت استر با D– گلوكز وجود دارد و استرهاي آن به فراواني در افزاينده‌ها در صنايع غذايي به‌كار مي‌رود. گاليك اسيدهاي گوناگون و مشتقات آن‌ها از چاي [۲۸] و Galla rhois [۲۹] استخراج شده‌اند و برخي از آن‌ها به عنوان بازدارنده‌هاي قوي تايروزيناز محسوب مي‌شوند. از طرفي مطالعه‌هاي ديگر نشان داده‌اند، كه قدرت بازدارندگي كربوكسيليك اسيدهاي آروماتيك با استري كردن، هيدروكسيل كردن و متيل كردن حلقه بنزني كاهش مي‌يابد [۳۱،۳۰].

نتيجه‌هاي مطالعه‌هاي ما در اين پژوهش يك نوع جديد از بازدارنده‌هاي طبيعي تايروزيناز را مشخص مي‌كند كه كاربرد اين تركيب‌ها در آينده براي درمان هايپرپيگمنتاسيون، درمان برخي اختلال‌هاي پوستي يا در طراحي مواد آرايشي با خاصيت سفيدكنندگي پوست در كلينيك و نيز طراحي بازدارنده‌هاي جديد براي جلوگيري از قهوه‌اي شدن گياهان به ما كمك خواهد كرد. لذا ابتدا اثر بازدارندگي تركيب‌هاي دي تيوكارباماتي سنتز شده به‌صورت نمك‌هاي سديم، شامل ان ـ بوتيل دي تيو كاربامات (I)، ان ـ هگزيل دي تيوكاربامات (II) و ان ـ اكتيل دي تيوكاربامات (III) با در نظر گرفتن دم آليفاتيك متغير (C_8,C_6,C_4) و سر قطبي يكسان آن‌ها (شكل ۱)، در دو واكنش كاتكولازي و كرزولازي بررسي مي‌شوند. سپس جهت شناخت اثر بخش كربوكسيليك اسيدهاي پيروئيك، آكريليك، پروپانوييك، ۲ـ اكسوبوتانوييك و ۲ـ اكسواكتانوييك (شكل ۲)، و تأكيد بر اثر بخش‌هاي غير اشباع آن‌ها روي فعاليت آنزيم تايروزيناز، دو فعاليت كاتكولاز و كرزولازي آنزيم به ترتيب با استفاده از سوبستراهاي MeBACat و MePAPh در مجاورت غلظت‌هاي متفاوت اسيد مورد بررسي قرار مي‌گيرند.

---

(۱) Kubo



a) $[CH_{۳}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}NH\text{-}C(=S)S]\,Na$

b) $[CH_{۳}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}NH\text{-}C(=S)S]\,Na$

c) $[CH_{۳}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}NH\text{-}C(=S)S]\,Na$

شكل ١ـ فرمول باز شده تركيب‌هاي دي تيوكارباماتي ان ـ بوتيل دي تيو كاربامات **(a)** ، ان ـ هگزيل دي تيوكاربامات **(b)** و ان ـ اكتيل دي تيوكاربامات **(c)**.

Pyruvic acid	$CH_{۳}\text{-}CO\text{-}COOH$
Acrylic acid	$CH_{۲}\text{=}CH\text{-}COOH$
Propanoic acid	$CH_{۳}\text{-}CH_{۲}\text{-}COOH$
2-Oxo-butanoic acid	$CH_{۳}\text{-}CH\text{=}C(OH)\text{-}COOH$
2-Oxo-octanoic acid	$CH_{۳}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH_{۲}\text{-}CH\text{=}C(OH)\text{-}COOH$

شكل٢ـ فرمول باز شيميايي اسيدهاي به كار گرفته شده در مطالعه.

بخش تجربي

مواد

تايروزيناز قارچ خوراكي (كد آنزيمي:١٤،١٨،١،١) با وزن مولكولي Mw = ١٢٠ KD جامد و با فعاليت ويژه ٣٤٠٠ واحد بر ميلي‌گرم خريداري از سيگما (T-٧٧٥٥). تركيب‌هاي ان ـ بوتيل دي تيو كاربامات (I)، ان ـ هگزيل دي تيوكاربامات (II) ، ان ـ اكتيل دي تيوكاربامات (III)، (٤ـ متيل فنيل) آزو) ـ فنل (MePAPh) و ٤ـ [(٤ـ متيل بنزو) آزو] ١ و ٢ـ بنزن دي اُل (MeBACat) توسط اين گروه سنتز شدند. اسيدهاي پيرويك اسيد، آكريليك اسيد،پروپانوييك اسيد، بوتانوييك اسيد، ٢ـ اكسوبوتانوييك اسيد و ٢ـ اكسواكتانوييك اسـيد، $Na_{۲}HPO_{۴}$ و $NaH_{۲}PO_{۴}$ براي تهيه تامپون فسفات، پاراكوماريك اسيد و كافئيك اسيد همگي با خلوص بالا از فراورده‌هاي مرك، خريداري شدند.

سنجش فعاليت آنزيم در مجاورت بازدارنده‌هاي دي تيوكارباماتي

سنجش سنتيكي واكنش‌هاي كاتكولازي و كرزولازي در آزمايش‌ها مهار به كمك دستگاه اسپكتروفتومتر Cary مدل Bio 100 صورت گرفت. در آزمايش‌ها از غلظت‌هاي تازه سوبسترا، بازدارنده و آنزيم استفاده شد. تمام واكنش‌هاي آنزيمي در تامپون فسفات ١٠ ميلي مولار در pH= ٦/٨ در كووت‌هاي يك سي‌سي كوارتـز و بـه كمك سامانه‌ي تنظيم حـرارتي در دمـاي ٢٩٣ كلوين انجام شد.

مهار تايروزيناز به وسيله تركيب‌هاي بازدارنده دي تيوكارباماتي در سه تركيب ان ـ بوتيل (I)، ان ـ هگزيل (II) و ان ـ اكتيل (III) دي‌تيوكاربامات به كمك سوبستراي كافئيك اسيد در واكنش كاتكولازي و پاراكومـاريك اسيـد در واكنش‌هـاي كـرزولازي صورت پذيرفت.

فعاليت كاتكولازي با برداشت سوبستراي كافئيك اسيد در بيشترين طول موج آن يعني ٣١١ نانومتر، زمان ٢ دقيقه و با غلظت آنزيمي ١١/٨ ميكرومولار يا ٤٠ واحد آنزيمي در ميلي‌ليتر صورت گرفت. فعاليت كرزولازي نيز با برداشت پاراكوماريك اسيد در بيشترين طول موجش يعني ٢٨٨ نانومتر، زمان ١٠ دقيقه و غلظت آنزيمي ١٧/٧ ميكرومولار يا ٦٠ واحد آنزيمي در ميلي‌ليتر سنجش شد.

سنجش فعاليت آنزيم در مجاورت اسيدهاي كربوكسيليك

واكنش‌هاي كاتكولازي و كرزولازي در مجاورت سوبستراهاي 4-[4- Methylphenyl) azo] phenol (MePAPh) و 4-[(4-methylphenyl) azo]-1,2- benzenediol (MePACat) به‌ترتيب در طول موج‌هاي ٣٥٢و ٣٦٤ نانومتر و در بازه‌هاي زماني ١٠ و ٢ دقيقه در تامپون فسفات با pH= ٦/٨ و دماي ٢٩٣ كلوين انجام شد. غلظت آنزيم ١١/٨ ميكرومولار يا ۴٠ واحد در ميلي‌ليتر در واكنش كاتكولاز و ٧٠/٨ ميكرومولار يا ٢۴٠ واحد در ميلي‌ليتر در واكنش كرزولاز استفاده شد.

فعاليت‌هـاي كاتكولاز و كرزولاز آنزيـم در مجاورت اسيدهاي

كربوكسيليك، پيروييك اسيد، آكريليك اسيد، پروپانوييك اسيد، ۲ـ اكسو ـ بوتانوييك اسيد، ۲ـ اكسو ـ اكتانوييك اسيد انجام شد. فعاليت كاتكولازي با سوبستراي Me BACat با غلظت مشخص ۵۰ ميكرومولار و در غلظت‌هاي متفاوت اسيدهاي مذكور مورد بررسي قرار گرفت.

در واكنش‌هاي كرزولاز فرايند بازدارندگي آنزيم با سوبستراي Me PAPh در غلظت‌هاي متفاوت و نيز مجاورت اسيدهاي مذكور مورد آزمايش قرار گرفت.

نتيجه‌ها و بحث

اثر بازدارندگي تركيب‌هاي دي تيوكارباماتي سنتز شده به صورت نمك‌هاي سديم، شامل ان ـ بوتيل دي تيو كاربامات (I)، ان‌ـ‌هگزيل دي تيوكاربامات (II) و ان‌ـ‌اكتيل دي يوكاربامات (III) و اسيدهاي پيروييك، آكريليك، پروپانوييك، ۲ـ اكسوبوتانوييك و ۲ـ اكسواكتانوييك با در نظر گرفتن دم آليفاتيك و سر قطبي يكسان آن‌ها در دو واكنش كاتكولازي و كرزولازي آنزيم تايروزيناز با منشأ قارچ خوراكي بررسي شدند.

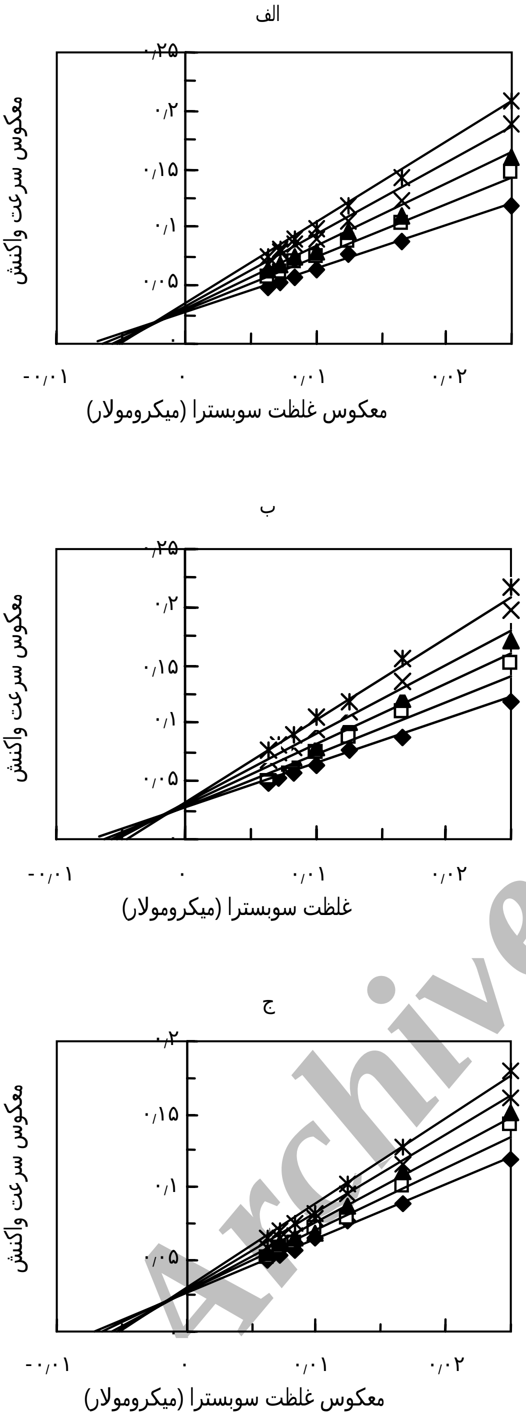
در شكل ۳ (الف، ب و ج) منحني‌هاي جفت معكوس لاينوويربرك براي فعاليت كاتكولاز تايروزيناز در غلظت‌هاي ثابت مهاركننده‌هاي I، II و III در هر سري سوبسترا ترسيم شده است. اين منحني‌ها خطوطي را نشان مي‌دهند كه در سمت چپ محور عمودي همديگر را قطع كرده‌اند و مدل مختلط را براي مهار بيان مي‌كنند.

مقدارهاي سرعت بيشينه‌ي ظاهري (V'_{max})، ثابت ميكائيليس ظاهري (K'_m) و همچنين شيب اين خطها (K'_m/V_{max}) را مي‌توان در غلظت ثابت هر كدام از مهاركننده‌ها به دست آورد. منحني‌هاي ثانويه شيب را در برابر غلظت مهاركننده در شكل ۴ (الف، ب و ج) نشان مي‌دهند.

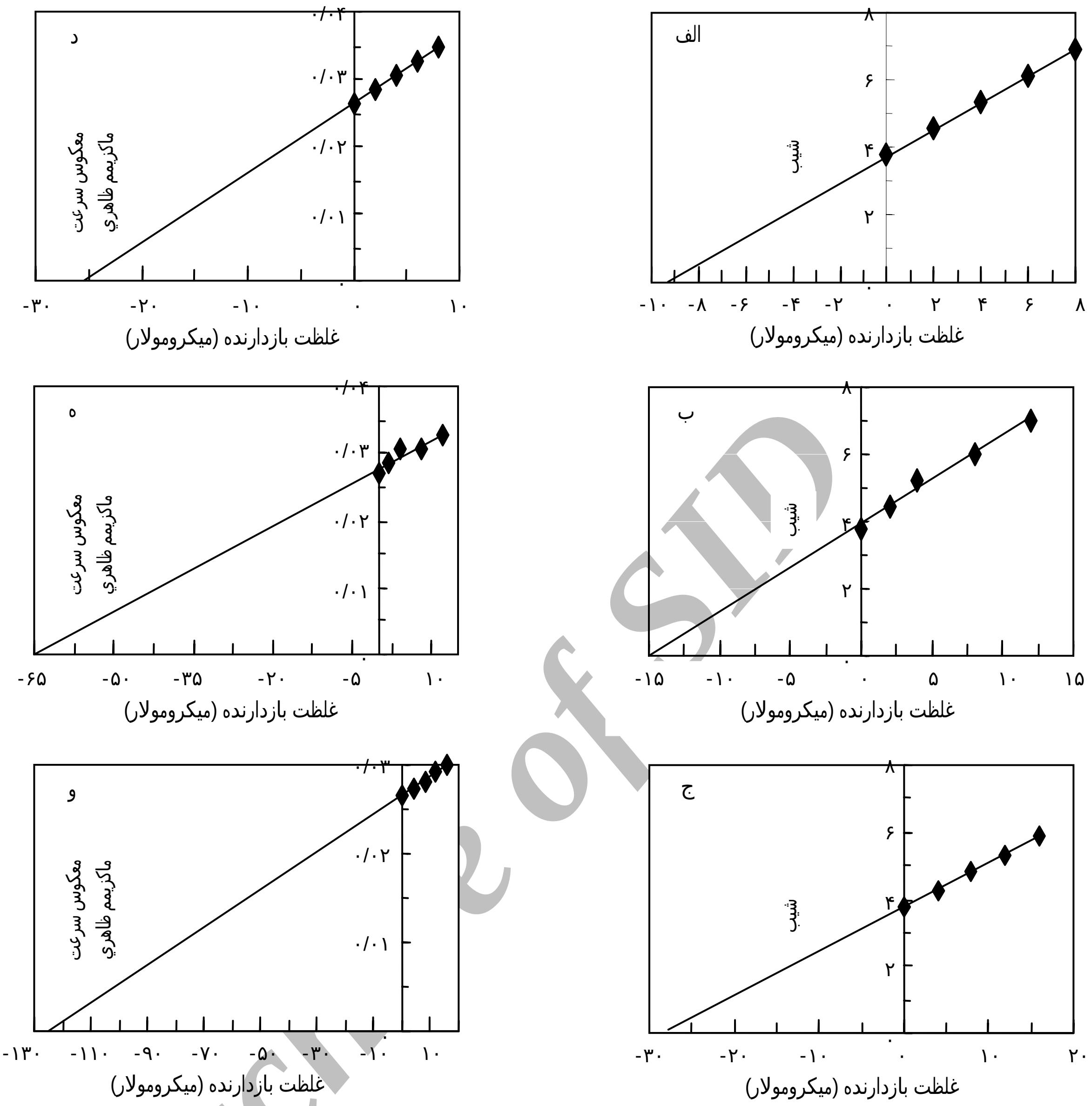
طول از مبدأ اين منحني‌ها $-K_i$ را نشان مي‌دهد. منحني‌هاي ثانويه ديگر يعني ($1/V'_{max}$) در برابر غلظت مهاركننده در شكل ۴ (د، ه، و) ترسيم شده‌اند.

طول از مبدأ اين منحني‌ها نيز $-\alpha K_i$ را نشان مي‌دهد. K_i ثابت مهاركنندگي و α فاكتور برهم كنش بين سوبسترا و مهاركننده است. مقدارهاي K_i و α براي مهاركننده‌هاي I، II و III در جدول ۱ خلاصه شده است.

منحني‌هاي جفت معكوس لاينوويربرك براي فعاليت كرزولازي در مجاورت مهاركننده‌هاي I، II و III در شكل ۵ (الف، ب و ج)



شكل ۳ـ منحني‌هاي جفت معكوس لاينوويربرك براي فعاليت كاتكولاز تايروزيناز در غلظت‌هاي ثابت مهاركننده در هر سري سوبسترا ترسيم شده است. غلظت هاي مهاركننده عبارت‌اند از (الف) براي I صفر(■)، ۲ (□)، ۴(▲) ، ۶ (X) ، ۸ (Ж) ميكرومولار (ب) براي II صفر(■)، ۲(□)، ۴(▲) ، ۶(X)، ۱۲(Ж) (ج) براي III صفر(■)، ۴(□)، ۸(▲) ، ۱۲(X)، ۱۶(Ж) ميكرومولار.



شکل ۴ـ منحني‌هاي ثانويه شيب نمودارهاي ۲ را در برابر غلظت مهارکننده **I** (الف)، **II** (ب) و **III** (ج) نشان مي‌دهند.
طول از مبدأ اين منحني‌ها $-K_i$ را نشان مي‌دهد. منحني‌هاي ثانويه ديگر يعني ($1/V'_{max}$) در برابر غلظت مهارکننده (د،ه،و) ترسيم شده‌اند.
طول از مبدأ اين منحني‌ها نيز αK_i - را نشان مي‌دهد. K_i ثابت مهارکنندگي و α فاکتور اندرکنش بين سوبسترا و مهارکننده است.

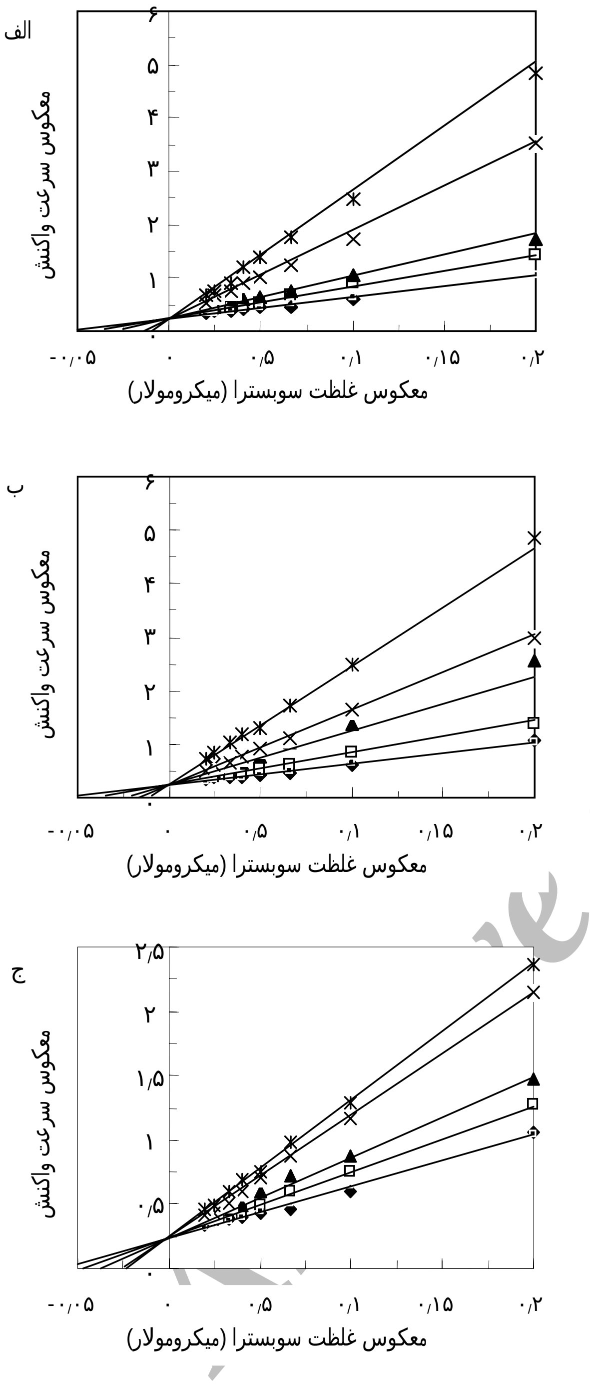
به‌ترتيب، ترسيم شده‌اند. اين نمودارها يك سري خط‌ها مستقيمي را نشان مي‌دهند که به‌طور دقيقي روي نمودار عمودي همديگر را قطع کرده‌اند. نمودارها نشان مي‌دهند که مقدار سرعت بيشينه با تغيير غلظت مهارکننده بدون تغيير، و مقدار K'_m افزايش يافته است، و اين تغييرها حاکي از مدل مهار رقابتي آنزيم هستند. شيب اين نمودارها در برابر غلظت مهارکننده به صورت منحني‌هاي ثانويه در شکل ٦ (الف، ب و ج) براي ترکيب‌هاي I، II و III به‌ترتيب ترسيم شده‌اند.

طول از مبدأ اين منحني‌هاي ثانويه مقدار ثابت مهار(K_i) را براي واکنش‌هاي کرزولازي نشان مي‌دهد. مقدارهاي K_i در جدول ۱ خلاصه شده‌اند. مقايسه بين مقدارهاي K_i در جدول ۱ با ساير مهارکننده‌هاي رايج تايروزيناز، آنها را در رديف قوي‌ترين مهارکننده‌هاي فعاليت‌هاي کرزولازي و کاتکولازي قرار مي‌دهد. اثر بازدارندگي در واکنش‌هاي کرزولازي بيشتر است و مقدارهاي K_i با افزايش طول دم آليفاتيك ترکيب‌ها، در هر دو فعاليت افزايش مي‌يابد که نشان از کاهش اثر مهارکنندگي است.

پيوند اين تركيب‌ها با مس در موضع فعال آنزيم مهار رقابتي آن‌ها در واكنش كرزولاز را نشان مي‌دهد. مدل مهار مختلط در واكنش‌هاي كاتكولازي نشان مي‌دهد كه مهاركننده مي‌تواند در مجاورت سوبسترا با آنزيم پيوند يابد، اما پيوند آن همراه با تعاوني منفي بين موضع‌ها است، α فاكتور اندركنش بين سوبسترا و مهاركننده است و با توجه به مقدارهاي آن در جدول ۱ كه بيشتر از يک به دست آمده است $(\alpha>1)$. در كاربرد اين تركيب‌ها تعاوني منفي براي پيوند سوبسترا و مهاركننده در موضع‌شان با افزايش دم آليفاتيك، افزايش مي‌يابد. مقدارهاي پايين α نشان از تمايل زياد سوبسترا يا مهاركننده به موضع فعال آنزيم است، اين تركيب‌ها مقدارهاي بالاي α از خود نشان دادند و با افزودن گروه‌هاي $-CH_2-$ به مهار كننده‌ها از ۲/۸ براي ان ـ بوتيل دي تيو كاربامات به ۴/۵ براي ان ـ هگزيل و ۴/۶ براي ان ـ اكتيل دي تيوكاربامات افزايش يافت كه اين افزايش α، كاهش تمايل مهاركننده و در مقابل تمايل بيشتر سوبسترا را به ترتيب نشان مي‌دهد.

بيشتر تركيب‌هاي تايولي اثر مهاركنندگي خود را با توانايي شلاته‌كردن Cu^{2+} اعمال مي‌كنند [۳۲]. تركيب‌هاي تيولي متعددي به عنوان مهار كننده تايروزيناز شناسايي شدند كه از آن جمله سيستئين، گلوتاتيون، متيمازول، دي اتيل دي تيوكاربامات و ۲ـ مركاپتوبنزوتيازول را مي‌توان نام برد [۳۷ـ۳۳]. اين تركيب‌ها مشابه تركيب‌هاي دي تيوكارباماتي در مطالعه‌ي كنوني، به دليل سمي بودن و وجود گروه گوگرد كاربرد تغذيه‌اي ندارند، ولي سولفيت در غلظت پايين به عنوان تركيب نگهدارنده در انبارهاي ميوه‌هايي چون سيب و موز به كار مي‌رود. در اين مطالعه‌ها تلاش مي‌شود تا با بررسي اين تركيب‌هاي شناخت مناسبي از ارتباط ساختار و عملكرد آنزيم تايروزيناز به دست آيد. ساير مطالعه‌هاي گروه ما روي تركيب بنزوتيول در pHهاي متفاوت و تركيب‌هاي گزانتات آليفاتيک با ساختاري مشابه همين تركيب‌هاي دي تيوكارباماتي روي واكنش‌هاي كاتكولازي و كرزولازي آنزيم تايروزيناز انجام گرفته است [۳۹،۳۸].

در اين تركيب‌هاي دي تيوكارباماتي، گروه -NH- جاي خود را به اكسيژن در گزانتات‌ها مي‌دهد. مقايسه تركيب‌هاي I، II و III با ساير مهاركننده‌هاي تايروزينازي حاوي گوگرد و نيز مدل مهار اين تركيب‌ها مي‌تواند حاكي از شلاته كردن مس در جايگاه فعال آنزيم باشد. سر قطبي اين تركيب‌هاي دهنده‌ي الكترون است كه روي Cu^{2+} با كوئوردينانس مناسب عمل مي‌كند.



شكل ۵ ـ منحني‌هاي جفت معكوس لاينوويربرك براي فعاليت كرزولاز تايروزيناز در غلظت‌هاي ثابت مهاركننده‌هاي I (الف) ، II (ب) و III (ج) در هر سري سوبسترا ترسيم شده است. غلظت هاي ثابت مهار مهاركننده‌عبارت‌انداز: (الف) براي I صفر(■)، ۰/۴(□) ، ۰/۸(▲) ، ۲/۵(X) ، ۴ (Ж) ميكرومولار (ب) براي II صفر(■)، ۰/۵(□) ، ۱/۵(▲) ، ۲/۵(X) ، ۴/۵(Ж) ميكرومولار (ج) براي III صفر(■)، ۰/۵(□) ، ۱ (▲) ، ۲/۵(X) ، ۳ (Ж) ميكرومولار.

جدول ۱ـ مقدارهاي ثابت مهار كنندگي تركيب‌هاي دي تيوكارباماتي در واكنش‌هاي كاتكولاز و كرزولاز تايروزيناز.

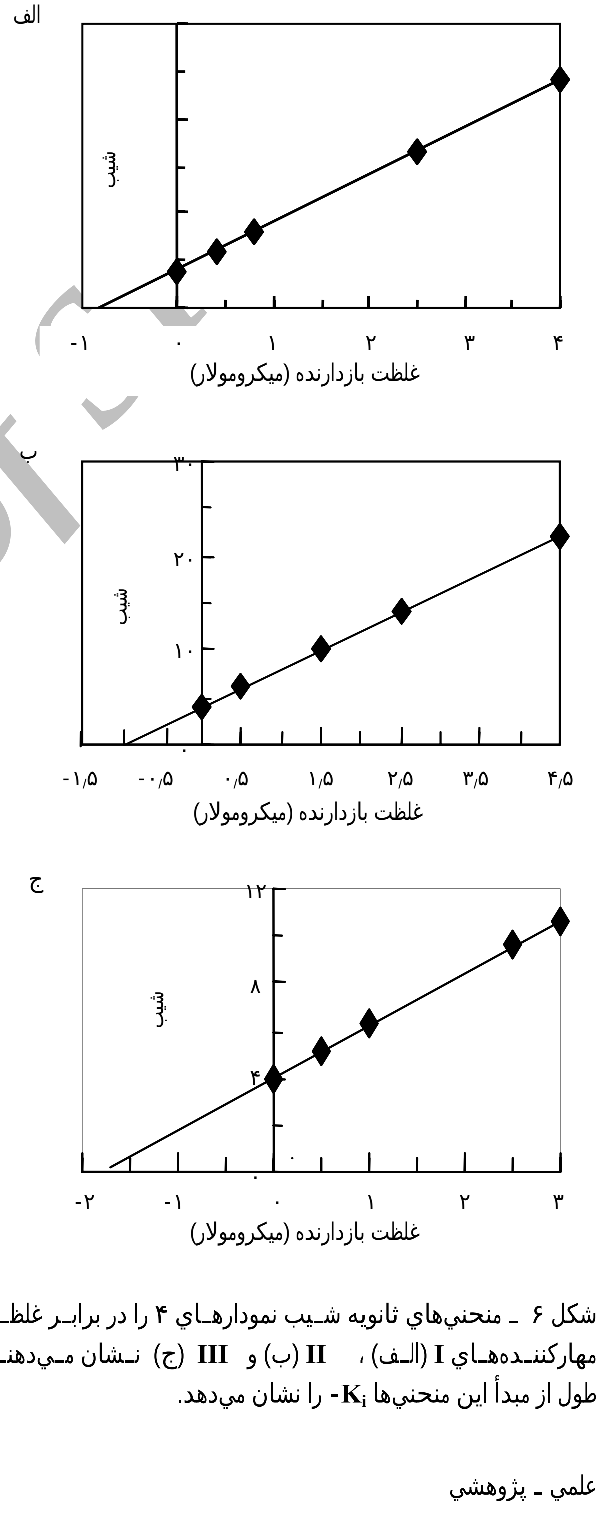
نوع واكنش	كاتكولاز		كرزولاز
بازدارنده	ثابت بازدارندگي (ميكرومولار)	ضريب اندركنش	ثابت بازدارندگي (ميكرومولار)
ان ـ بوتيل دي تيوكاربامات	۹/۴	۲/۸	۰/۸
ان ـ هگزيل دي تيوكاربامات	۱۵/۱	۴/۵	۱
ان ـ اكتيل دي تيوكاربامات	۲۸/۵	۴/۶	۱/۸

مطالعه‌ها نشان مي‌دهند كه سوبستراهاي مونو فنل و دي فنل با الگوي متفاوتي با هسته دو مسي تايروزيناز پيوند مي‌شوند. مونوفنل‌ها از راه اكسيژن با يك مس پيوند مي‌شود، اما دي‌فنل‌ها با هر دو مس موضع فعال كوئوردينانس پيدا مي‌كند و ساختار پل‌مانند تشكيل مي‌دهند [۴۰].

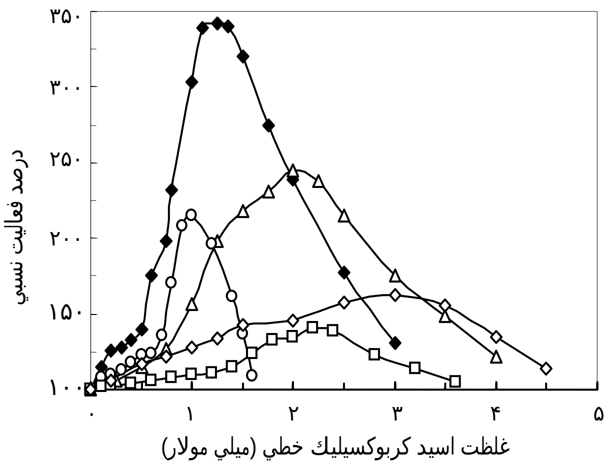
پيشنهاد شده است كه در هدايت مونو و دي فنل‌ها به موضع فعال تايروزيناز تفاوت فيزيكي وجود دارد و اين تفاوت يك ضرورت تعيين‌كننده براي پيشرفت چرخه‌ي كاتاليتيكي است. مونوفنل‌ها به‌سمت CuA و دي‌فنل‌ها به‌سمت CuB از راه جهت‌گيري يكي از گروه‌هاي هيدروكسيلي خود هدايت مي‌شوند [۴۱]. احتمال دارد كه تركيب‌هاي I ، II و III به سمت CuA در موضع فعال هدايت و با كوئوردينانس مناسب از راه گوگرد و مس باعث نشان دادن يك الگوي رقابتي مهار در فرايند كروزولازي آنزيم مي‌شوند. در مورد فعاليت كاتكولازي الگوي مهاري مختلط نشان از تركيب مهاركننده با آنزيم به تنهايي (E) و كمپلكس آنزيم ـ سوبسترا (ES) است.

سوبستراي دي فنلي با هدايت به CuB با اين ناحيه اتصال مي‌يابد، در حالي كه مهاركننده داراي كوئوردينانس با CuA است. از طرفي مونوفنل‌ها تنها با شكل اكسي تايروزيناز پيوند مي‌يابند، در حالي‌كه دي‌فنل‌ها با هر دو شكل اكسي و مت قابليت پيوند دارند [۴۰]. از اين رو، اگر اين مهاركننده‌ها داراي يك ترجيح پيوند با شكل اكسي باشند، مدل مختلط مهار در فعاليت كاتكولاز مي‌تواند منتج از استوكيومتري واكنش باشد. از نظر ديگر، دم آليفاتيك مهار كننده‌هاي I، II و III مي‌توانند تغيير قدرت مهار يا ثابت مهار را توجيه كند.

مطالعات بلور شناسي براي تعيين ساختار هموسيانين و در سال‌هاي اخير كاتكول اكسيد از سيب‌زميني شيرين يك مدل سه بعدي ساختاري را براي تايروزيناز پيشنهاد مي‌كند. در اين مدل مس‌هاي موضع كاتاليتيك در مركز چهار دسته هليكس در يك پاكت هيدروفوب جايگيري مي‌كنند كه نزديك به سطح آنزيم است [۴۱].



شكل ۶ ـ منحني‌هاي ثانويه شيب نمودارهاي ۴ را در برابر غلظت مهاركننده‌هاي **I** (الف) ، **II** (ب) و **III** (ج) نشان مي‌دهند. طول از مبدأ اين منحني‌ها K_i- را نشان مي‌دهد.



شكل۷ـ تغيير فعاليت كاتكولازي تايروزيناز در يک الگوي وابسته به غلظت در مجاورت اسيدهاي پيروييک(○)، آكريليک(◆)، پروپانوييک(△)، ۲ـ اكسوبوتانوييک (□) و ۲ـ اكسواكتانوييک (◇) مقدارهاي فعاليت نسبي بر اساس نسبت فعاليت در مجاورت اسيد به فعاليت بدون مجاورت آن ترسيم شده است.

K_i ثابت تفكيك كمپلكس آنزيم مهاركننده است و شناخت ارتباط افزايش مقدار آن با افزايش دم مهاركننده نياز به مطالعه‌هاي ساختاري بيشتر با در نظر گرفتن اين پاكت هيدروفوب است.

جهت شناخت اثر بخش كربوكسيليك اسيدها و تأكيد بر اثر بخش‌هاي غير اشباع آن‌ها روي فعاليت آنزيم تايروزيناز، دو فعاليت كاتكولاز و كرزولازي آنزيم به‌ترتيب با استفاده از سوبستراهاي MeBACat و MePAPh در مجاورت غلظت‌هاي متفاوت پيروييک، آكريليک، پروپانوييک، ۲ـ اكسوبوتانوييک و ۲ـ اكسواكتانوييک مورد بررسي قرار گرفتند.

پس از انكوباسيون آنزيم با غلظت‌هاي متفاوت هر اسيد، با اضافه‌نمودن سوبستراي كاتكولازي MeBACat فعاليت سينتيكي آنزيم مورد سنجش قرار گرفت. نمودارهاي مربوط به فعاليت كاتكولازي آنزيـم در شكل ۷ نشـان داده شـده‌انـد. چنانچـه مشاهده مي‌شود بسته به نوع اسيد و تعداد كربن آن، با افزايش غلظت اسيد تا حد مشخصي فعاليت نسبي آنزيم به ازاي غلظت ثابتي از سوبسترا ابتدا روند افزايشي و سپس كاهش تدريجي را نشان داد. نقاط با بيشترين فعاليت نسبي براي اسيدهاي پيروييک، آكريليک، پروپانوييک، ۲ـ اكسوبوتانوئيک و ۲ـ اكسواكتانوييک بـه ترتيب در غلظت‌هـاي ۱، ۱٫۲۵، ۲، ۲٫۲ و ۳ ميلي‌مـولار به دست آمده است. اين روند افزايش نشان مي‌دهد كه با افزايش تعداد كربـن اسيدهـاي مذكور غلظت مورد نيـاز بـراي رسيدن به بيشترين فعاليت نسبي افزايش مي‌يابد. از طرفي ميزان افزايش فعاليت نسبي بـراي اسيدهاي مذكور به‌ترتيب ۲٫۲، ۳٫٤، ۲٫۵، ۱٫٤ و ۱٫٦ برابرشده است. يعني اسيدهاي با تعداد كربن كمتر افزايش بيشتري را در فعاليت آنزيم القا مي‌كنند.

در يك نگاه مي‌توان گفت اين اسيدها به‌عنوان يك متأثركننده يـا بـه عبارت بهتـر يك فعال‌كننـده فعاليت كاتكولازي، در غلظت‌هاي پايين با يك تغيير كوچک در ساختار منجر به افزايش دستيابي سوبسترا به موضع فعال آنزيم و در نتيجه افزايش فعاليت آنزيم مي‌شوند، و در غلظت‌هاي بالا نيز با بر هم زدن ساختار آنزيم باعث افت فعاليت آن مي‌شوند. در نگاه دوم مي‌توان به اهميت بخش كربوكسيليك اين گروه اسيدها اشاره كرد.

در اينجا فعاليت كرزولازي آنزيم در مجاورت سوبستراي منوفنلي MePAPh و بعد از انكوباسيون آن با غلظت مناسب از هر يك از اسيدهاي مذكور سنجش شد.

اين اسيدها اثر مهاري در فعاليت آنزيم نشان دادند. پس از ترسيم نمودارهاي جفت معكوس لاينوويركِ براي شناخت مد مهاركنندگي اين آنزيم‌ها نمودارهاي مربوط در شكل ۸ رسم شدند. در اينجـا بهترين خطها قابل انطباق بـر نقاط بـه دست آمده با روش جايگزيني رسم و با كمك اين خطها نمودارهاي ثانويه به دست آمدند.

اين نقاط با استفاده از ميانگين سه عدد به دست آمده از فعاليت آنزيم ترسيم شده‌اند.

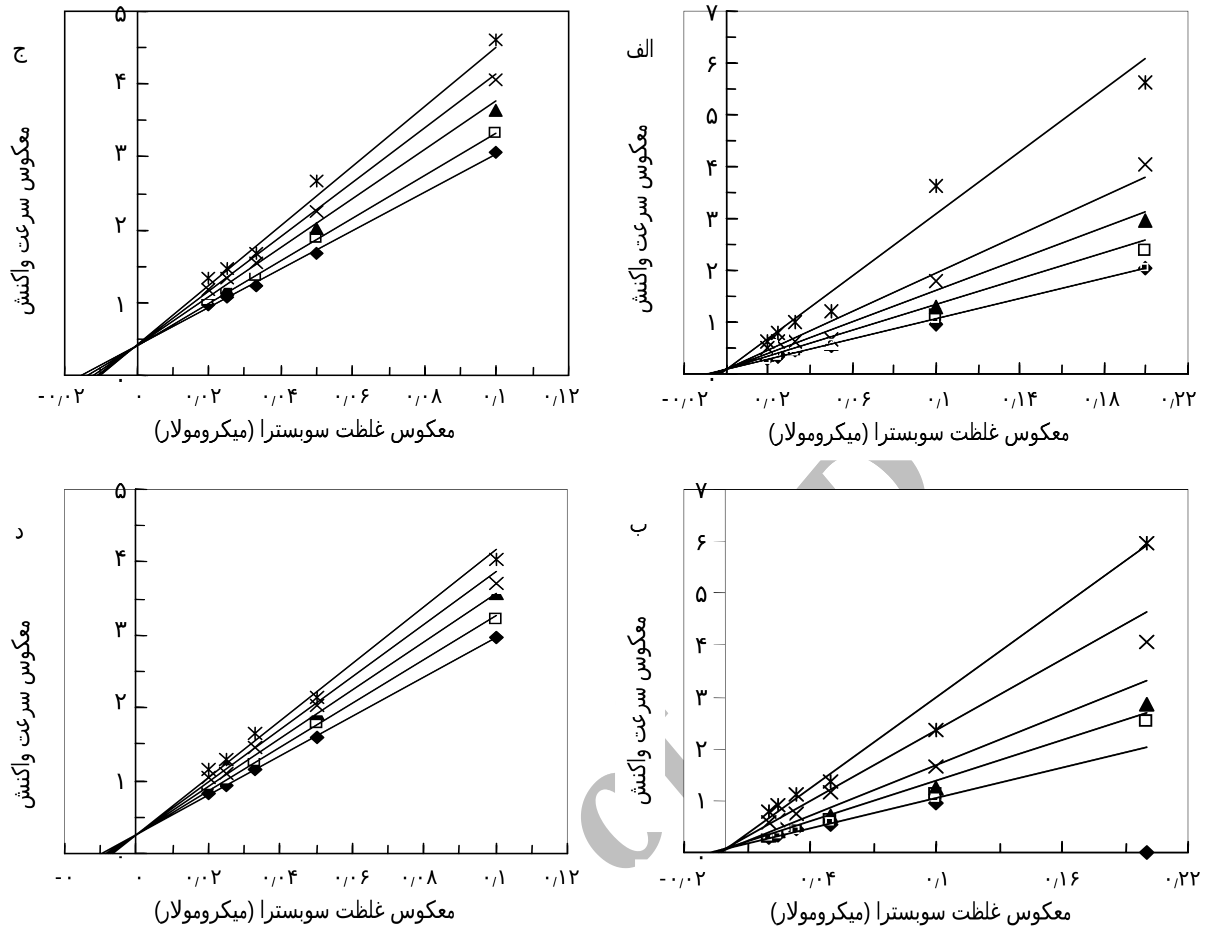
نمودارهاي الحاقي مربوط به اين شكل‌ها همان نمودارهاي ثانويه در شكل ۹ هستند كه از ترسيم شيب خطها حاصل از نمودارهاي اوليه در برابر غلظت مهاركننده به دست آمده‌اند.

طول از مبدأ اين نقاط ثابت مهاركنندگي يا K_i اين اسيدها را نشان مي‌دهد. مقدارهاي K_i براي اسيدهاي پيروييک، آكريليک، ۲ـ اكسوبوتانوييک و ۲ـ اكسواكتانوييک اسيد به ترتيب ۰٫۳٦، ۰٫۷۵، ۳٫٦ و ٤٫۵ ميلي‌مولار به دست آمد.

ايـن تـركيب‌ها داراي الگوي مهـار رقابتي بودنـد. امـا پروپانوئيک اسيد الگوي مهار ضد رقابتي نشان داد.

در بررسي دليل اين مهار بايد به اهميت همان بخش كربوكسيليك اين اسيدها و نيز نحوه عملكرد موضع فعال آنزيم تايروزيناز با سوبستراهاي منوفنلي و دي فنلي پرداخت.

در پيش واكنش يون‌هـاي فلـزي از جملـه Cu^{2+} و Ni^{2+} بـا اسيدهايـي مانند كافئيك اسيد و كوماريك اسيـد بـه عنـوان سوبستراهاي دي‌فنلي و مونوفنلي تايروزيناز مطالعه شدند [۴۲].



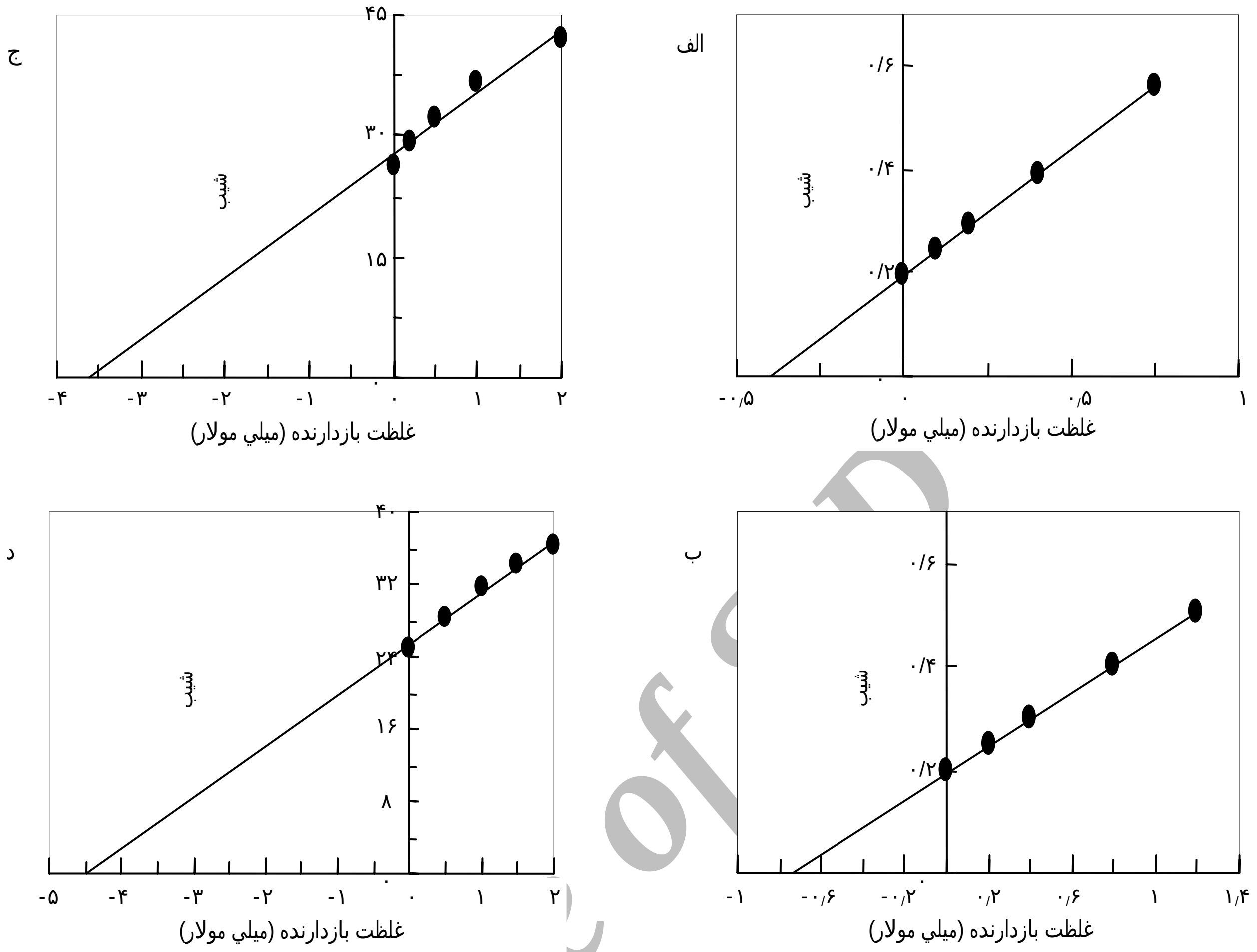
شكل۸ ـ منحني‌هاي جفت معكوس لاينووربرك براي فعاليت كرزولاز تايروزيناز در غلظت‌هاي ثابت مهاركننده در هر سري سوبسترا ترسيم شده است. غلظت‌هاي ثابت مهاركننده عبارت‌انداز: (الف) صفر(■)، ۰/۱(□) ، ۰/۲(▲) ، ۰/۴(X) ، ۰/۷۵ (Ж) ميلي مولار براي اسيد پيروييك؛ (ب) صفر(■)، ۰/۲(□) ، ۰/۴(▲) ، ۰/۸(X) ، ۱/۲ (Ж) ميلي مولاربراي اسيد اكريليك؛ (ج) صفر(■)، ۰/۲(□) ، ۰/۵(▲) ، ۱(X) ، ۲ (Ж) ميلي مولار براي ۲ـ اكسوبوتانوييك اسيد؛ (د)صفر(■)، ۰/۵(□) ، ۱(▲) ، ۱/۵(X) ، ۲ (Ж) ميلي مولار براي و ۲ـ اكسواكتانوييك اسيد.

آن‌ها متوسط انتهاي فنلي يا كربوكسيلي خود با موضع فعال آنزيم واكنش مي‌دهند.

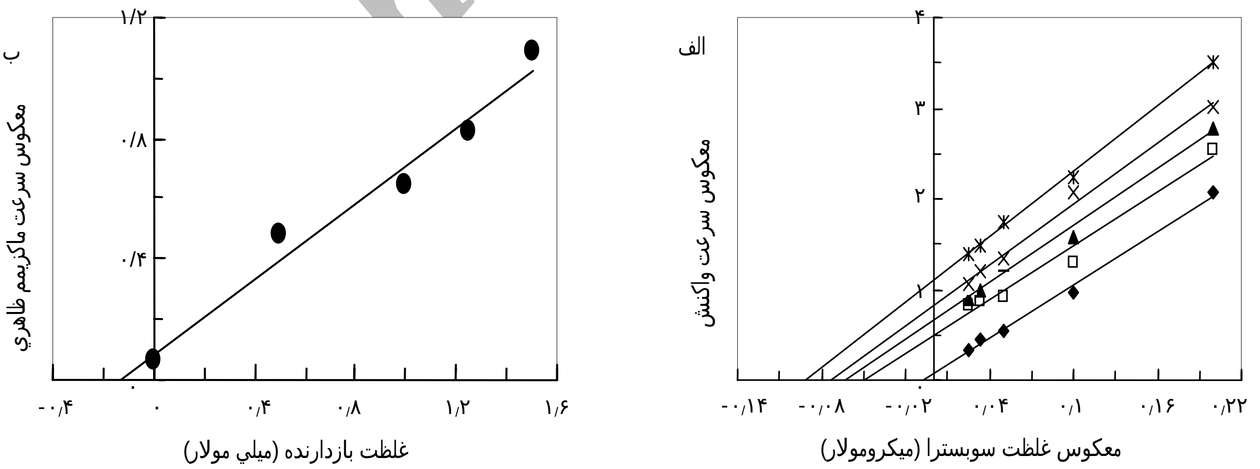
از طرفي در بررسي ما آسپارتيك اسيد به عنوان يك اسموليت در غلظت بالا اثر مهاري از خود نشان مي‌دهد.

مهم‌ترين مشخصه قابل اشاره در اين تركيب نيز بخش كربوكسيلي آن بود.

نقطه مشترك همه مطالعه‌ها در مورد تأثير اسيدهاي كربوكسيليك آروماتيك روي آنزيم تايروزيناز، بر اثر مهاري آن‌ها تأكيد دارد. در سري‌هاي بنزوييك اسيد، استريفيه كردن گروه كربوكسيل به‌طور وسيعي خاصيت مهاري را كاهش مي‌دهد، اما آن را به طور كامل بلوكه نمي‌كند و تمايل مولكول براي آنزيم هنوز وجود دارد [۴۳]. وقتي يك گروه كربوكسيليك به‌طور مستقيم به يك حلقه بنزني (سري‌هاي بنزوييك اسيد) و يا به‌صورت مزدوج با يك پيوند دوگانه (گروه‌هاي سيناميك يا سوربيك اسيد) اتصال دارد، اين گروه كربوكسيليك مي‌تواند با مس موجود در موضع فعال كمپلكس تشكيل‌دهد چنين اثري در مورد كافئيك اسيد و پروتوكاتكوييك اسيد ديده مي‌شود [٤٦ـ٤٤]. در اينجا بايد به موقعيت كربوكسيليك اسيدهاي به‌كار برده شده اشاره كرد كه چسبيده به كربن sp^2 مي‌باشد و اين ساختار به‌ويژه در نحوه جهت‌گيري و اتصال با مس موجود در موضع فعال آنزيم بسيار حائز اهميت است. چنانچه در پيش بيان‌شد آنزيم تايروزيناز داراي موضع فعال با هسته دو مسي است كه ساختار اين موضع فعال مي‌تواند از شكل‌هاي اكسي (oxy)، دي‌اكسي (dioxy) و مت (met) پيروي كند [۴۷]. سوبستراهاي مونوفنلي و دي فنلي با الگوي متفاوتي به موضع فعال آنزيم اتصال مي‌يابند.



شكل ۹ـ منحني‌ثانويه شيب نمودارهاي بالا را را در برابر غلظت مهاركننده با طول از مبدأ $-K_i$ را براي مهاركننده‌هاي: اسيد پيرويك (الف)؛ اسيد اكريليک (ب)؛ ۲ـ اكسوبوتانوييك اسيد (ج) و۲ـ اكسواكتانوييك اسيد (د) نشان مي‌دهد.



شكل ۱۰ـ منحني‌هاي جفت معكوس لاينووربرك براي فعاليت كرزولاز تايروزيناز در غلظت‌هاي ثابت اسيد پروپانوييك به‌عنوان مهاركننده در هر سري سوبسترا رسم شده است (الف)؛ منحني‌ثانويه شيب نمودارهاي بالا را در برابر غلظت مهاركننده با طول از مبدأ $-K_i$ نشان مي‌دهد (ب)؛ غلظت‌هاي ثابت مهاركننده عبارت‌انداز: صفر(■)، ۰/۱(□) ، ۰/۲(▲) ، ۰/٤ (X) ، ۷۵/. (Ж) ميلي مولار.

جدول ۲ـ نوع عملكرد اسيدها بر روي دو واكنش كاتكولاز و كرزولاز آنزيم

نوع فعاليت نوع اسيد	کاتکولاز		کرزولاز	
	ماکسيمم فعاليت نسبي (درصد)	غلظت اپتيمم (مولار)	ثابت بازدارندگي (ميلي مولار)	نوع بازدارندگي
پيروئيک اسيد	۲۱۵	۱	۰/۳۶	رقابتي
آکريليک اسيد	۳۴۲	۱/۲۵	۰/۷۵	رقابتي
پروپانوئيک اسيد	۲۴۵	۲	۰/۱٤	ضد رقابتي
۲ـ اکسو بوتانوئيک اسيد	۱٤۰	۲/۲	۳/٦	رقابتي
۲ـ اکسو اکتانوئيک اسيد	۱٦۳	۳/۲	٤/٥	رقابتي

مونوفنل‌ها از راه اکسيژن فنلي خود با يك مس اتصال مي‌يابند، در صورتي‌که دي فنل از راه هر دو اکسيژن فنلي با موضع فعال کوئوردينانس تشکيل مي‌دهند و يك ساختار پل‌مانند مي‌سازند [۴۰]. چنين پيشنهاد شده که يك تفاوت فيزيکي در مورد هدايت گروه‌هاي هيدروکسيلي به موضع فعال تايروزيناز وجود دارد [۴۸]. مونوفنل‌ها تنها با اکسي تايروزيناز پيوند مي‌يابند و دي فنل‌ها هم با شکل مت و هم اکسي ترکيب مي‌شوند [۴۰]. در مورد دي‌فنل‌ها در واکنش کاتکولاز با توجه به ساختار خود و نحوه هدايت ابتدا با CuB اتصال مي‌يابد، در حالي‌که هدايت مونوفنل‌ها در واکنش کرزولاز به سمت CuA مي‌باشد [۴۰]. اطلاعات بلور شناسي هموسيانين‌ها و در سال‌هاي اخير کاتکول اکسيداز سيب‌زميني شيرين نشان مي‌دهند که در مدل ساختار سه بعدي خانواده تايروزيناز، موضع کاتاليتيك حاوي مس در يك مرکز حاوي چهار دسته هليکس در يك پاکت هيدروفوب نزديك سطح قرار مي‌گيرد [۴۱]. در هر حال اين موضع فعال طوري واقع است که ترکيب‌هاي مونوفنلي به وسيله‌ي مناسبي به سمت CuA در انتهاي اين پاکت هدايت مي‌شوند. از طرفي طبق مطالعه‌هاي اشاره شده نگاه دوم به اسيدهاي به کار برده شده به کوئوردينانس بخش هيدروکسيليك آن‌ها با مس موجود در موضع فعال است. هدايت اين اسيدهاي خطي با داشتن بخش هيدروکسيليك متصل به يك کربن sp^2 احتمالاً به سمت CuA است. شواهدي که نشان از اختصاصي بودن سوبستراها و مهارکننده‌هاي تايروزيناز است، با جايگزيني‌هاي متفاوت پلي‌فنل‌ها و اسيدهاي کربوکسيليك آروماتيك به دست آمده است [۴۹و۵۰]. اسيدهاي دي کربوکسيليك آليفاتيك با تعداد کربن ۸ تا ۱۳ به‌عنوان مهارکننده‌هاي پلي فنل اکسيداز گزارش شده‌اند [۵۱]. مد مهار رقابتي اين اسيدها در فعاليت کرزولازي آنزيم رقابت آن‌ها با سوبستراي مونوفنلي در دسترسي به موضع فعال آنزيم را نشان مي‌دهد و وجود الگوي ضد رقابتي در پروپانوييک اسيد نشان مي‌دهد که اين ترکيب پس از پيوستن سوبسترا به آنزيم قابليت پيوند را دارد.

اين به معني احتمال تغيير در ساختار آنزيم و در دسترس قرار گرفتن مکاني جهت پيوند بازدارنده است. از از آنجا که هم سوبستراهاي مونوفنلي و احتمالاً هم اسيدهاي مذکور، تمايل به پيوند با CuA را دارند، براي رسيدن به موضع مذکور با هم رقابت مي‌کنند. در همه اين اسيدها ثابت بازدارندگي (K_i) با طويل شدن دم آليفاتيک روند افزايشي نشان مي‌دهد. احتمالا" سوبستراهاي مونوفنلي و دي فنلي در دست يابي به موضع فعال آنزيم متفاوت عمل مي‌کنند، و اين تفاوت با در نظر گرفتن سر قطبي بازدارنده عامل اصلي تعيين کننده نوع بازدارندگي است. اين ثابت مهار در واقع عکس ثابت تمايل مهارکننده به آنزيم (K_a) است، يعني اين کاهش تمايل اسيدها به آنزيم با افزايش دم کربني و يا هيدروفوبيسيتي آن‌هاست. براي آنزيمي مانند تايروزيناز که به عنوان کاتاليز کننده سوبستراهاي متعددي عمل مي‌کند، برهم‌کنش خود سوبسترا با پاکت هيدروفوب اطراف موضع فعال اساسا" دستيابي آن‌ها را جهت ايجاد کوئوردينانس مناسب با مس موجود در اين موضع تحت تأثير قرار مي‌دهند.

اگر چه نحوه هدايت سوبستراهاي فنلي با اندازه‌ي متفاوت به سمت موضع فعال نبايد خيلي متفاوت باشد ولي روشي که باقيمانده‌هاي اين سوبستراها در پاکت هيدروفوب موضع فعال مدفون مي‌شوند، به نحو قابل توجهي مي‌تواند متفاوت باشد.

بنابراين، تغييرهاي کلي در ساختار سه بعدي (صورت بندي) آنزيم، ناشي از برهم‌کنش سر و اسکلت سوبستراها با پاکت هيدروفوب آنزيم هستند. به روش مشابهي اين تفسير را مي‌توان براي مهارکننده‌هاي آنزيم به کاربرد، به ويژه آن‌هايي که ساختار مشابه سوبسترا دارند.

بر همين اساس افزايش ثابت بازدارندگي (K_i) اين اسيدهاي

خطي در جدول ۲ به معناي کاهش تمایل آن‌ها به موضع فعال است و این اثر به ویژه زماني اهمیت پیدا مي‌کند که آن‌ها به عنـوان متأثر کننده فعالیت آنزیم در کنـار سوبسترا درنظر گرفته شوند و اثرشان در این شرایط مهاري است.

نتیجه گیري

مقایسه قدرت بازدارندگي مقدارهاي ثابت بازدارندگي (K_i) ترکیب‌هاي دي تیوکارباماتي و اسیدهاي به کار رفته نشان مي‌دهد که در هر دوي این سري ترکیب‌ها با افزایش طول دم غیر قطبي ثابت مهار افزایش و در نتیجه تمایل بازدارنده به آنزیم کم مي‌شود. نقطه مشترک دیگر در این مطالعه نوع مهار رقابتي این ترکیب‌ها در بیشتر واکنش‌ها بود که نشان از درگیر شدن سر قطبي این ترکیب‌ها با مس موجود در موضع فعال آنزیم مي‌باشد. تغییرهاي ساختاري آنزیم و به ویژه دست‌یابي سر قطبي ترکیب‌ها با مس موجود در موضع فعال و نیز احتمال درگیري دم غیرقطبي با دسته‌هاي 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 سنجي 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: ۸۶/۱۱/۱۰ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۸/۲۰

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 â-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 Purifica-Tion 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., McMahill, 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, â and ç 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, *Experimentia,* **31**, p. 1005 (1975).

[33] Pierpoint, W.S., The Enzymic Oxidation of Cholorogenic Acid and Some Reactions of the Quinine Prodused, *Biochem. J.,* **98**, p. 567 (1966).

[34] Seiji, M., Yashida, T., Itakura, H. and Irimajiri, T., Inhibition of Melanin Formation Bye 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] Prota, G., "Melanins and Melanogenesis", Academic Press, San Diego (1992).