



ZEYTİN (OLEA EUROPEA SATİVA) PPO ENZİMİNİN KİNETİK VERİLERİN İNCELENMESİ

MEHMET KEÇİCİ

Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü



Bu deneyde kullanılan zeytinler Çanakkale bölgesinde kendi yetiştirdiğimiz 100 yıllık zeytinlerimizden elde edilmiştir . Bu deneydeki amacım kendi köyümdeki imkanları bilim ışığında aydınlatmaktır .

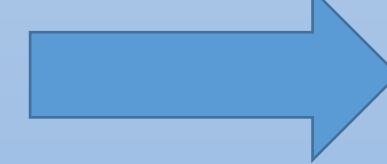
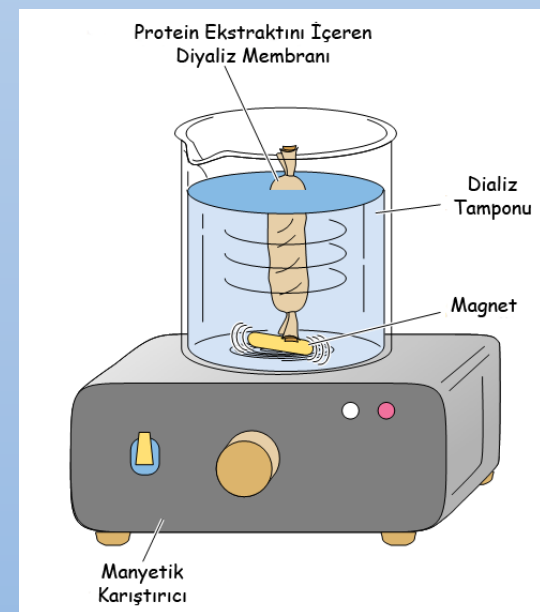
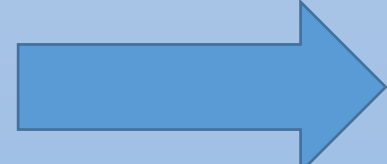
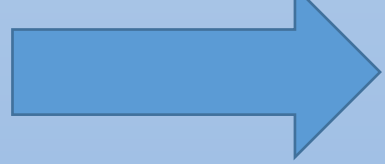
Polifenol Oksidaz Enzimi (PPO)

Polifenol oksidaz (E.C.1.14.18.1) yapısında kofaktör olarak bakır içeren oksido redüktaz sınıfına ait enzimatik kararma 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[1].

Bu enzim, oksijen varlığında monofenolik bileşenlerin o-difenollere hidroksilasyonu ve o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu sağlayan reaksiyonları katalizler. Bu iki reaksiyon sonucu oluşan maddeler kahverengi, siyah veya kırmızı pigmentler oluşturur[2].

PPO Enziminin ham ekstraktının hazırlaması

Ham ekstrakt hazırlanması amacıyla, 50 g zeytin 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 tülbentten 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[3].



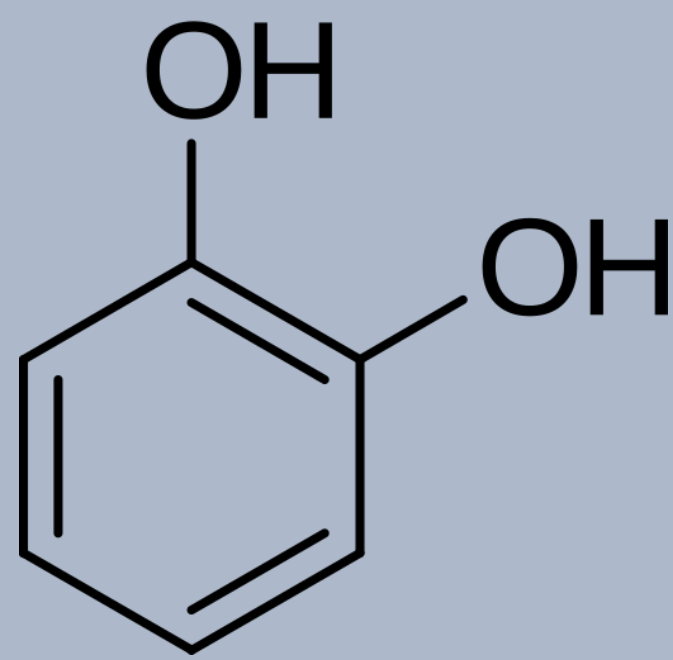
Kinetik Çalışmalar

Ham PPO enzimini elde ettikten sonra bu enzimin farklı katekol substratı konsantrasyonlarındaki aktivitelerini belirledik. Bunun için, pH 6,8 fosfat tamponu ile 0,1 M hazırlanan katekolden artan hacimlerde alarak 100 µL enzim ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 420 nm dalga boyunda 0. ve 1. dakikalardaki absorbansları ölçülmüş ve aktiviteleri hesaplanmıştır.

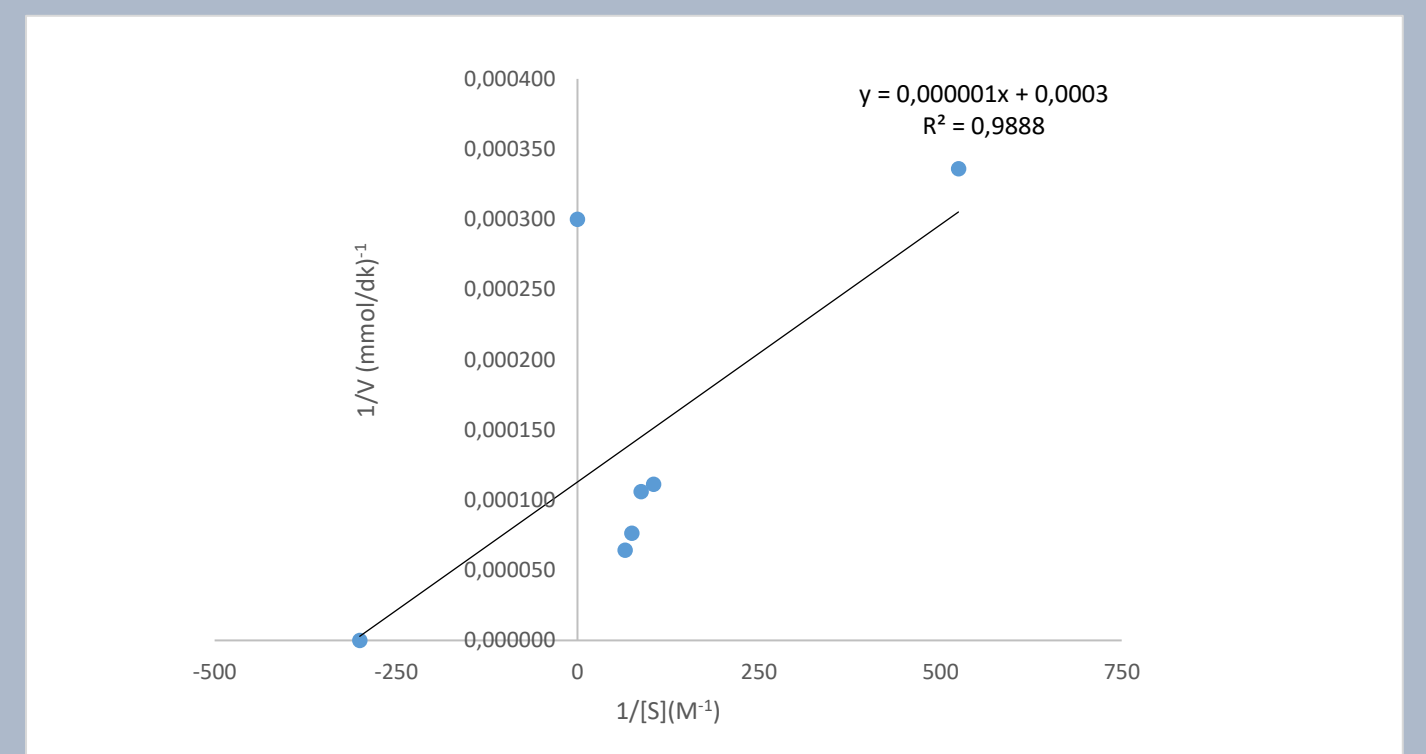
Elde edilen veriler Lineweaver Burk grafiğine işlenmiş ve ilgili denklem yardımıyla Zeytin PPO enziminin kinetik sabitleri, Km ve Vmax değerleri 3,33 µM/dk⁻¹ ve 3333 mM olarak hesaplanmıştır.



PPO Enziminin 3 Boyutlu Yapısı



Katekol



Lineweaver Burk grafiği

Kaynaklar:

- [1] Kotber, M.O., Liavoga, A.,Yong, K.J., Bagorogoza, K., J.Agric. Food Chem., 2010, 50, 2410-17
- [2] Yan, Q., Cao, R., Liang, W.Y., Zhiyong, Y., Ma, C.L., Song, H., Bioorg&Med.Chem.Lett., 12009, 9,4055-4058
- [3] Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F. Life Sci. 1999, 65, 337-353