

Fulvik ve hümik asitlerin tirozinaza karşı yapısal ve inhibitör etkileri

Negar Taherkhani¹ | Azade Hikmet¹ | Hüseyin Piri² | Kamahdin Haghighbeen³

¹Biyoloji Bölümü, Bilim ve Araştırma Şubesi, İslami Azad Üniversitesi, Tehran, İran

²Hücre ve Moleküler Araştırma Merkezi, Olmayan Ölçüm Araştırma Enstitüsü, Bulaşıcı Hastalık, Qazvin Tıp Bilimleri Üniversitesi, Qazvin, İran

³Biyokimya ve Biyofizik Bölümü, Ulusal Enstitüsü, Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji, Tehran, İran

Yazışma Azadeh Hikmet, Biyoloji Bölümü, Bilim ve Araştırma Şubesi, İslami Azad Üniversitesi, Tehran, İran.

Soyut

Tirozinaz aktivitesinin inhibisyonu, meyvenin esmerleşmesini kontrol edebilir ve lezzetini koruyabilir ve gıdanın besin değeri. Fulvik asit (FA) ve hümik asidin (HA) ty üzerindeki etkileri tirozinaz aktivitesi, dairesel dikroizm (CD) ve floresan kullanılarak araştırıldı. Spektroskopik analizler, moleküler yerleşme (MD) ve moleküler dinamik simülasyonları. HA ve FA, sırasıyla K_i 2.02 ve 5.2 μM ile karışık bir inhibisyon tipi gösterdi. Termodinamik parametreler, hidrojen bağ ve hidrofobik kuvvetin olduğunu gösterdi.

Sırasıyla FA-tirozinaz ve HA-tirozinaz etkileşiminde önemli bir rol oynar.

Floresan deneyleri, tirozinaz tersiyer yapılarında değişiklikler göstermiş tir.

HA, tirozinazın sekonder yapısını önemli ölçüde tahrip edemedi, ancak FA

tirozinazın sekonder yapısı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Moleküler dynamics bulguları, minimum dalgalanmaları ve en düşük esnekliği gösterdi.

HA-tirozinaz ve FA-tirozinaz etkileşimindeki kompleks amino asitler, tamamen,

HA ve FA, gıda endüstrilerinde ty için erişilebilir bir doğal kaynak olarak kullanılabilir.

Tirozinaz inhibisyonu.

Pratik uygulamalar

Son zamanlarda, biyosferden gelen tirozinaz inhibitörlerinin engellenmesi için araştırılması

gıda endüstrisinde istenmeyen esmerleşme önemli ölçüde artmıştır. Mantar

tirozinaz, bulunabilirliği nedeniyle kinetik araştırmalar için uygun bir modeldir.

Bir memelide tirozinaz ile yakın konformasyonel benzerlik. Doğal kaynaklar ve bunların

etkili bileşikleri, tirozinaz aktivitesi ve yapısı üzerinde harika bir potansiyele sahip olabilir.

Dolayısıyla bu çalışmada tirozinaz ve fulvik asit (FA) arasındaki etkileşimler ve

Hümik asit (HA) araştırıldı. Daha önce, HA ve FA'nın sahip olduğu gösterilmiş tir.

Antioksidan özellikler ve geciktirici lipid yoluyla gıda kalitesini artırabilirler.

oksidasyon. Tamamen, kesin sonuçlara varmak için daha fazla araştırma yapılması garanti edilir,

HA ve FA, gıda endüstrisinde sadece antioksidan ajanlar olarak değil, aynı zamanda

tirozinaz inhibisyonu için erişilebilir bir doğal kaynak olarak.

ANAHTAR KELİMELER

fulvik asit, hümik asit, moleküler yerleşme (MD), spektroskopik analiz, tirozinaz inhibisyonu

1 | GİRİŞ

Enzimler canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandırır ve biyolojik süreçlerde önemli rol oynar (Robinson, 2015).

Tirosinaz (EC 1.14.18.1), bakirlerde, memelilerde ve prokaryotlarda yaygın olarak dağıtılan iki işlevli ve glikosile edilmiş bir enzimdir.

Tirosinaz, katalitik döngüsünde iki aktiviteye sahiptir, yani bu bakir içeren enzim, sırasıyla difenollerin ve mono fenollerin oksidasyonunu ve hidroksilasyonunu katalize eder (Gheibi ve diğerleri, 2015; Janok & Sansenya, 2020). Doğal olarak, L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) ve ayrıca L-tirozin, sırasıyla oksidaz (difenolaz) ve oksijenaz (monofenolaz) aktivitesinin substratlarıdır.

Tirosinaz, L-DOPA oluşumunu tirozinin hidroksilasyonunu katalize eder.

Ayrıca, L-DOPA'yı DOPA kinine katalize eder. Daha sonra, kinonlar kimyasal olarak melaninlere ve diğer polifenolik bileşiklere dönüşür (Ahipornchai ve diğerleri, 2021).

Tirosinaz ince kimya endüstrisinde, çevresel uygulamalarda, gıda ve ilaç dondurmada kullanılır. Memelilerde melanogenezin yanı sıra sebzelerin, mantarların ve meyvelerin esmerleşmesinden sorumlu olan başlıca enzimdir (Zhou ve diğerleri, 2016). Gıda endüstrisinde, tirozinazın aktivitesi ve ardından fenollerin melanin oluşumuna katkı yapmasını önlemek için oksidasyonu

gıdanın lezzetini ve besin değerini azaltan istenmeyen

(Li ve diğerleri, 2021). Bu nedenle, tirozinaz aktivitesinin önlenmesi bilim adamlarını tirozinaz inhibitörleri tasarlamaya yönlendirir.

Tirosinazın kritik rolü nedeniyle, çeşitli sentetik veya doğal kaynaklardan tirozinaz inhibitörlerinin saptanması üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (Zolghadri ve diğerleri, 2019). Pterocarpus santalinus'ta doğal bir kırmızı bileşen olan santalinin antitirozinaz aktivitesi bildirilmiştir (Hridya ve diğerleri, 2016).

Anantharaman ve ark. krosin, norbiksin ve biksinin (apocinonoidler bileşikler) tirozinaz aktivitesine karşı inhibitör etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Tirosinaz aktivitesinin krosin ve norbiksin tarafından inhibisyonunun karışık rekabetçi tipte olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte, biksin, tirozinaz aktivitesini karışık tip bir mekanizma ile inhibe etmiştir (Anantharaman ve ark., 2016). Aromatik tiyosemikarbazonların tirozinaz üzerindeki inhibe edici etkileri, Hal dys ve diğerleri tarafından da araştırılmıştır. İncelenen moleküllerin yapısı ile inhibitör aktiviteleri arasında bir ilişki olduğunu sergileyen kişi (Hal dys ve diğerleri, 2018). İnsan tirozinazı ile çalışmanın karmaşıklığı ve mutabelli tirozinazı ile mantar tirozinazı arasındaki davranış benzerlikleri nedeniyle mantardaki tirozinaz üzerinde çok sayıda kinetik araştırma yapılmıştır (Hassani ve ark., 2018). Molekül ağırlığı yaklaşık 120 kDa olan mantar tirozinazı asimetrik bir tetramerdir (H2L2). Aktif mantar tirozinazının daha ağır alt birimlerinin her ikisi de ~43 kDa'dır ve bir nükleer Cu aktif bölge taşıyan, mantar tirozinazının daha hafif alt birimlerinde aktif bölge yoktur (Hassani ve diğerleri, 2018).

(FA'lar), humin ve hümk asitler (HA'lar) (Peña-Méndez ve diğerleri, 2005;

Tan, 2014). Humin suda çözünmez, serbest formdaki HA bileşikleri suda bazik ve nötr çözeltilerde çözülebilirken, FA

serbest formdaki bileşikler, tüm pH değerlerinde suda çözülebilir. Genel olarak, HA'lar, sırasıyla HA'lardan daha az karbon ve daha fazla oksijen içeren FA'lardan daha büyüktür (Albers ve diğerleri, 2008; Christl ve diğerleri, 2008). Hümk maddeler, polielektrolit bir yapıya sahip, kimyasal olarak karmaşık ve amorf bir yapıya sahiptir. HA'larda, önemli tıbbi veya farmasötik özelliklere sahip bileşikler vardır.

Çeşitli çalışmalar hümk maddelerin detoksifikasyona sahip olduğunu göstermiştir.

antiinflamatuar, antikanser, antiviral, antiinflamatuar ve proinflamatuar, antiaging ve antidiyabetik özellikler (Bondareva & Kudryasheva, 2021; Jacob ve diğerleri, 2019; van Rensburg, 2015). FA maddelerinin antibakteriyel, antiinflamatuar, kırışıklık önleyici ve detoksifikasyon etkilerinin olduğu daha belirgin hale gelmektedir (Kinoshita ve diğerleri, 2012; Wahyudi ve diğerleri, 2010; You ve diğerleri, 2021). FA'lar, HA'lardan daha az tersinir redoks bölgelerine (örn., kinon parçaları) ve daha düşük ortalama moleküler ağırlığa sahiptir, ancak HA'lar, FA'lardan daha fazla renk ve aromatiklik gösterir (Li ve diğerleri, 2016). Hümk bileşiklerinin lizozim (Tan ve diğerleri, 2008, 2009), Cry1Ab proteini (Sander ve diğerleri, 2012; Tomaszewski ve diğerleri, 2012) ve siğir serumu diğerleri ile

büyük miktarda (BSA) (Guan ve diğerleri, 2018) araştırılmış ve elektrostatik etkileşimlerin yanı sıra hidrofobik etkileşimlerin önemli olduğu belirtilmiştir.

FA'ların ve HA'ların glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitesine karşı inhibe edici etkileri bildirilmiştir (Alfi, 2017).

Hümk bileşikler, doğada en geniş dağılıma sahip veya organik maddeler arasındadır ve toprak bilimlerinde önemli 150 yılı aşkın süredir kabul edilmektedir. Ayrıca besin takviyesi olarak hümk maddeler önerilmektedir. Hümk bileşiklerinin moleküler ve biyokimyasal etkilerinin ortak göstergesiyle uyumlu olarak, bu bileşiklerin enzimleri inhibe etmek için sağlam adaylar olabilir. Bu nedenle, bu çalışmada, tirozinazın gıda endüstrisindeki etkisi ve doğal kaynakların ve bunların etkili bileşiklerinin tirozinaz aktivitesi ve yapısı üzerinde harika bir potansiyele sahip olabilmesi nedeniyle, tirozinaz ve hümk maddeler (HA ve FA) arasındaki etkileşimler araştırılmıştır. Bu çalışmada sunulan tüm bilgiler, gıda endüstrilerinde tirozinaz aktivitesine karşı pratik ajanların araştırılmasına yol açabilir.

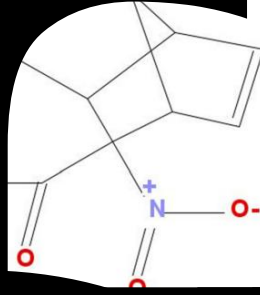
Agaricus bisporus mantar tirozinazı (liyofilize toz, 3600 U/mg, Ürün No. T3824), 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA), fulvik asit (C14H12O8, toz, Ürün No. 25195, Şekil 1a) ve hümk asit (toz, Ürün No. 53680, Şekil 1b) Sigma Co., St. Louis, MO, ABD'den temin edilmiştir. Na2HPO4 ve NaH2PO4 Merck Co., Almanyadan temin edilmiştir. Tüm deneyler fosfat tamponlu salin (PBS; pH 6.8; 10 mM) içinde yapıldı. Tampon, Barnstead Nanopure tarafından çift damıtılmış su ile hazırlandı (ER = 18.3 MΩ).

Biyokütlenin değerli maddelerinden biri olan hümk maddeler (HS)

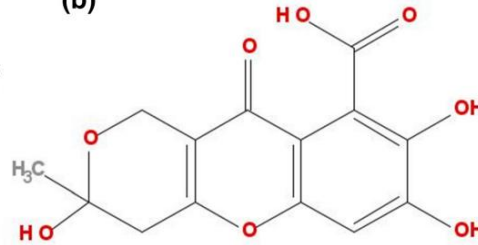
küre, topraktaki birçok kimyasal ve fiziksel süreçten sorumludur. Hümk maddeler, hayvansal, bitkisel ve mikrobiyolojik kaynaklı yüksek moleküler kütleli maddelerin organizasyonu ile üretilir.

Toprak organik maddesinin yapısal olarak özelleşmiş bir elementidir.

Hümk bileşikler üç kategoriye ayrılır: fulvik asitler



(b)



2.2 | Enzim tahlihi ve kinetik parametrelerin ölçümü

otome
tir (Ya
n tiroz
ilir hızı
assanı
ktrofot
= 3700
yon ort
asyon
zinaz

san (Pashah ve diğerleri,

2.4 | Dairesel dikroizm (CD) ölçümleri

2 nm çözünürlük ve 20 nm dk-1 hızlı
izm Spektrometresi, Model 215, ABD
çözeltilisine (17 mg/ml) FA (12 µM) veya HA
umları, bir kuvars hücre ve 1 yol uzunluğu
poyu aralığında değerlendirildi. mm. CD
ımı (CDNN, sürüm 2.1) CD spektrumlarını

2.5 | Moleküler dinamik (MD) simülasyonu

9407) ve hümik asidin (giriş kodu:
si, NCBI PubChem Bileşik Veritabanından
si (PDB ID: 2Y9X), RCSB Protein Data
retilmiş tir. Ligand için izin verilen
arama alanı koordinatlarını ayırt etmek
mak için AutoDock programı
diğerleri, 2
enle
26 ızgara
gerçekleştirildi. Intra fulvik asit-
az
inin en düşük
aat eden en iyi poz,
çildi.

2.3 | İçsel floresan ölçümleri

incelemelerin elde edilmesini sağlamak için, tirozinaz konsantrasyonu
ve numune hacmi sabit tutularak, söndürücü absorpsiyonundan üretilen
emiyon ve uyarma sinyalleri zayıflamasından etkilenen iç filtre darbe
düzeltmesi için [Denklem 1](#) uygulandı (Hekmat ve diğerleri, 2021):

$$F_{\text{düzeltilmiş}} = F_{\text{oblar}} / (10(A_{\text{bex}} + A_{\text{bem}}) / 2)$$

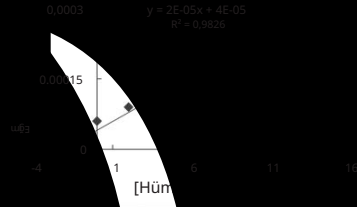
Abem, Abex, Fobs ve Fcor emiyon dalga boylarının yanı sıra emiyondaki karışım
absorpsiyonu, gözlenen floresans

rogramı (sürüm 4.5.4)
simülasyonlar için CHARMM 36
am ve diğerleri, 2001). 3 noktalı (TIP3P) su
moleküler potansiyelde aktarılabılır olarak, tiroz inaz, FA-
A-tirozinaz kompleksleri, tiroz inazın en uzak atomundan
10 Å uzaklıkta bir kübik kutu içinde çözüldü. Çözücüyü nötrale etmek
için sisteme klorür (Cl⁻) ve sodyum (Na⁺) iyonları eklendi. Daha sonra

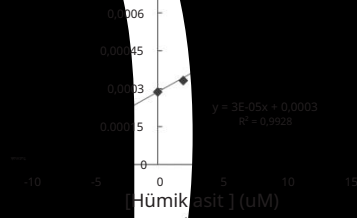
50 mM CaCl₂ ve NaCl eklendi. En dik iniş yöntemi
enerji minimizasyonu gerçekleştirildi. Sistemlerin
ine izin vermek için, tüm solventler 1 ns MD simülasyonu

(1)

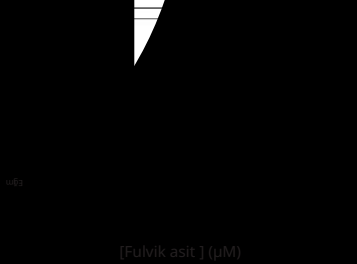
(A)



(B)



1/[K] (M)-1



[Fulvik asit] (µM)

[Fulvik asit] (µM)

1/[K] (M)-1

Ş EKİ L 2 HA (a) ve FA (b) varlığında tirozinaz inhibisyonu için Lineweaver-Burk grafiği. HA ve FA konsantrasyonları 0,1, 0,5, 1 ve ayrıca 1,5 µM idi. Ekler, eğim grafiğini veya dikey kesim noktalarını kullanarak çizildi.

insantrasyonları 2, 6, 9 ve 12 µM idi. L-DOPA konsantrasyonlarını belirler. Çizgiler, doğrusal en

3.3 | Floresan söndürme mekanizması

Genel olarak, söndürme, dinamik söndürmenin yanı sıra statik söndürme olarak sınıflandırılır. Tirozinazın HA ve FA'ya bağlanma mekanizmasını belirlemek için floresan yoğunluk verileri klasik Stern-Volmer denklemi (Denklem 5) (Zhang ve diğerleri, 2014) aracılığıyla değerlendirildi.

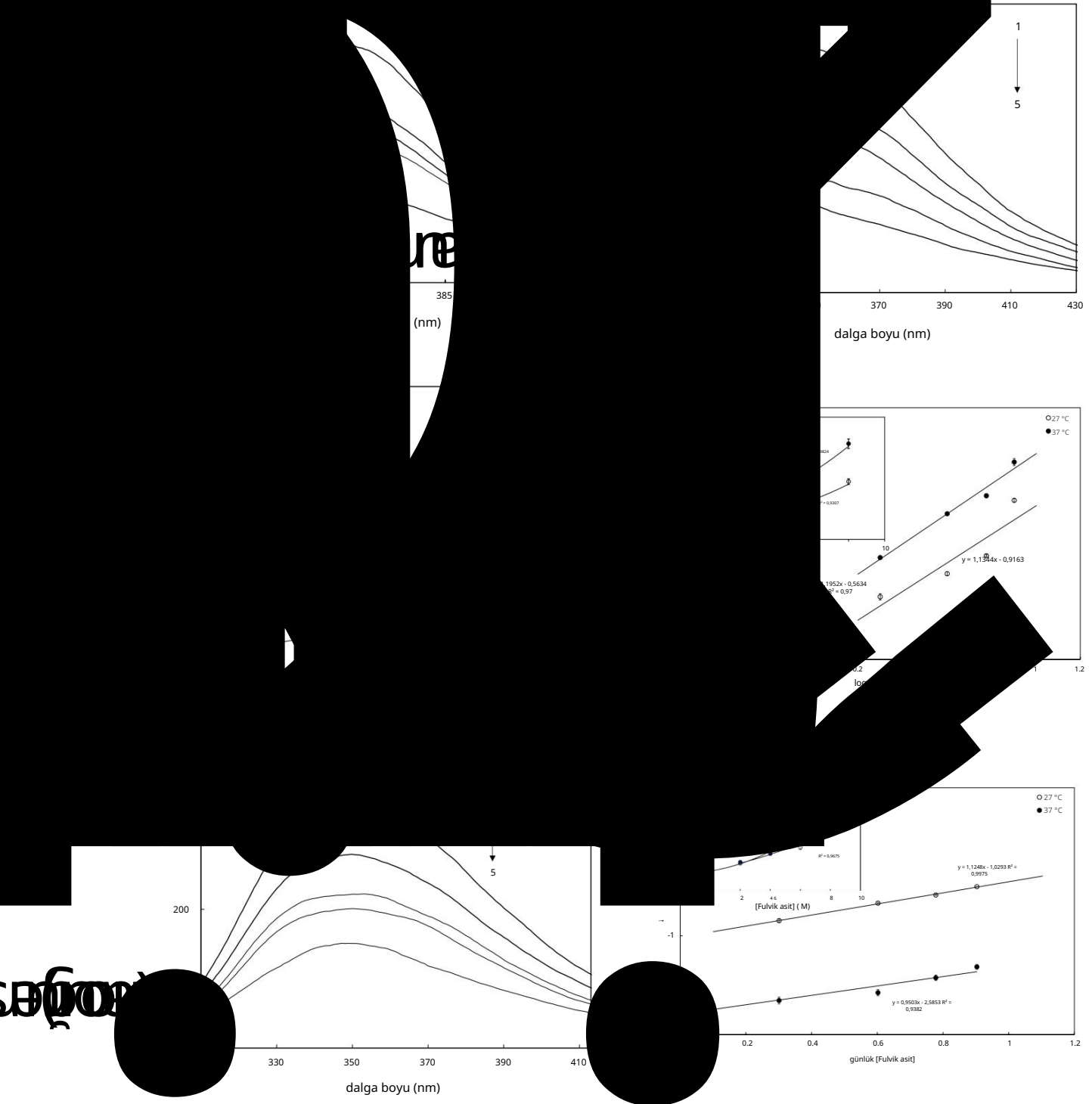
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (5)$$

Bu denklemde, F, F₀ K_{sv} ve [Q], sırasıyla söndürücü (HA veya FA) ile floresan yoğunluğu, söndürücü olmadan floresan yoğunluğu, Stern-Volmer söndürme sabiti ve HA veya FA konsantrasyonlarıdır. Denklem 5'i uygulayarak,

HA veya FA) çekildi. Ş ekil 3e, f'deki eklerde gösterildiği gibi, Stern-Volmer çizimi pozitif bir sapma gösterdi. Sonuç olarak, HA'nın tirozinaza bağlanma mekanizması, esas olarak floresan söndürme mekanizması (statik söndürme) yoluyla başlatıldı (Hekmat et al., 2021).

Tirozinazda bağımsız ve eş değer bağlanma gruplarının olduğu varsayarak, her iki sıcaklıkta da HA-tirozinaz ve FA-tirozinaz için n (bağlanma yeri sayısı) ve K_A (bağlanma sabiti) değerleri belirlendi. Denklem 6 ile birlikte (Lu ve diğerleri, 2016), K_A ve n hesaplandı (Tablo 1).

$$\log \frac{F_0}{F} = \log K_A + n \log [Q] \quad (6)$$



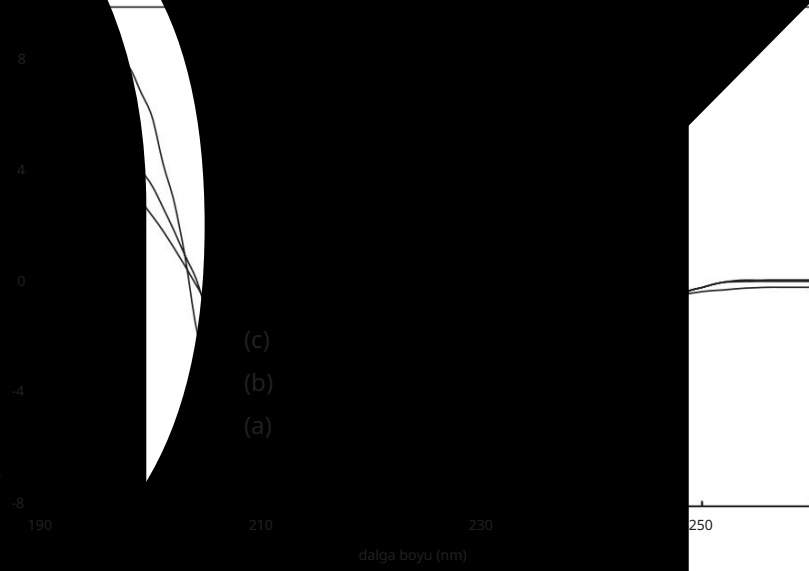
Ş EKİ L 3 27°C (a) ve 37°C (b)'de çeş itli HA konsantrasyonları eklendikten sonra tirozinazın floresan emisyon spektrumları; ve FA'nın 27°C (c) ve 37°C (d)'de. Serbest tirozinazın floresan emisyonu (1), artan inhibitör konsantrasyonları (2-5) ile floresan söndürme. Değış ken HA (e) ve FA (f) konsantrasyonlarının varlığında tirozinazın değış tirilmiş stern-Volmer grafiğ. Ek, çeş itli inhibitör konsantrasyonlarının varlığında klasik stern-Volmer tirozinaz grafiğini gösterir. Veriler, üç bağımsız ölçüm ± SD aracılığıyla elde edilir.

n değeri , reaksiyon stokiyoimetrik sayısıdır ve tirozinazın yüzeyindeki eriş ilebilir bağanma bölgelerinin miktarını gösterir (Hekmat ve diğ erleri, 2022). Analizimize göre, her iki sıcaklıktaki n değ erleri neredeyse 1'e eş itti, bu da HA veya FA'nın bağanabileceğini düş ündürür.

1:1'lik bir eklenti, yani bir molekül HA veya FA'nın bir molekül tirozinaz ile birleş mesi ve tirozinazdaki sadece bir bağenin HA veya FA'ya reaktif olması. Bu sonuç, bir sistemin moleküler popülasyonunun her iki sıcaklıkta da neredeyse eş it katkıda bulunduğunu önermektedir.

TABLO 1 FA-tirozinaz kompleksi ve HA-tirozinaz kompleksi için iki farklı sıcaklıkta termodinamik parametreler ve bağanma sabitleri

T	G°	ΔH°	S°
(K)	(kJ Mol ⁻¹)	(kJ Mol ⁻¹ K ⁻¹)	(J Mol ⁻¹ K ⁻¹)
307.46	-828,42		



Ş EKİL 4 Hümk asit (b) ve fulvik asit (c) yokluğunda ve varlığında tirozinazın uzak UV CD spektrumları.

tirozinaz ile HA veya FA kompleksi oluşumundaki moleküler etkileşimlere (Hekmat ve diğerleri, 2022). KA, mesleğ küçük moleküler substratın bir reseptöre afinitesine dayanan bir biyomakromolekülde bağanma bölgelerinin varlığının bir göstergesidir (Hekmat ve diğerleri, 2022). KA'nın yüksek olması, HA'nın tirozinaz ile FA'dan daha büyük bir bağanma kabiliyetine sahip olduğunu ima etti. Böylece HA, L-DOPA'nın aktif bölgelere bağanmasını önleyebilir. Bu sonuç, Lineweaver-Burk çizimlerinden elde edilen bulgularla ilişkilidir. Tablo 2'ye göre, sıcaklığın yükseltmesi, tirozinazın yapısında HA'nın tirozinaz molekülüne bağanmasını sağlayan ("KA"yı arttıran) bazı konformasyonel değişikliklere neden olabilir. Bu fenomen, sıcaklığın sulu bir ortamdaki hidrofobik etkileşimlerin gücünü artırabilmesi nedeniyle, HA-tirozinaz bağama işleminde hidrofobik kuvvetlerin rolünü gösterir. Buna karşılık, bağanma işlemi esas olarak hidrojen bağ ve/veya elektrostatik etkileşimlerle başlatılıyorsa, KA değerinin düşürülmesinin tespit edilmesi beklenir (Hekmat ve diğerleri, 2021). Böylece, hidrojen bağ, FA'nın tirozinaz ile bağanmasında ana rolü oynar. Bununla birlikte, hidrofobik kuvvet, HA'nın tirozinaz ile bağanmasında önemli bir rol oynar.

3.4 | Bağayıcı kuvvet tayini

KA, mutlak sıcaklık (T) ve evrensel gaz sabiti (R) kullanılarak standart Gibbs serbest enerji değişimi (ΔG°), Denklem 7'den belirlenebilir (Ahmad ve diğerleri, 2011; Hekmat ve Saboury, 2019):

$$\ln K_A = -\frac{\Delta G^\circ}{RT} \quad (7)$$

ΔG° büyüklükleri HA ve FA için her iki sıcaklıkta hesaplanmıştır (Tablo 1). ΔG°'nin negatif değerleri, HA veya FA'nın tirozinaza bağanmasının kendiliğinden olduğunu gösterir (Rahman ve diğerleri, 2019). Van't Hoff denklemi (Denklem 8) kullanılarak entropi değişimi (ΔS°) ve entalpi değişimi (ΔH°) değerleri belirlendi (Hekmat ve Saboury, 2019).

$$\ln K_A = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (8)$$

Literatürle uyumlu olarak, ΔS° < 0, ΔH° < 0 ise hidrojen bağ etkileşiminde ana etkiyi gerçekleştiren ve ΔS° > 0, ΔH° > 0 ise ana kuvvet hidrofobik etkileşimdir (Hekmat ve Saboury, 2019).

Buna göre, HA-tirozinaz etkileşiminde, ΔS° ve ΔH° değerlerinin pozitif değerleri, hidrofobik kuvvetin temel bir rol oynadığını göstermektedir (Hekmat ve Saboury, 2019; Moosavi-Movahedi ve diğerleri, 2004).

FA-tirozinaz etkileşiminde, negatif ΔS° ve ΔH° değerleri hidrojen bağının ana etkiyi gerçekleştirdiğini gösterir.

3.5 | İkincil yapı analizi

Tirozinazın CD spektrumları, ~222 nm ve ~212 nm'de iki negatif maksimum gösterdi (Şekil 4), bu da n-π* geçişinin yanı sıra α-sarmal yapısının π-π* geçişini

tirozinaz (Yang ve diğ.leri, 2016). Tirozinaz solusyonuna HA veya FA'nın eklenmesinden sonra, tirozinazın CD sinyali önemli bir bant kayması olmadan azaldı, bu da a-heliksel yapının içerik düşüşüne işaret ediyor. Tablo 2'de gösterildiği gibi, tirozinazın doğal formu %49.7 a-helikslere, %11.3 p-yapraklara, %19.8 β-dönüşlere ve %19.2 düzensiz sarmallara sahipti. HA ve FA'nın eklenmesinden sonra, α-sarmalının azalması sırasıyla %46,5 ve %44,3 oranında arttı. HA ve FA sonuçlarının karşılaştırılması, FA'nın enzim yapısındaki kararsızlığı HA'dan daha fazla etkilediğini göstermektedir. Sonuç, tirozinazın amino asit kalıntılarıyla birleşen HA veya FA'nın hidrojen bağ oluşumunu bozduğunu ve tirozinazın konformasyonunda varyasyonları indüklediğini öne sürdü (Ding ve diğ.leri, 2019). Şimdiye kadar tirozinazın katalitik aktivitesi ile ikincil yapısı arasındaki ilişkinin belirsiz olduğu belirtilmiştir. Daha önceki literatürde, küçük mol etkileşimi

tirozinazlı eküller, hidrojen ağarını ortadan kaldırabilir ve sonunda indirgenmesine neden olan yapısal varyasyonları başlatabilir.

TABLE 2 27°C'de fulvik asit ve hümkik asidin varlığında ve yokluğunda tirozinazın ikincil yapısının içeriği

	α-sarmalı (%)	β-Sayfa (%)	β-Dönüş (%)	Rastgele bobin (%)
serbest tirozinaz	49.7	11.3	19.8	19.2
HA-tirozinaz	46.5	12.2	20.1	21.2
FA-tirozinaz	44.3	12.4	21.5	21.8

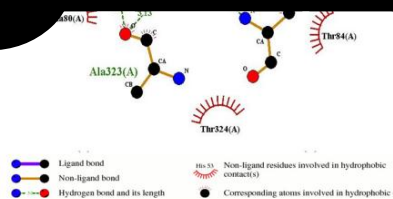
tirozinaz aktivitesi (Anantharaman ve diğ.leri, 2016; Fan ve diğ.leri, 2017; Yang ve diğ.leri, 2016; Yu ve diğ.leri, 2019). Bununla birlikte, bazı literatürde inhibitörler tirozinaz aktivitesini iyi bir etkinlikle inhibe etmelerine rağmen tirozinazın ikincil yapısını deşiremezler (Mu ve diğ.leri, 2013; Yu ve diğ.leri, 2019). Bu nedenle, HA'nın moralini bozmayacağı sonucuna varabiliriz.

tirozinazın ikincil yapılarını önemli ölçüde düzenler, ancak tirozinaz aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Aksine FA, tirozinaz aktivitesinin ikincil yapısı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve bu nedenle tirozinaz aktivitesini inhibe edebilir.

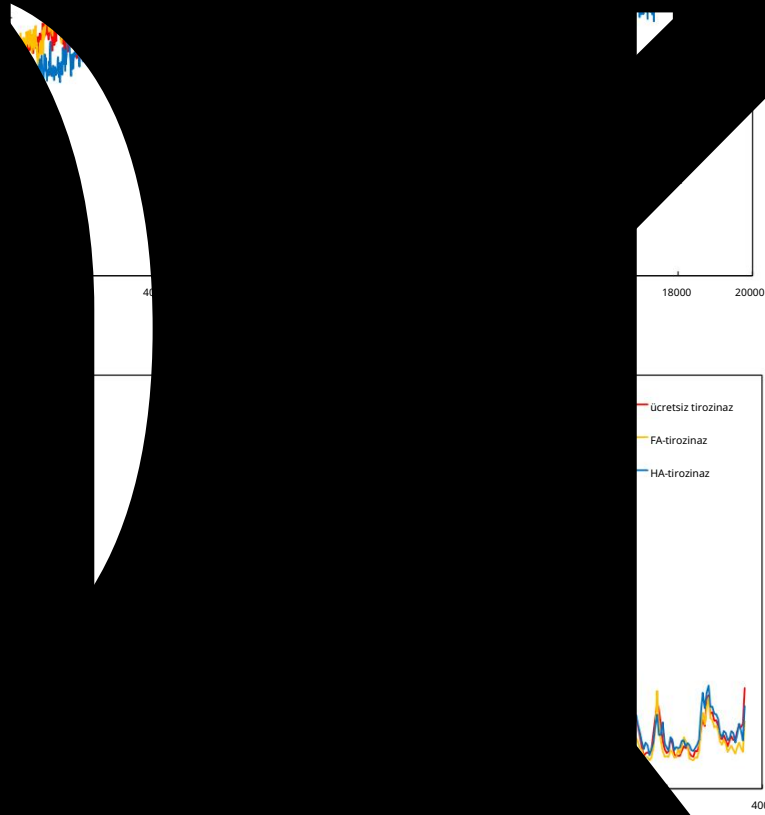
3.6 | Moleküler yerleş-tirme (MD) ve moleküler dinamik sonuçları

MD, HA veya FA'nın tirozinaz üzerindeki spesifik bağlanma bölgeleri ile bağlanmasını değerlendirmek için yapıldı. Yerleş-tirme sonuçları, HA ve FA'nın tirozinazın aktif bölgesine sırasıyla -4.2 ve -6.4 kcal/mol en düşük bağlanma enerjileriyle bağlanabileceğini ortaya koydu. Genel bir kural olarak, enzim-inhibitör bağlanmasının en düşük bağlanma serbest enerjisinin MD simülasyonu için model olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Farasat ve diğ.leri, 2020; Jamali ve diğ.leri, 2019). 2D çizimler

MD simülasyonunun tirozinaz inhibitör komplekslerinin sayısı Şekil 5'te gösterilmektedir. Bu Şekil, H-bağarına katılan tirozinaz kalıntılarını ve bunların uzunluğunu yeşil kesikli bir çizgiyle gösterir. Hidrofobik kuvvetlere katılan ligand olmayan kalıntılar



Şekil 5 Tirozinaz ile HA ve FA'nın moleküler yerleş-tirme modeli. HA-tirozinaz (a) ve FA-tirozinaz (b) yerleş-tirme modelinin 2B projeksiyonu. Şekil LigPlot'ta oluşturuldu. Tirozinaz aktivite merkezine yanşı an HA (c) ve FA (d)'nin 3B haritası.



Ş EKİL 6 Simülasyon süresinin bir fonksiyonu olarak MD simülasyonlarının bulguları. (a) serbest tirozinaz, HA-tirozinaz ve FA-tirozinaz komplekslerinin RMSD değeri. (b) serbest tirozinaz ve HA-tirozinaz ve FA-tirozinaz komplekslerinin RMS dalgalanma değeri.

kahverengi ip ile gösterilmiş tir. Her iki inhibitör de tirozinazın hidrofobik cebine uzandı. Enzim-inhibitör (HA veya FA) kompleksinde, FA ile Glu-322 (bağ uzunluğu: 3,29 Å), Ala-323 (bağ uzunlukları: 2,94 ve 3,13 Å), Cys-83 (bağ uzunluğu: 3,06 Å), His-85 (bağ uzunlukları: 2,88 ve 3,25 Å) ve Asn-81 (bağ uzunluğu: 3,18 Å), HA ve Ala-323 (bağ uzunluğu: 2,97 Å), Asn-81 (bağ uzunluğu: 3,08, 3,05 ve 3,14 Å), Tyr 65 (bağ uzunluğu: 2,92 Å) kalıntıları arasında beş hidrojen bağ tespit edildi. HA-tirozinaz etkileşimi için 2 kalıntı (Glu-322 ve Ala-80) hidrofobik etkileşime dahil edildi, ancak FA-tirozinaz etkileşimi için 3 kalıntı (Thr-324, Thr-80 ve Ala-80) hidrofobik etkileşime dahil edildi. Etkileşim.

RMSD, simülasyon yoluyla sistem dengesini hesaplamak için kullanılan etkili bir araçtır. RMSF değeri, yapısal dalgalanmalar ve enzim esnekliği hakkında daha iyi fikir sunar (Farasat ve diğerleri, 2020). Yukarıda belirtilen komplekslerin RMSD raporları, sistemlerin yaklaşık 5 ns sonra stabilize edildiğini ortaya koyan Ş ekil 6a'da gösterilmektedir. Simülasyonun son 5 ns'sinde serbest tirozinaz, HA-tirozinaz ve FA-tirozinazın ortalama RMSD değerleri sırasıyla 0,28, 0,26 ve 0,25 nm idi. Substrat-tirozinaz ve HA-tirozinaz veya FA-tirozinaz arasındaki RMSD farkları 0,2 nm'nin altındaydı.

RMSF'nin değeri, esnekliğin yanı sıra tirozinaz yapısının dalgalanmaları hakkında daha iyi bilgi sunar (Farasat ve diğerleri, 2020).

Substrat-tirozinaz ve HA-tirozinaz veya FA-tirozinazın RMSF değerleri Ş ekil 6b'de gösterilmektedir. Ş ekilde gösterildiği gibi, amino asit kalıntıları için her bölge, 203-221 kalıntıları dışında eşit RMSF değerlerine sahipti. Yukarıda belirtilen kalıntılardaki substrat-tirozinaz kompleksi dalgalanması, HA-tirozinaz veya FA-tirozinazdakinden farklıydı. Bu, HA veya FA'nın varlığında, enzimin bu kalıntıların yakınında, tirozinazda düşük dalgalanma ve esneklik oluştuğundan daha az esnekliğe sahip olduğu anlamına gelir.

4 | ÇÖZÜM

Bildiğimiz kadarıyla bu araştırma, tirozinazın FA veya HA ile etkileşimlerini açıklamaya çalışılan ilk çalışmadır. Bulgular, FA ve HA'nın güçlü inhibisyon aktivitesi sergilediğini ve bu bileşiklerin tirozinaz aktivitesini karışık tipte inhibe ettiğini gösterdi. Termodinamik analiz, CD spektroskopisi analizi ve MD çalışması, hidrofobik etkileşimin HA-tirozinaz bağlanmasında ana itici güç olduğunu gösterdi. Ancak, FA'da

ve tirozinaz etkileşimi, hidrogen bağ ana etkiyi gerçekleştiren, HA, tirozinazın ikincil yapılarına önemli ölçüde zarar veremedi, ancak enzim aktivitesi üzerinde büyük bir etkisi oldu. Tersine FA, tirozinazın sekonder yapısı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve tirozinazın katalitik aktivitesinin azalmasına neden olabilir. Ayrıca, bir tirozinaz molekülü ve tirozinazda yalnızca bir bölge ile birleştilmiş bir FA veya HA molekülü, FA veya HA'ya reaktiftir. Böylece, her iki doğal bileşik de farklı mekanizmalarla tirozinaz aktivitesini inhibe edebilmektedir. Daha önce, HA ve FA'nın antioksidan özelliklere sahip olduğu ve lipid oksidasyonunu geciktirerek gıda kalitesini artırabileceği gösterilmiş tir.

Toplamda, kesin sonuçlara varmak için daha fazla araştırma yapılması gerekirse de, HA ve FA gıda endüstrilerinde kullanılabilir.

Sadece antioksidan maddeler olarak değil, aynı zamanda tirozinaz inhibisyonu için erişilebilir bir doğal kaynak olarak. Bu maddeler topraktan veya yaprak spreyi olarak, kimyasallar/gübreler ile birlikte veya kendileri.

TEŞEKKÜRLER

Tahran Üniversitesi Biyokimya ve Biyofizik Enstitüsü'nden teknik destek takdirle karşılandı.

FİNANSMAN BİLGİLERİ

Bu çalışmada, ticari, kamu, devlet veya kar amacı gütmeyen kuruluşlardaki herhangi bir fon kuruluşundan belirli bir hibe veya fon alınmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Tüm yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

Mevcut çalışmada kullanılan ve/veya değerlendirilen veri setlerine ilgili yazar aracılığıyla erişilebilir.

ETİK STANDARTLARA UYUM

Bu makale, yazarlardan herhangi biri tarafından oluşturulmuş hayvanlar veya insan katılımcılar ile yapılan herhangi bir deney içermemektedir.

ORCID

Azade Hikmet <https://orcid.org/0000-0003-0123-1575> Kamahidin Haghbeen <https://orcid.org/0000-0003-3011-5629>

REFERANSLAR

- Afifi, M. (2017). Organik gübrelerdeki humik maddeler, özellikleri ve etkileri. *Küçük Çiftlik*, 1(1), 1-10. Nur Yayıncılık.
- Ahmad, E., Rabbani, G., Zaheer, N., Singh, S., Rehan, M., Khan, MM ve Ashraf, MT (2011). Spektroskopik, kalorimetrik ve biyoinformatik ile incelenen insan serum albuminin enantiyomerik ve izoelektronik kirlenme stereo seçiciliği. *PLoS Bir*, 6(11), e26186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026186>
- Albers, CN, Banta, GT, Jacobsen, OS ve Hansen, PE (2008).

Daha önce önerilen yapılardan önemli farklılıklar gösteren tarla toprağındaki humik maddelerin karakterizasyonu ve yapısal modellemesi. *Avrupa Toprak Bilimi Dergisi*, 59(4), 693-705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01036.x>

- Anantharaman, A., Hemachandran, H., Priya, RR, Sankari, M., Gopalakrishnan, M., Palanisami, N., & Siva, R. (2016). Apokarotenoidlerin tirozinaz aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkisi: Çok spektroskopik ve yerleş tirme çalışmaları. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(1), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.05.007>
- Ashoka, S., Seetharamappa, J., Kandagal, PB ve Shaikh, SMT (2006).

- Trazodon hidroklorür ve siğir serum albumini arasındaki etkileşimin araştırılması. *Journal of Luminesans*, 121(1), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2005.12.001>
- Ashraf, Z., Rafiq, M., Seo, S.-Y., Kwon, KS ve Babar, MM (2015).

- Mantar tirozinaz inhibitörleri olarak yeni hidroksi bazlı timol an analoglarının kimyasal ve in silico çalışmaları. *Avrupa Toprak Bilimi Dergisi*, 98, 203-211. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.031>

- Athipornchai, A., Niyomtham, N., Pabuprapap, W., Ajavakom, J., Duca, M., Azoulay, S., & Suksamran, A. (2021). Curcuminoid analoglarının güçlü tirozinaz inhibitör aktivitesi ve inhibisyon kinetiği çalışmaları. *Kozmetik*, 8(2), 35. <https://doi.org/10.3390/cosmetics8020035>

- Bondareva, L. ve Kudryasheva, N. (2021). Hüyük maddelerin doğrudan ve dolaylı detoksifikasyon etkileri. *Agronomi*, 11(2), 198. <https://doi.org/10.3390/agronomi11020198>

- Burlingham, BT ve Widlanski, TS (2003). Kuvve IC50 ilişkisine sezgisel bir bakış : Dixon grafiği için daha genel bir kullanım. *Journal of Chemical Education*, 80(2), 214. <https://doi.org/10.1021/ed080p214>
- Chen, M.-J., Hung, C.-C., Chen, Y.-R., Lai, S.-T., & Chan, C.-F. (2016).

- Yeni sentetik kojik asit-metilmazol türevleri, mantar odası tirozinazını ve melanogenezini inhibe eder. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(6), 666-672. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.06.002>

- Christi, I., Knicker, H., Kögel-Knabner, I. ve Kretzschmar, R. (2008). Hüyük maddelerin kimyasal heterojenliği için boş fiber ultrafiltrasyon ile elde edilen boyut fraksiyonlarının karakterizasyonu. *Avrupa Toprak Bilimi Dergisi*, 51, 617-625. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2000.00352.x>
- Ding, GB, Wu, G., Li, B., Yang, P., & Li, Z. (2019). *Escherichia coli*'de yüksek verimli ekspresyon, biyofiziksel karakterizasyon ve bitki toksini jeloninin biyolojik değerlendirilmesi. *3 Biyoteknoloji*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1559-6>

- Fan, M., Zhang, G., Pan, J. ve Gong, D. (2017). Tirozinaz üzerindeki dihidromirisetin inhibisyon mekanizması ve B6, D3 veya E vitaminlerinin ortak etkileri. *Food & Function*, 8(7), 2601-2610. <https://doi.org/10.1039/C7FO00236J>
- Farasat, A., Ghorbani, M., Gheibi, N., & Shariatifar, H. (2020). Dört flavonoidin (chrysin, naringin, quercetin, kaempferol) tirozinaz aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkisinin MD simülasyon yaklaşımı kullanılarak in silico değerlendirilmesi. *Biyoteknoloji. Journal of Biotechnology Hesaplamalı Biyoloji ve Biyobiyoteknoloji*, 101(3), 2601-2610. <https://doi.org/10.1039/C7FO00236J>

- Gheibi, N., Ghorbani, M., Shariatifar, H., & Farasat, A. (2020). Moleküler yerleş tirme ve moleküler dinamik simülasyon yaklaşımı kullanılarak doymamış yağ asitlerinin (araş tironik/oleik asitler) kalprotektinin stabilitesi ve yapısal özellikleri üzerindeki etkileri. *PLoS Bir*, 15(3), e0230780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230780>

- Gheibi, N., Taherkhani, N., Ahmadi, A., Haghbeen, K., & Ilghari, D. (2015). Potansiyel terapötik inhibitörlerin, benzolik asit ve piridin türevlerinin, tirozinazın monofenolaz ve bifenolaz aktiviteleri üzerindeki inhibitör etkilerinin karakterizasyonu. *Iran Temel Tıp Bilimleri Dergisi*, 18(2), 122-129. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2015.4012>
- Guan, Y.-F., Qian, C., Chen, W., Huang, B.-C., Wang, Y.-J., & Yu, H.-Q.

- (2018). Membran kirlenme sürecinde hüyük asit ve protein arasındaki etkileşim: Spektroskopik bir bakış. *Su Araştırması*, 145, 146-152. <https://doi.org/10.1039/C7FO00236J>

- Hal dys, K., Goleman, W., Jewgiński, M., Wolińska, E., Anger, N., Rossowska, J. ve Latajka, B. (2018). Aromatik tiyosemikarbazonların mantar tirozinazını inhibe edici özellikleri: Sentez,

- ve mekanizması. *Yiyecek ve İçecek Bilimi*, 4(1), 1-10. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v3i2i3.12>
- Yin, S.-J., Si, Y.-X., Chen, Y.-F., & Lee, D.-Y. (2011). Agaricus bisporus'tan tirozinaz inhibitörleri tarafından farklı tipte inhibisyonu: Hesaplamalı simülasyonlar. *Protein Günü*, 30(4), 273-280. <https://doi.org/10.1002/prob.21001>
- Yin, S.-J., Si, Y.-X., & Qian, L. (2011). Agaricus bisporus'tan tirozinaz üzerindeki inhibe edici etkisi: Karşılaştırmalı moleküler dinamik simülasyonları. *Enzim Araştırma*, 38(1), 1-10. <https://doi.org/10.4061/2011/294724>
- H., Yoon, M.-Y. ve Moon, S.-H. (2011). Agaricus bisporus'tan tirozinazın antioksidan ve anti inflamatuvar aktivite çalışmaları. *Leğiz ve Tıp Dergisi*, 12(3), 285-289. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.014279.x>
- Spectrochimica Acta. Bölüm A, Moleküler ve Biyomoleküler Spektroskopi, 121, 724-731. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.11.113>
- Zhou, L., Liu, W., Xiong, Z., Zou, L., Chen, J., Liu, J. ve Zhong, J. (2016). Polifenoloksidaz üzerindeki organik asitler için farklı inhibisyon modları. *Gıda Kimyası*, 199, 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.034>
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, MT, Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, AA (2019). Tirozinaz inhibitörleri üzerine kapsamlı bir derleme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 279-309. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>

Bu makaleden nasıl alıntı yapılır: Taherkhani, N., Hekmet, A., Piri, H., & Haghbeen, K. (2022). Fulvik'in yapısal ve inhibitör etkileri ve tirozinaza karşı hüyük asitler. *Gıda Biyokimyası Dergisi*, 46(10), e14279. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.014279.x>