



BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ – KİMYA BÖLÜMÜ BAZI GIDA MADDELERİNDEKİ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ VE KİNETİK ÖZELLİKLERİ

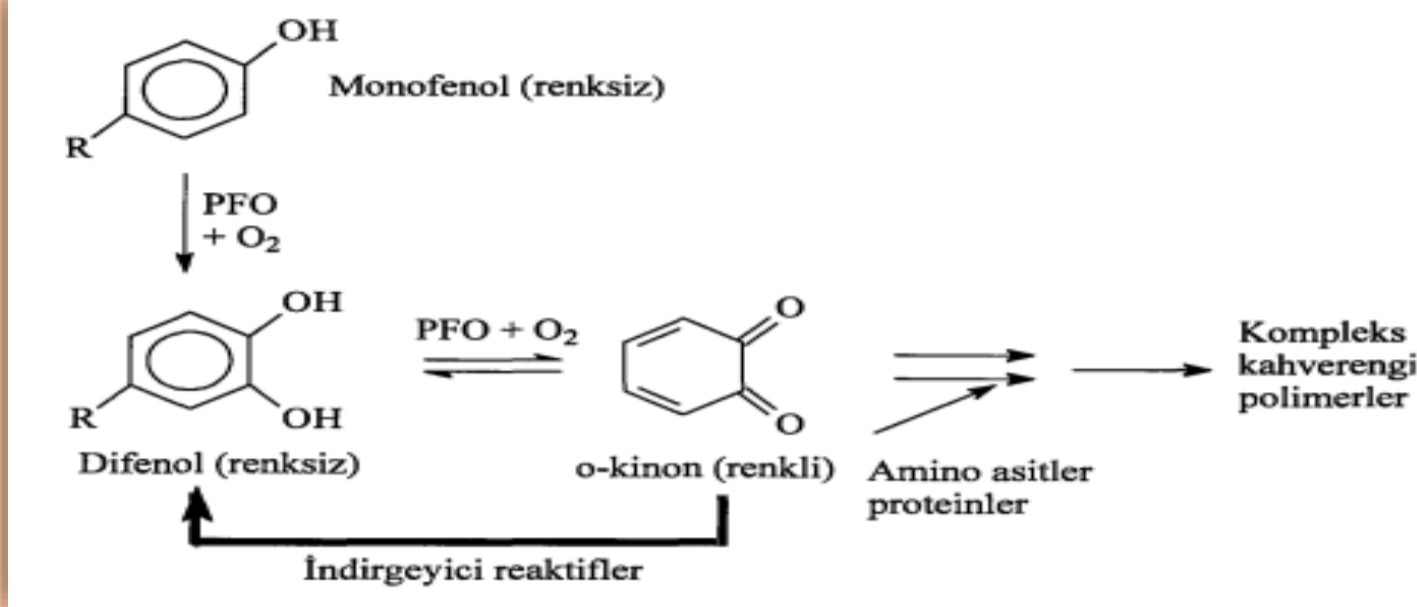


CEMRE MAKBULE YILDIZ
DANIŞMAN: PROF. DR. ÖZKAN DEMİRBAŞ

❖ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİ (PPO)

Polifenol oksidaz enzimi oksidoredüktaz sınıfının bir üyesidir. Bu enzim bakır içeren bir metallo enzimdir ve oksijen varlığında iki reaksiyonu katalizleyebilir. Bu reaksiyonlardan biri monofenolik bileşiklerin o-difenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi), diğeri ise o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonudur (katekolaz aktivitesi).

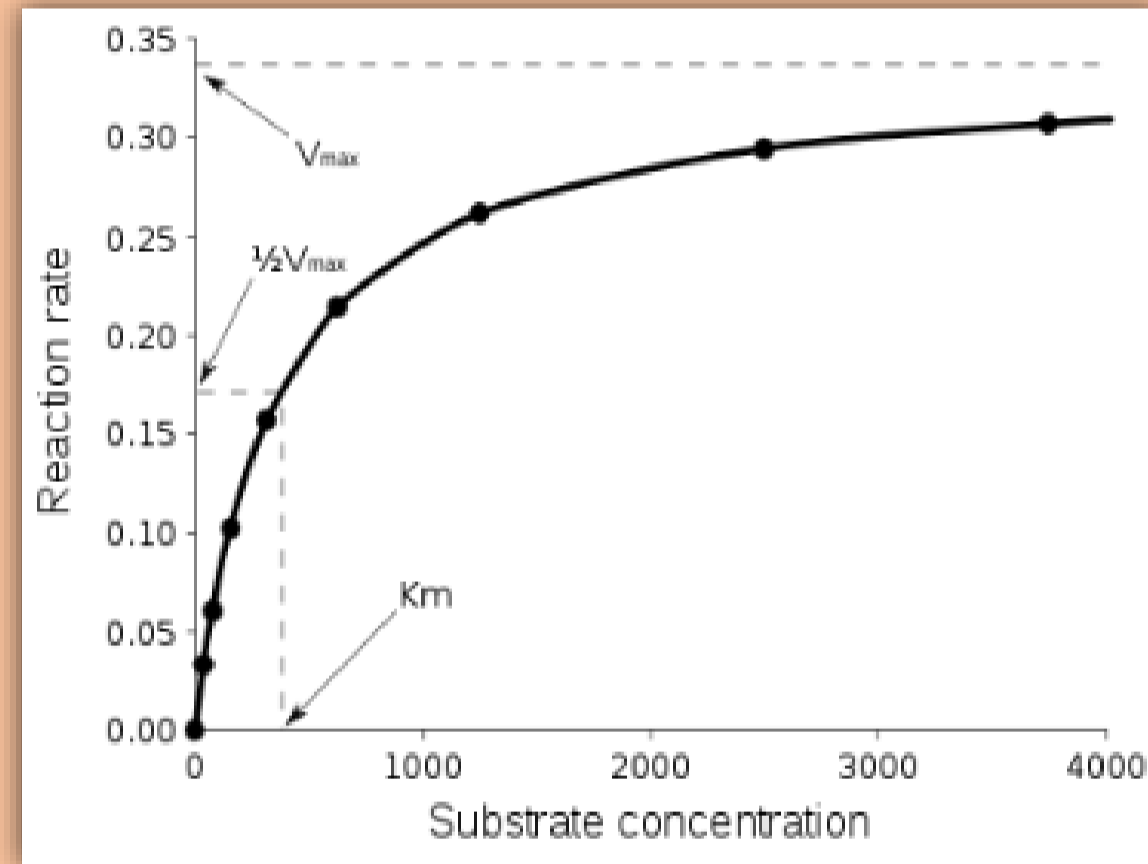
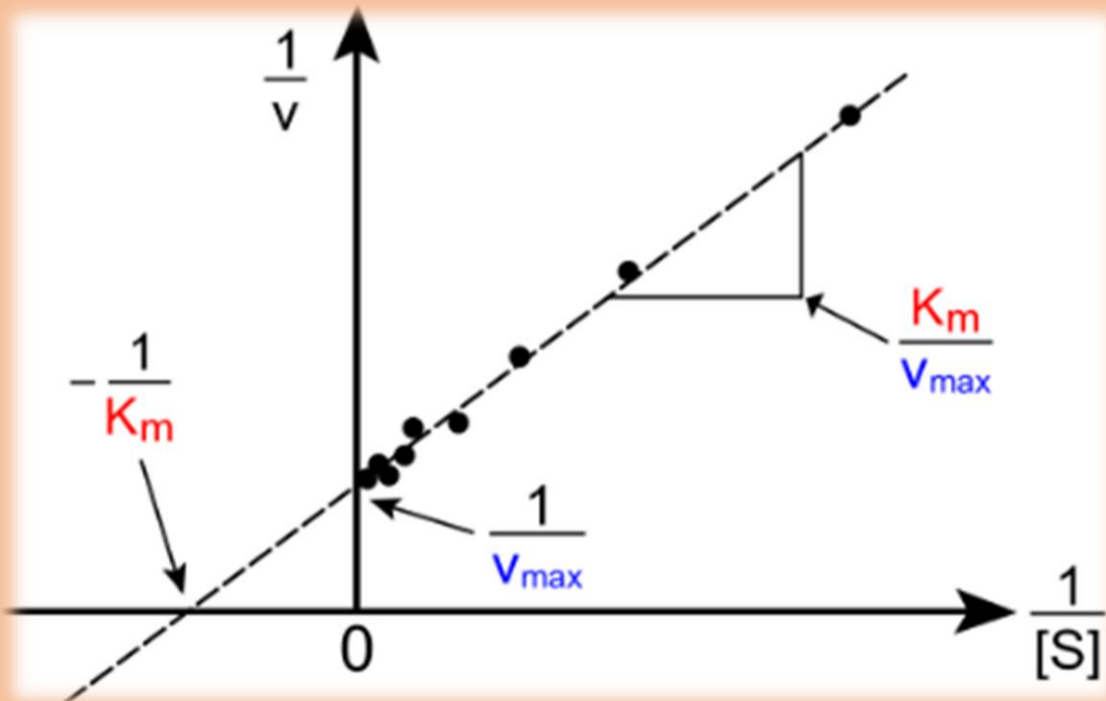
Bu reaksiyonlar sonucu oluşan kinoid maddeler polimerleşerek kahverengi, kırmızı veya siyah pigmentler oluşturur.



Melanin, aynı zamanda saç ve cildi de renklendiren koyu kahverengi pigmenttir. Bunun yanında meyve sebzelerde kahverengi rengin oluşmasına sebep olur. Bu reaksiyonun taze meyve ve sebzelerde gerçekleşmeme sebebi PPO ve fenolik bileşiklerin bitki hücresinde farklı yerlerde konumlandırılmış olmasıdır. Enzimatik esmerleşme süreci yalnızca PPO, fenolik bileşikler ve oksijen birbiriyle temas ettiğinde tetiklenir. Meyve dokusu fiziksel darbe, sıcağa veya soğuğa maruziyet nedeniyle zarar gördüğünde hücreleri açılır ve boşluklardan yayılan fenolik bileşikler ve enzim havadaki oksijenle karışır. Sonuç olarak, hasarlı doku kararır.

❖ Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



Michaelis-Menten grafiği

❖ Bazı Gıdalarda PPO

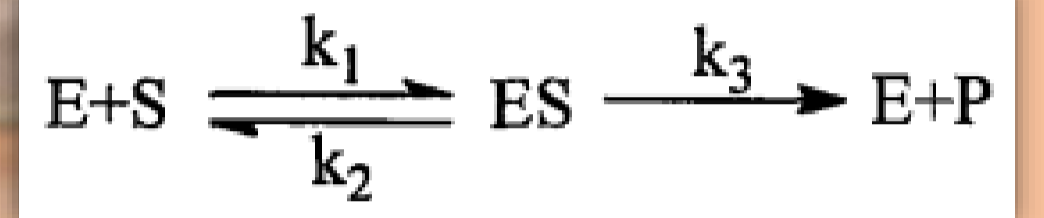
Çeşitli gıdalarda bulunan PPO enzimi hakkında yapılan çalışmalardan bahsedecek olursak, *Ocimum basilicum* L. (fesleğen) bitkisi için substrat spesifikliğini belirlemek için mono-, di- ve trifenolik substratlar test edilmiş. Yapılan çalışmalar sonucunda 4-metilkatekol ve katekol gibi difenolik ve pirogallol gibi trifenolik substratlar, fesleğen bitkisindeki PPO enzimini önemli şekilde oksitlerken L-tirozin gibi monofenolik substrata karşı herhangi bir aktivite göstermemektedir. Patates, mantar, fasulye gibi bazı bitkilerin polifenol oksidazları hem monofenollerin hidroksilasyonunu hem de difenollerin oksidasyonunu katalizler.

Farklı gıdalar için yapılan deneysel çalışmalarda PPO'nun optimum pH çalışması, optimum sıcaklık çalışması, iyonik şiddet çalışması, farklı substratlar için optimal şartlarda Km ve Vmax değerlerinin bulunması gibi kinetik özelliklerin incelendiğini söyleyebiliriz.

Kuşburnu bitkisi ile yapılan optimal şartlarda Km ve Vmax çalışma sonuçları yandaki tabloda gösterilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda kuşburnu bitkisinde bulunan PPO enziminin optimal koşullarda katalitik gücünün ve ilgisinin en fazla olduğu substratın 4- metil katekol olduğu görülmektedir.

❖ ENZİM AKTİVİTESİ VE KİNETİĞİ

Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik tepkimenin hızının, enzim etkisiyle optimum koşullarda belirli bir sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Enzim kinetiği ise enzimlerin aktiviteleri kullanılarak belirlenir. Enzimler substratları ile ve bazen de koenzimler ile kompleksler oluştururlar. Doğunluk durumunda bütün enzim ES kompleksi halindedir. Enzim ve substrat arasındaki reaksiyonu açıklarsak aşağıdaki eşitlik yazılabilir.



$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m}$$

Enzimli bir reaksiyonun hızının substrata bağlı olarak değişimi verilen bu grafiğe baktığımızda, artan substrat konsantrasyonu ile reaksiyonun hızı orantılı olarak artar, yani reaksiyon substrata göre birinci derecedendir. Substrat konsantrasyonu artmaya devam ettiğinde ise reaksiyonun hızında azalma gözlenir ve bu bölümde reaksiyon sıfırncı ile birinci dereceler arasında karışık bir mertebeye sahip olur. Substrat konsantrasyonu daha da arttığında hız sabitlenir ve substrat konsantrasyonu böylece reaksiyonun hızına etki etmez. Bu kısımda reaksiyon sıfırncı derecedendir ve bütün enzim molekülleri substrat ile birleşmiş yani doymuş haldedir.

[S]' nin çok yüksek olduğu değerlerde başlangıç hızı (V0) Vmax'a yaklaşır. Bununla birlikte pratikte gösterilen grafikten Vmax'ı doğru bir şekilde belirlemek zordur. Vmax ve Km değerlerini belirlemek için daha iyi bir metod Lineweaver-Burk tarafından geliştirilmiş olup bu denklem Michaelis-Menten denkleminin ters çevrilmiş biçimidir. Grafiğin x eksenini 1/[S] iken y eksenini 1/V dir. Elde edilen grafikteki doğru ekstrapole edilebildiğinden Lineweaver-Burk grafiğini kullanmak daha doğru bir yöntemdir.



Vitis Vinifera L. (üzüm) bitkisinde bulunan PPO enziminin kinetiğinin parametreleri olan Km ve Vmax değerleri optimal şartlarda katekol substratının farklı konsantrasyonları kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *Malus domestica* (kırmızı elma) bitkisinde safılaştırılan PPO enziminin katekol substrata karşı ilgisinden ve katalitik gücünden daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Farklı gıdalarda bulunan polifenol oksidaz enziminin kinetik parametrelerinin farklı olduğunu verilen örnekler ile görmekteyiz.

Substrat	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	KM (M)	Vmax (EU/ ml x dak)
Katekol	8.5	25	7.41 x 10 ⁻³	41.66
4- metil katekol	8.5	20	8.64 x 10 ⁻³	431.96
L-Dopa	8.0	45	6.06 x 10 ⁻⁴	45.45
Dopamin	8.5	45	2.82 x 10 ⁻³	42.48
Gallik asit	8.8	35	2.64 x 10 ⁻³	111.11
Pirogallol	7.0	15	2.79 x 10 ⁻³	111.73
L-Tirozin	7.0	65	8.27 x 10 ⁻⁴	142.85
p-Kresol	5.0	60	8.63 x 10 ⁻⁵	40.00

Kuşburnu bitkisinde bulunan PPO enziminin Km ve Vmax değerleri

KAYNAKÇA

- TURAN P., 'Ocimum basilicum L.' den elde edilen polifenol oksidaz enziminin safılaştırılması, kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi', yüksek lisans tezi
- ŞAKIROĞLU H., 'Kuşburnu meyvasından izole edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi', doktora tezi
- ÖNEZ Z., 'Üzüm (Vitis Vinifera L) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi', yüksek lisans tezi