

GİRİŞ

Polifenol Oksidaz Enzimi

Polifenol oksidaz (E.C.1.10.1.1) (PPO) yapısında kofaktör olarak bakır içeren oksido redüktaz sınıfına ait enzimatik karama reaksiyonlarını katalizleyen bifonksiyonel bir enzimdir. Bitkiler aleminde bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle funguslarda, bazı hayvansal organlarda ve ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında da bol olarak bulunan bir enzimdir. Birçok sebze ve meyvenin içerisinde; zeytinlerin özellikle katekol substratı üzerine, en yüksek PPO aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur.

Ağaç Kabuğu

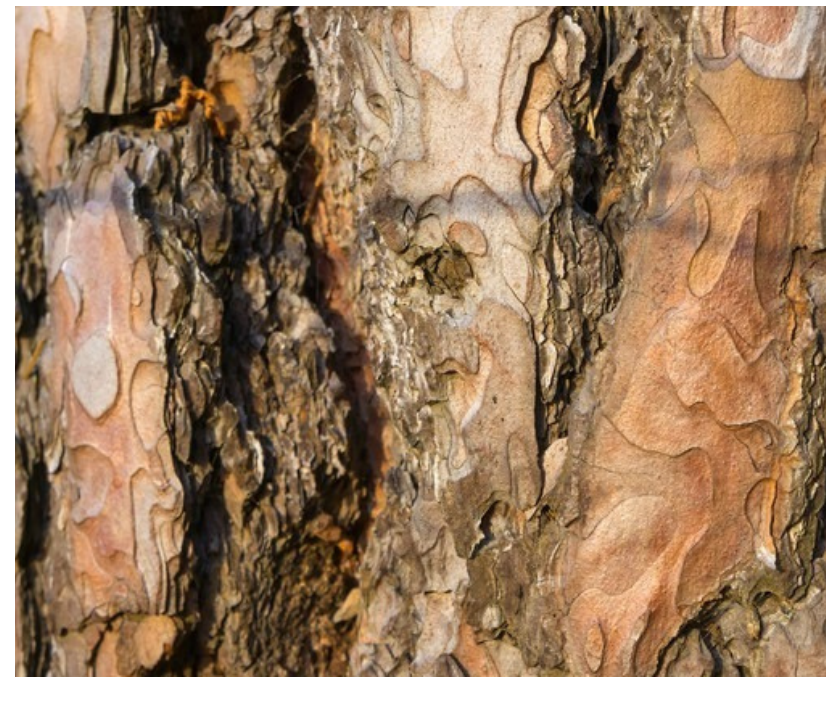
Kabuk, vasküler kambium tarafından üretilen ağaç gövdesini, dallarını ve kökünü çevreleyen kambiumun dış tabakasıdır. Kabuk, odunla benzer yapılar gösterse de genel itibarıyla anatomik ve kimyasal yapılar bakımından oduna nazaran daha karmaşık ve heterojen bir yapıya sahiptir. Ağacın toplam ağırlığının %10-15'ni oluşturmaktadır.

Bu çalışmada; daha önceden Arslan ve grubu tarafından sentezi yapılmış olan Sefaroz-4B-L-tirozin-p-amino-benzoik asit afinite jeli ile PPO enzimi muz meyvesinden saflaştırılmıştır. Daha sonra, ağaç kabuğu ekstraktlarının enzim üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

PPO ENZİMİNİN ÜÇ BOYUTLU YAPISI



AĞAÇ KABUKLARI



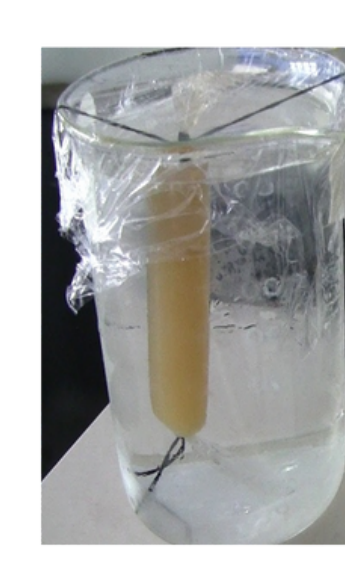
Kabuk heterojen yapıdadır ve kimyasal yapısı büyük bir çeşitlilik sergilemektedir. Kabuk kimyasal yapısının aydınlatılması çoğu zaman oldukça güçtür ve elde edilen verilerden anlamsız sonuçlar çıkması mümkündür. Örneğin; Kabuğun yapısında bulunan selüloz ve hemiselülozlar odundaki yapıya benzer özellikler göstermektedir. Ancak lignin için aynı şeyi ifade etmek mümkün değildir. Ekstraktif maddelerden arındırılmış kabukta standart lignin analizi yanlış sonuçlar verebilmektedir. Bunun nedeni 'lignin' olarak adlandırılan kısmın gerçek lignin ve suberize olmuş flobafen karışımı olmasından kaynaklanmaktadır.

Zeytin ağacı kabuğu, biyolojik ve farmakolojik açıdan çeşitli sağlık yararlarına sahip olan doğal bir kaynaktır. Zeytin ağacının kabuğu, oleuropein adı verilen bir bileşen içerir, bu madde antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptir. Oleuropein, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresi azaltarak hücre hasarı önleyebilir ve bağışıklık sistemini destekleyebilir. Ayrıca, antibakteriyel ve antiviral etkileri sayesinde enfeksiyonlara karşı koruyucu olabilir. Zeytin ağacı kabuğunun bu sağlık yararları, geleneksel tıpta ve modern araştırmalarda ilgi çekici bir konu olmuştur.

Çam ağacı kabuğu, biyolojik ve terapötik özellikleri nedeniyle çeşitli alanlarda kullanılan önemli bir doğal kaynaktır. Bu kabuk, özellikle prosiyanidinler, flavonoidler, fenolik asitler ve diğer biyoaktif bileşenler içerir. Prosiyanidinler, güçlü antioksidan özelliklere sahip olup, serbest radikallerle savaşarak hücre hasarı azaltabilir ve yaşlanma sürecini yavaşlatabilir. Ayrıca, çam kabuğu anti-inflamatuar özelliklere sahiptir ve bu nedenle iltihaplı durumların kontrolünde etkili olabilir.

YÖNTEM

Ham ekstrakt hazırlanması amacıyla, 50 g muz 100 mL (% 0.5 polietilen glikol ve 10 mM askorbik asit ihtiva eden) 0.5 M, pH:7.30, fosfat tamponu içinde ev tipi blender ile 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat iki kat tülbenkten süzüldü. Süzüntü 20000 x g'de + 4°C'de 1 saat süreyle santrifüj edildi. Bitki duvarlarını ve selülozik lifli kısmı içeren çökelek atıldı. Elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı. Amonyum sülfatla çöktürme işlemleri %0-80 arasında doygunlukta yapıldı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen numune diyaliz torbası içine alınarak, tampona (5 mM fosfat tamponu, pH: 6.3) karşı 3-4 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi. Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino benzoik asit afinite kolunu 0.05 M fosfat tamponu (pH: 6.0) ile dengelendi. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yine 0.05 M Na₂HPO₄ tamponu (pH:5.0) ile yıkandı. Daha sonra 0,05 M pH=7,00 Na₂HPO₄ / 1 M NaCl tamponu ile enzim elüsyonu yapıldı ve 2'şer mL halinde tüplerde fraksiyonlandı. Elüatlarda 280 nm'de protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı. Farklı inhibitörlerin IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 420 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için IC₅₀ değerleri hesaplandı.



SONUÇ

Bu çalışmada, ağaç kabuğu ekstraktlarının kullanımıyla ilgili olarak, afinite kromatografi yöntemiyle saflaştırılmış PPO (polifenol oksidaz) enzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan deneylerde, söz konusu ekstraktların PPO enzimini çeşitli oranlarda inhibe ettiği gözlemlenmiş ve bu inhibisyonun incelenen parametreler üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Çalışmamızın önemli bir bulgusu, doğal kaynaklardan elde edilen ağaç kabuğu ekstraktlarının, endüstriyel anlamda büyük bir öneme sahip olan PPO enzimini inhibe etmesidir. Bu inhibisyon, özellikle gıda endüstrisi, tarım ve tekstil gibi sektörlerde önemli rol oynayan PPO enzimini kontrol altına alma potansiyelini sunmaktadır.

Elde edilen sonuçlar, doğal kaynaklardan elde edilen bitki ekstraktlarının enzim aktivite üzerindeki olası uygulamalarını anlamamıza katkı sağlamaktadır. Ayrıca, bu bulguların endüstriyel süreçlerde PPO enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonları düzenleme amacıyla kullanılması, çeşitli sektörlerde işlenebilir ve sürdürülebilir çözümler sunma potansiyelini taşımaktadır.

Sonuç olarak, ağaç kabuğu ekstraktlarının PPO enzimi üzerindeki etkilerini sistemli bir şekilde değerlendirilerek, doğal kaynaklardan elde edilen bileşenlerin endüstriyel uygulamalarda nasıl kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgular, çeşitli zeytin ve çam ağaçlarının kabuklarının uygun yöntemlerle ekstrakte edilerek söz konusu enzim üzerindeki etkilerin daha detaylı bir şekilde incelenip literatüre kazandırılabilir. Bu sayede, temel bilim ve endüstriyel uygulama alanlarında gelecekte yapılacak araştırmalara önemli bir yol gösterici olabilir.