

استخراج و تعیین ویژگی‌های آنزیم تایروزیناز از پوست موز

علیرضا فرخ^۱، ریحانه سریری^{۲*}، نیکو ناسوهی^۱

۱. گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نو، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۲۹)

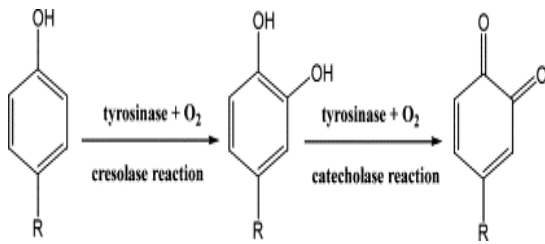
چکیده

تشکیل رنگدانه‌های قهوه‌ای در پوست توسط تایروزیناز از مهمترین فاکتورهای موثر در ایجاد علائم پیری است. این آنزیم هم چنین در کاهش کیفیت میوه‌ها و سبزی‌ها از طریق تولید ملانین دخالت مستقیم دارد. تایروزیناز یک متالوآنزیم است که در کارهای تحقیقاتی مربوط به مواد غذایی، دارویی و آرایشی کاربرد دارد. قارچ خوراکی در حال حاضر تنها منبع تایروزیناز برای مصارف صنعتی و پژوهشی در مورد این آنزیم می باشد. هدف این تحقیق بررسی تایروزیناز پوست موز به عنوان یک جایگزین برای تایروزیناز قارچ در صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و تحقیقاتی می باشد. در عمل، آنزیم مذکور از پوست موز استخراج و خالص سازی گردید و برخی از ویژگی‌های آن از جمله فعالیت بیولوژیکی، pH و دمای بهینه تعیین گردیده و با تایروزیناز سایر منابع مقایسه شدند. نتایج نشان دادند که آنزیم تایروزیناز پوست موز دارای دو ایزوفرم با وزن مولکولی بیشتر از تایروزیناز قارچ است. از طرفی، دما و pH بهینه آنزیم به ترتیب ۵۰ C و ۶/۱ بودند. مقادیر ثابت میکائیلیس منتن ۲۶۳/۳ میلی مولار و سرعت ماگزیمم ۰/۰۴۰۱ میلی مولار بر دقیقه محاسبه گردید.

کلیدواژگان

استخراج، تایروزیناز، ثابت‌های میکائیلیس، دما و pH بهینه، ضایعات موز.





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

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

آنزیم تایروزیناز در صنایع دارویی و آرایشی بهداشتی کاربردهای وسیعی دارد و پژوهش در مورد انواع آنزیم و بازدارنده‌های طبیعی و سنتزی آن روز به روز گسترده تر می‌شود. در حال حاضر، برای اغلب کاربردهای فوق منبع آنزیم مذکور تایروزیناز قارچ خوراکی *Nakamura et al.*, 1966 و *Strothkamp et al.*, 1976 و یا سایر قارچ‌ها می‌باشد (Fan et al., 2004). ولی در حد تحقیقاتی نیز تا کنون این آنزیم را از منابع گوناگون جانوری (Garcia Borrón et al., 1985 و *Kwon et al.*, 1987) و گیاهی مانند سیب زمینی (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 آنها را بررسی کرده‌اند. از طرف دیگر، مطالعات در مورد سینتیک واکنش آنزیم و اثر کننده‌های آن نیز بیشتر در مورد تایروزیناز قارچ بوده است (Hsu et al., 2007 و *Chen et al.*, 2003). در هر حال، تایروزیناز

مقدمه

پلی فنل اکسیدازها (polyphenol oxidases, PPOs) دسته وسیع و مهمی از متالو آنزیم‌ها با شماره کمیته آنزیمی (EC 1.10.1.1) هستند که تبدیل هیدروکسی فنل‌ها را به مشتقات کوئینون کاتالیز می‌کنند (Van Gelder et al., 1997). اورتو کوئینون‌ها به شدت واکنشگر و ناپایدار بوده و با ایجاد اتصال‌های عرضی در آمینو اسیدها یا پروتئین‌ها، فنول‌ها، دیگر ترکیبات سلولی و حتی در میان ساختمان خودشان پلیمرهای قرمز، سیاه و قهوه‌ای ایجاد می‌کنند. تشکیل رنگدانه‌های قهوه‌ای از مهمترین واکنش‌هایی است که در انسان و برخی جانوران عالی موجب کدر و لکه دار شدن پوست (del Marmol and Beermann, 1996) و در گیاهان موجب تغییر رنگ آنها شده و عامل کاهش کیفیت در اغلب غذاها می‌باشد (Fraignier, 1995). به این ترتیب، بررسی انواع آنزیم، تعیین ویژگی‌های مربوطه و مشخص کردن بازدارنده‌های طبیعی و سنتزی آن، به موازات ارزش پژوهشی، از نظر اقتصادی نیز اهمیت زیادی دارد (Espin and Witchers, 1999; Espin et al., 1999 & Espin et al., 2000a). پلی فنل اکسیدازها دارای سه نوع فعالیت شناخته شده یعنی فعالیت‌های کاتکولاز، لاکاز و کرسولاز هستند (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 دو نوع، در واقع، هیدروکسیله کردن منوفنول‌ها به ارتو- دی فنل‌ها (فعالیت منو فنولاز یا کاتالاز) و اکسیده کردن ارتو- دی فنل‌ها یا پارا- دی فنل‌ها به ارتو- کوئینون (فعالیت دی فنولاز یا کاتکولاز) هستند. شکل ۱ هر دو نوع واکنش را در حضور تایروزین به عنوان سوبسترا نشان داده است.



برداشته شده و در میکروتیوب‌های جدید ریخته شد.

رسوب گیری با سولفات آمونیم

برای رسوب دادن پروتئین‌ها از سولفات آمونیوم ۸۵ درصد استفاده شد. نمونه‌های استخراجی درون استوانه مدرج ریخته و روی همزن مغناطیسی قرار گرفت و با قرار دادن در یخچال، سولفات آمونیوم طی شش مرحله ده دقیقه‌ای به محلول پروتئینی افزوده شد. بعد از تکمیل رسوب گیری، محلول در دمای 4°C و با دور 5000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب پروتئینی در حداقل بافر فسفات حل گردید.

مرحله دیالیز

این عمل با استفاده از کیسه‌های دیالیز با منافذ ۱۲ کیلو دالتون جهت حذف نمک آمونیوم سولفات از رسوب پروتئینی و جدا کردن پروتئین‌هایی با اوزان مولکولی بیشتر از ۱۲ کیلو دالتون انجام شد. پس از آماده سازی کیسه‌ها، دیالیز در بافر فسفات (۵۰ میلی مولار با $\text{pH } 6.8$) بر روی استیرر در دمای 4°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 این کار از دستگاه FPLC مدل BIORAD و ستون (UNO-Q1) که فاز ثابت (رزین) آن Q- سفاروز بود، استفاده شد. از دو نوع بافرهای A و B استفاده شد و سرعت جریان (Flow rate) بافر یک میلی لیتر در دقیقه تنظیم گردید. بافر A شامل تریس ۲۰ میلی مولار $\text{pH } 7.2$ و بافر B متشکل از تریس ۲۰ میلی مولار و NaCl یک مولار $\text{pH } 7.2$ بودند. پس از انجام عمل کروماتوگرافی، فعالیت تیروزیناز در فراکشن‌های هر

موجود در ضایعات میوه‌ها و سبزی‌ها فقط در چند سال اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. گزارش‌هایی نیز راجع به استخراج تایروزیناز در حبوباتی از قبیل باقلا (Waliszewski et al., 2009) و (Paul and Gowda, 2000) و جوانه نخود (Marcio and Fabricio, 2008) وجود دارند.

هدف

با توجه به این که حدود ۵۰٪ وزن موز را ضایعات آن تشکیل می دهند، مصرف خانگی و تجاری آن منجر به حجم قابل توجهی ضایعات می شود. تجربه و تخصص گروه تحقیقاتی بیوشیمی دانشگاه گیلان در مورد تایروزیناز از منابع گیاهی پایه طراحی پژوهش حاضر شد. در نهایت بررسی ویژگی‌های آنزیم مقایسه آن با تایروزیناز قارچ مورد نظر قرار گرفت.

روش کار

تهیه ضایعات موز و عمل استخراج عصاره اولیه آنزیم

موزهای تازه و رسیده از بازار محلی خریداری و، بعد از صرف میوه، پوست‌ها به طور کامل در آون 45°C درجه برای ۱۲ ساعات خشک شدند. در ادامه، پوست‌های خشک شده ابتدا با دست خرد و سپس توسط آسیاب به صورت پودر درشت در آورده شدند. برای عمل استخراج، یک 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 تبدیل و مدت ۱۵ دقیقه در 14000 rpm در دمای 4°C درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. محلول روئی جدا شده و دوباره به مدت ۵ دقیقه در 14000 rpm در دمای 4°C درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. سپس محلول روئی حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز به آرامی با سمپلر



آنزیمی محلول سوبسترای تازه تهیه گردید. محیط سنجش یک میلی لیتری حاوی $990 \mu\text{L}$ سوبسترا و $10 \mu\text{L}$ آنزیم (نمونه استخراجی) است. تغییرات جذب بر حسب زمان در طول موج 505 نانومتر در مقابل بلانک حاوی $990 \mu\text{L}$ سوبسترا و $10 \mu\text{L}$ بافر استخراج، بررسی شد.

محاسبه K_m و V_{max}

برای این آزمایش غلظت‌های $12/5$ ، 25 ، 50 ، و 75 میلی مولار از سوبسترای تایروزیناز تهیه شد. سوبسترای اصلی تایروزیناز دوپامین هیدروکلراید بود و نمونه آنزیمی بعد از FPLC جهت محاسبه K_m و V_{max} با سه بار تکرار استفاده شد.

محاسبه دمای بهینه

ابتدا رقت مناسب نمونه آنزیمی تهیه شد و سپس در 7 میکروتیوب 40 میکرولیتر از آنزیم رقیق شده ریخته شد. در ادامه، یکی از میکروتیوب‌ها در دمای 10 درجه سانتیگراد به مدت 20 دقیقه قرار داده شده و سپس سنجش آنزیمی سه بار انجام شد. میکروتیوب دوم در دمای 20 درجه در بن ماری به مدت 20 دقیقه قرارداد شده و مانند روش قبل سه بار سنجش آنزیمی روی آن انجام گرفت و به همین ترتیب بر روی همه میکروتیوب‌ها دمای 30 ، 40 ، 50 ، 60 ، 70 درجه با مدت زمان 20 دقیقه اعمال و مورد سنجش قرار گرفتند. سپس با مقادیر جذب‌های بدست آمده، از طریق رسم نمودار در برنامه اکسل دمای بهینه فعالیت آنزیم محاسبه گردید.

اندازه گیری 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). سپس فعالیت آنزیمی نمونه‌ها با استفاده

پیک سنجیده شده و فراکشن‌هایی که حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز بودند برای انجام مراحل بعدی در دمای 20°C - منتقل شدند.

تغلیظ به روش اولترافیلتراسیون

نمونه پروتئین خارج شده از FPLC رقیق شده بود و، جهت تشخیص میزان خلوص، بر روی ژل SDS-PAGE قابل رویت نخواهد بود. بنابراین، بعد از انجام کروماتوگرافی تبادل یونی فراکشن‌های حاوی آنزیم تایروزیناز که با سنجش فعالیت آنزیمی مشخص شده بودند، بوسیله روش اولترافیلتراسیون با میکروتیوب سنتریکون تغلیظ گردیدند. جهت تغلیظ در این روش از سانتریفیوژ با سرعت چرخش 12000 rpm در دمای 4°C به مدت 10 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 12% استفاده شد. الکتروفورز SDS-PAGE از نمونه‌های تغلیظ شده پس از انجام کروماتوگرافی تبادل آنیونی انجام گردید. پس از انجام الکتروفورز، ژل حاصل با روش کوماسی بریلیانت بلو G-250 رنگ آمیزی گردید.

سنجش فعالیت پلی فنل اکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم از سوبسترای دوپامین هیدروکلراید با غلظت 55 میلی مولار، 3 -متیل- 2 -بنزوتیازولینون هیدرازون (MBTH) (Merek) با غلظت 5 میلی مولار، دی متیل فرم آمید (DMF) دو درصد حجمی و اسید فسفریک $0.8/10$ درصد حجمی و بافر فسفات 50 میلی مولار با $\text{pH}=6.8$ استفاده شد (Sanchez-Ferrer, 1988). با توجه به ناپایداری و حساس بودن سوبسترا، برای هر نوبت سنجش فعالیت



از سوبسترای دوپامین هیدروکلرید طبق روش فوق حداقل ۳ بار در هر یک از این بافرها اندازه گیری شد.

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

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

ته چاهک بارگذاری شدند و شرایط دمایی ۴ درجه سانتی گراد برای نمونه‌ها در تمامی مراحل آزمایش فراهم گردید تا فعالیت آنزیم حفظ گردد. ولتاژ دستگاه روی ۱۰۰ تنظیم شد. بعد از اتمام الکتروفورز ژل در محلول سوبسترای آنزیم غوطه ور و جهت رنگ آمیزی در شرایط دمایی ۴ °C قرار 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 به عمل آمد. ژل در محلول سوبسترا به مدت ۱۲-۱۰ ساعت قرار گرفت. در اثر واکنش بین آنزیم با سوبسترا باندهای پروتئین تایروزیناز گرفته و پس از ظهور اولیه باند، به منظور کاهش رنگ پذیری ژل، بافر فسفات بیشتری به سوبسترا اضافه گردید.

تعیین غلظت پروتئین و محاسبه فعالیت ویژه

جهت تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. بعد از هر مرحله جدا سازی، تغلیظ و تخلیص، غلظت پروتئین محاسبه شد. همچنین در هر یک از این مراحل، فعالیت پلی فنل اکسیداز در یک مخلوط سنجش یک میلی لیتری با روش اسپکتروفتومتری از طریق اندازه گیری افزایش جذب در طول موج ۵۰۵ نانومتر در یک دوره زمانی ۲ دقیقه ای بررسی گردیده و فعالیت ویژه پروتئین در هر مرحله بدست آمد. (Mayer and Staples, 2002).

زایموگرام تایروزیناز

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

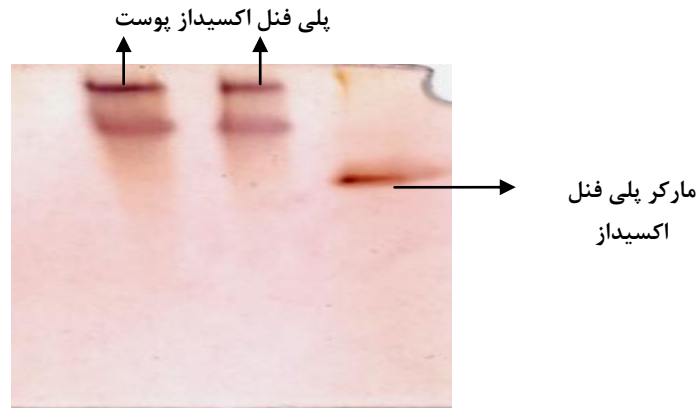
نتایج

در پایان هر مرحله هموژنیزاسیون، رسوب دهی 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 می شود که با افزایش میزان تخلیص به حدود ۷ برابر مقدار شروع عمل، فعالیت ویژه آنزیم تایروزیناز نیز به همین مقدار افزایش یافته است و این امر نشان دهنده 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 ایزوform برای آنزیم پلی فنل اکسیداز پوست موز پیش بینی می شود.



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

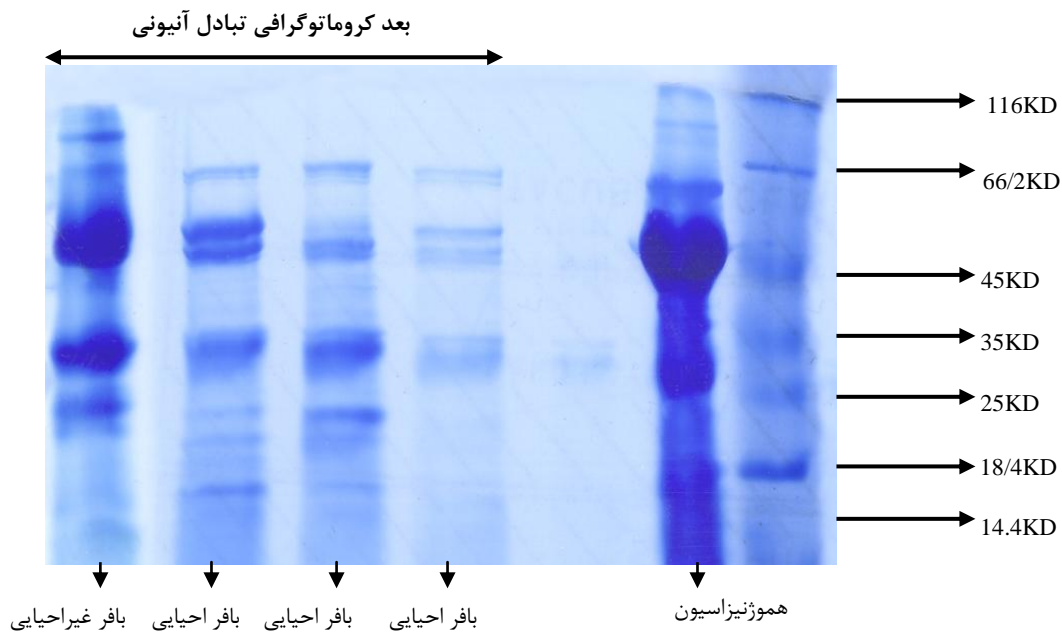
میزان تخلیص	راندمان	فعالیت ویژه $\mu\text{mol/min mg}$	فعالیت کل $\mu\text{mol/min}$	پروتئین کل mg/mL	$\Delta\text{A/min}$
۱	۱۰۰	۰/۰۰۵	۰/۱۴۸	۳۰/۵	۰/۲۴۲
۲/۰۳۲	۲۵/۲۵	۰/۰۰۸۵	۰/۳۴۲	۴۱/۵۵	۰/۲۹۱
۶/۹۷۵	۱۱/۷۶	۰/۰۳۲	۰/۰۱۶۴	۰/۵۸۱	۰/۱۲۹



شکل ۲- زیموگرام حاصل از تایروزیناز پوست موز. وزن مولکولی مارکر پلی فنل اکسیداز ۵۸ کیلو دالتون است.

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).

به منظور تعیین میزان تخلیص، فراکشن‌های تغلیظ شده حاوی آنزیم پلی فنل اکسیداز بعد از مرحله کروماتوگرافی تبادل آنیونی با استفاده از

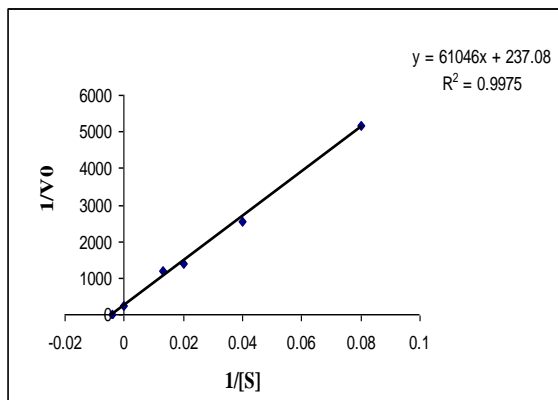


شکل ۳- الکتروفورگرام حاصل از عمل الکتروفورز SDS-PAGE بعد از انجام کروماتوگرافی آنیونی. نمونه سمت راست مربوط به مارکر وزن مولکولی است.



$$K_m = 263.3 \text{ mmol}$$

$$V_{max} = 0.00401 \text{ mmol/min}$$



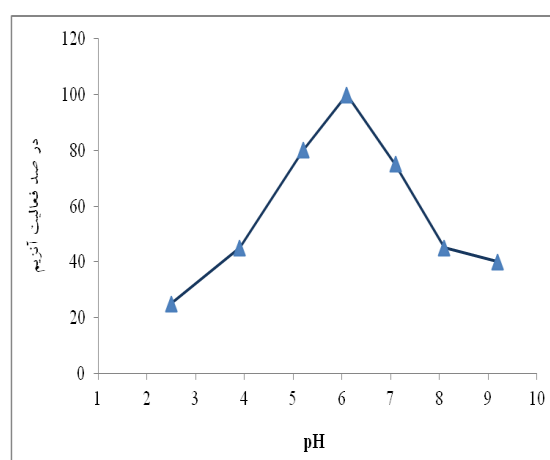
شکل ۶- نمودار لاینویور- برک فعالیت تایروزیناز پوست موز

بحث و نتیجه‌گیری

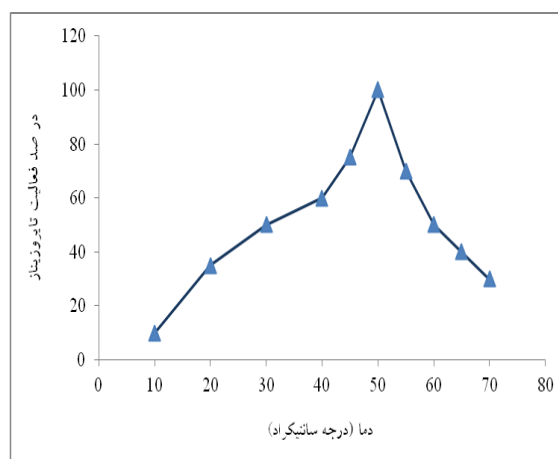
بر اساس بررسی‌های انجام شده، با آن که آنزیم تایروزیناز از برخی میوه‌ها و سبزی‌ها جداسازی و تخلیص شده (Rast et al., 2003; Marques et al., 1995; & Marcio and Fabricio, 2008)، ولی ضایعات و استفاده از آنها به عنوان منابع آنزیمی کمتر مورد توجه دانشمندان بوده‌اند. در پژوهش حاضر، نتایج خالص سازی پروتئین با FPLC با استفاده از دکتور ماورای بنفش ۳ فراکشن بیان شده‌اند. هر پیک مربوط به پروتئین‌هایی هستند که در حدود درصد‌های خاصی از بافر B از ستون جدا شده‌اند. فعالیت تایروزینازی درفراکشن‌های به دست آمده ردیابی گردید. بر اساس نتایج، فعالیت پلی فنل اکسیدازی در فراکشن‌های ۱ و ۲ وجود داشتند. فراکشن اول در ناحیه با گرادیان صفر بافر B قرار دارد که آنزیم این ناحیه با ستون اتصال برقرار نکرده است. به این ترتیب، آنزیم در فراکشن دوم جداسازی شده است و از آنجایی که در این فراکشن درصد بافر نمکی کم بوده است، بنابراین نتیجه می‌شود که بار منفی روی سطح پروتئین ناچیز بوده است. زیرا، با توجه به جنس ماتریکس، هر چه پروتئین مورد نظر بار منفی

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 ۶/۱ می‌باشد (شکل ۴).

هم چنین، بررسی فعالیت آنزیم در دماهای مختلف نشان داد که دمای بهینه فعالیت آنزیم در حدود 50°C با تغییراتی در محدوده یک درجه می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۴- تعیین pH بهینه آنزیم پلی فنل اکسیداز پوست موز



شکل ۵- نمودار دمای بهینه تایروزیناز پوست موز

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



شکل ملاحظه می‌گردد، باندهای هم ردیف مارکر با وزن ملکولی ۶۲ کیلو دالتون متعلق به آنزیم پلی فنل اکسیداز این تحقیق می‌باشند. وزن مولکولی تایروزیناز استخراج و تخلیص شده از نوعی قارچ به نام *Portabella mushrooms* حدود ۷۰ کیلو دالتون گزارش شده است که اندکی بیشتر از آنزیم پوست موز است. (Fan and Flurkey, 2004).

بر اساس نتایج ما، pH بهینه آنزیم استخراج شده از پوست موز در حدود ۶/۱ است (شکل ۴). این نوع رفتار در مقابل pH در مقایسه با برخی تایروزینازهای گیاهی گزارش شده اندکی تفاوت دارد. به عنوان مثال، pH بهینه آنزیم پلی فنل اکسیداز گوجه فرنگی در محدوده اندکی قلیایی است (Thipyapong and Steffen, 1997). از طرفی، آنزیم پلی فنل اکسیداز در نوعی لوبیا به نام *vanilla bean* دارای pH بهینه در محدوده کاملاً قلیایی (حدود ۸-۱۰) است (Waliszewski, et al., 2009). ولی، به طوری که ملاحظه می‌شود، pH بهینه آنزیم استخراج شده از پوست موز در تحقیق ما در محدوده اسیدی می‌باشد که دال بر فعالیت بیشتر آنزیم در محیط‌های اندکی اسیدی در مقایسه با محیط‌های قلیایی می‌باشد. 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 ۴، ملاحظه می‌شود که آنزیم تایروزیناز پوست موز 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 در صد بیشتری از فعالیت بیولوژیکی آنزیم در محیط‌های اسیدی در مقایسه با محیط‌های قلیایی می‌تواند نشان دهنده تغییرات ساختمانی در اطراف جایگاه فعال آنزیم در محیط‌های قلیایی و مقاومت در مقابل محیط اسیدی باشد.

بیشتری داشته باشد محکم تر به ماتریکس متصل می‌شود و برای جدا شدن آن نیاز به درصد بالاتری از بافر B می‌باشد. 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 سنتریکون، با قابلیت عبور فقط برای پروتئین‌هایی با وزن ملکولی ۳۰ کیلو دالتون، تغلیظ شد. سپس فعالیت آنزیمی دو نمونه بالا وپائین صافی بررسی شد بر این اساس، مشخص گردید که فقط محلول روی صافی فعالیت پلی فنل اکسیدازی دارد. با توجه به این نتیجه، از محلول روی صافی برای مراحل بعدی استفاده شد.

به منظور مشاهده حضور پلی فنل اکسیداز، الکتروفورز ژل پلی آکریلامید PAGE در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد و پس از اتمام الکتروفورز، ژل در مجاورت سوبسترا قرارگرفت و در نهایت باندهای پروتئینی آن ظاهر شدند. از آنزیم تایروزیناز قارچ *Agaricus bisporus* با وزن ملکولی ۵۸ کیلو دالتون به عنوان مارکر استفاده شد (شکل ۳). از آنجایی که آنزیم در فرم ساختمانی کامل خود با سوبسترا واکنش می‌دهد، بنابراین وجود دو باند در ژل ممکن است نشان دهنده حضور دو ایزوفرم مختلف آنزیم پلی فنل اکسیداز در ضایعات موز باشد. موقعیت باندهای ظاهر شده بالاتر از باندهای مربوط به تایروزیناز قارچ است. بنابر این، نتیجه شد که وزن ملکولی تایروزیناز استخراج شده از پوست موز تا حدی بالاتر از ۵۸ کیلودالتون است. برای تعیین دقیق تر وزن مولکولی آنزیم استخراج شده، در مرحله بعدی الکتروفورز PAGE-SDS از این نمونه‌ها در حضور بافر نمونه‌های احیایی و غیر احیایی انجام گرفت و با روش کوماسی بلو رنگ آمیزی شد. در ژل حاصل از الکتروفورز PAGE جایگاه باندهای آنزیم پلی فنل اکسیداز مشخص است (شکل ۳). به طوری که در این



دمای بهینه فعالیت برای این آنزیم ۵۰ درجه سانتی گراد به دست آمد (شکل ۵). این مقدار تا حدی بالاتر از دمای بهینه آنزیم‌های تایروزیناز گیاهی مانند توتون (Sariri et al., 2007)، هلو (Wong, et al., 1971)، گلابی (Espin et al., 2001) و سیب (Rocha and Morais, 2001) است. شکل (۵) نشان می‌دهد که دماهای ۴۵ تا ۵۵ درجه بهترین محدوده دمایی برای فعالیت آنزیم است. از طرف دیگر، آنزیم تایروزیناز پوست موز در دماهای پائین 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.

فاکتورهای pH و دمای بهینه یک آنزیم می‌توانند معیارهایی برای نشان دادن پایداری و یا حساسیت آن باشند. در نتیجه، تصمیم‌گیری در مورد کاربردهای طبیعی و صنعتی آن جنبه‌های علمی‌تری پیدا خواهند نمود.

از طرف دیگر، مطالعات سینتیکی در این تحقیق نشان دادند که در غلظت‌های متفاوت سوبسترای دوپامین هیدروکلراید میزان K_m و V_{max} برای تایروزیناز به ترتیب $263/3 \text{ mmol}$ و 1 mmol/min (۰/۰۰۴۰ می باشند (شکل ۶). در نهایت، انتظار می‌رود که تحقیق حاضر راه تازه‌ای برای استفاده صنعتی و تحقیقاتی از ضایعات میوه حاصل از کارخانه‌های تولید آب میوه و فناوری غذایی، ضایعات کشاورزی، ضایعات باغبانی و زیباسازی شهری و بسیاری ضایعات خانگی پیش رو قرار دهد. این گونه اهداف، به خصوص اگر به مرحله کاربردی و تولیدی برسند، می‌توانند منبع ارزان قیمت و در دسترس برای ترکیبات با ارزش باشند. به علاوه، به کارگیری چنین اهدافی می‌تواند افزون بر کاهش حجم زباله و ضایعات فاسد شونده در کاهش آلودگی محیط زیست نیز بسیار مفید واقع شوند.



منابع و مآخذ

1. Chen Q.X., Liu X.D., Huang H. (2003). Inactivation kinetics of mushroom tyrosinase in the dimethyl sulfoxide solution. *Biochem (Moscow)*. 68(6): 644-649.
2. del Marmol V. and Beermann F. (1996). Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS. Letts* 381: 165-168.
3. Espin J.C., Morales M., Varon R., Tudela J., Gracia-Canovas F. (1997). Monophenolase activity of polyphenol oxidase from blanquilla pear. *Phytochemistry* 44 (1): 17-22.
4. Espin J.C. and Wichers H.J. (1999). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium docecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Ag. Food Chem.* 47: 3518-3525.
5. Espin J.C. van Leeuwen J. Wichers H.J. (1999). Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. *J. Ag. Food Chem.* 47: 3509-3517.
6. Espin J.C., Soler-Rivas S., Wichers H.J. (2000a). Maturation and activation of latent tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *International. Soc. Mushroom Science Proceed.* May: 15-19.
7. Fan Y. and Flurkey W.H. (2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*. 65: 671-676.
8. Fraignier M.P., Marques L., Fleuriet A., Macheix J.J. (1995). Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2375-2380.
9. Friedman M. E. and Daron H.H. (1977). Tyrosinase: An introductory experiment with enzymes. *Journal of Chemical Education*. 4: 56-63.
10. Garcia Borrón J.C., Solano F., Iborra J.L., Lozano J.A. (1985). Aggregation equilibria of tyrosinase of Harding-Passey mouse melanoma. *Biochemical Journal*. 228: 95-101.
11. Garcia-Borrón J.C. and Solano, F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15:162-173.
12. Hsu C.K., Chang C.T., Lu H.Y., Chung Y.C. (2007). Inhibitory effects of water extracts of *Lavendula* sp. on mushroom tyrosinase activity. *Food Chemistry*. 105: 1099-1105.
13. Jolivet S. Arpin N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102: 1459-1483.
14. Kwon, B.S., Haq A.K., Pomerantz S.H., 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.
15. Lou H., Yuan H., Ma B., Ren D., Ji M., Oka, S. (2004). Polyphenols from peanut skins and their free radical-scavenging effects. *Phytochemistry*. 65(16): 2391-2399.
16. Marcio S.T., Fabricio P. (2008). A Wounding-induced ppo from cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48 (9): 3839-3846.
17. Marques L., Fleuriet A., Machiex J.J. (1995). Characterization of multiple forms of polyphenol-oxidase from apple fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 33: 193-200.
18. Nunez-Delicado E., Sojo M.M., Garcia-Carmona F., Sanchez-Ferrer A. (2003). Partial purification of latent persimmon fruit polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2058-2063.



19. Matheis G. and Belitz H.D. (1977). Studies on Enzymic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*) III. Kinetics of Potato Phenoloxidase. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 163: 191-195.
20. Mayer A.M., Staples R.C. (2002). Laccase: New function for an old enzyme. *Phytochemistry.* 60: 551-565.
21. Nakamura T., Sho S., Ogura Y. (1966). On the purification and properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biochemistry.* 59 (5): 481-486.
22. 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.
23. Rast D.M., Baumgartner D., Mayer C., Hollenstein G.O. (2003). Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry.* 64: 339-366.
24. 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.
25. Sánchez-Ferrer A., Bru R. Cabanes J., García-Carmona F. (1988). Characterization of cresolase and catecholase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase *Phytochemistry.* 27: 319-321.
26. Sariri R., Mozafarzadeh Z., 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.
27. Scotter A.J, Kuntz D.A., Saul M., Graham L.A., Davies P.L., Rose D.R. (2006). Expression and purification of sea raven type II antifreeze protein from *Dorsophila melanogaster* S2 cells. *Protein Expression and Purification.* 47: 374-383.
28. Strothkamp K.G., Lolley R.L., Manson H.S. (1976). Quaternary Structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical Biophysical Research Communication.* 70: 519-524.
29. Thipyapong, P., 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.
30. Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochem* 45: 1309-1323.
31. Waliszewski, K.N., Marquez, O., Pardo, V.T. 2009. Quantification and characterization of polyphenol oxidase from vanilla bean. *Food Chemistry* 117 (2): 196-203.
32. Wong, T.C., Luh, B.S., Whitaker, J.R. 1971. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isozymes of Clingstone Peach. – *Plant Physiol.* 48(1): 19-23.

