

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METALLERLE ETKİLEŞTİRİLEN TERE BİTKİSİNDE  
(*Lepidium Sativum*) BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Mustafa AYDIN**

**Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA BÖLÜMÜ**

**Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI**

**Haziran 2011**

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METALLERLE ETKİLEŞTİRİLEN TERE BİTKİSİNDE  
(*Lepidium Sativum*) BAZI ENZİM AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ**


**YÜKSEK LİSANS TEZİ**


**Mustafa AYDIN**


Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA BÖLÜMÜ

Enstitü Bilim Dalı : BİYOKİMYA

Bu tez 15 / 06 /2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Murat TEKER  
Jüri Başkanı

  
Yrd.Doç.Dr. Gülnur ARABACI  
Üye

  
Yrd.Doç.Dr. Serpil ÖZTÜRK  
Üye

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada her an bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI' ya ve çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden değerli arkadaşım Araştırma Görevlisi Esmâ Hande ALICI' ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali Osman AYDIN' a; ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Prof. Dr. Mustafa Şahin DÜNDAR'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ALTUNDAĞ'a, tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans yapmam konusunda bana destek olan Yalova Üniversitesi Strateji Geliştirme Dairesi Başkanlığı Personeline en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her an maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, tüm problemlerimi paylaşan eşim Nergüzel AYDIN' a kardeşim Semiha AYDIN'a ve hayatımın her aşamasında yanımda olan aileme şükranlarımı sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	vii
TABLolar LİSTESİ .....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
1.2. Literatur Çalışması .....	4
BÖLÜM 2.	
ENZİMLER .....	8
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi .....	8
2.1.2. Enzimlerin Genel Özellikleri .....	9
2.2. Enzimlerin Adlandırılmaları Ve Sınıflandırılmaları .....	13
2.3. Enzimlere Etki Eden Faktörler .....	14
2.3.1. Sıcaklığın Etkisi .....	15
2.3.2. pH .....	15
2.3.3. Zaman .....	16
2.3.4. Substrat Konsantrasyonu .....	16
2.3.5. Enzim Konsantrasyonu .....	17
2.3.6. İnhibitör .....	17
2.4. Antioksidan Enzimler .....	18
2.4.1. Antioksidan Savunma sistemi .....	19

2.4.2. Stres Sonucu Oluşan Serbest Radikaller .....	20
2.4.3. Antioksidan Enzimler .....	20
2.4.3.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) .....	21
2.4.3.2. Katalaz (CAT) .....	22
2.4.3.3. Peroksidaz (POD) .....	23
2.4.3.4. Polifenol Oksidaz (PPO) .....	25
<b>BÖLÜM 3.</b>	
<b>MATERYAL VE METOD.....</b>	<b>26</b>
3.1. Materyal .....	26
3.2. Yöntem .....	26
3.2.1. Tere Bitkisinin Yetiştirilmesi .....	26
3.2.2. Enzim Aktivite Tayini İçin Homojenat Hazırlanması .....	27
3.2.3. Kullanılan Substrat .....	27
3.2.4. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü .....	28
3.2.5. Katalaz (CAT) Aktivite Ölçümü .....	29
3.2.6. Peroksidaz (POD) Aktivite Ölçümü .....	29
3.2.7. Polifenol Oksidaz (PPO) Aktivite Ölçümü .....	30
3.2.8. Bradford Metodu ile Çözünür Protein Miktar Tayini .....	31
<b>BÖLÜM 4.</b>	
<b>ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>33</b>
4.1. Tere Bitkisinden Elde Edilen SOD Enzim Aktivitesi Bulguları .....	33
4.2. Tere Bitkisinden Elde Edilen CAT Enzim Aktivitesi Bulguları .....	37
4.3. Tere Bitkisinden Elde Edilen POD Enzim Aktivitesi Bulguları .....	41
4.4. Tere Bitkisinden Elde Edilen PPO Enzim Aktivitesi Bulguları .....	45
4.5. Protein Tayini .....	48
<b>BÖLÜM 5.</b>	
<b>TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>50</b>
5.1. Fe, Cu, Co, Pb, ve Cd'nin SOD Aktivitesi Üzerine Etkileri .....	50
5.2. Fe, Cu, Co, Pb, ve Cd'nin CAT Aktivitesi Üzerine Etkileri .....	51
5.3. Fe, Cu, Co, Pb, ve Cd'nin POD Aktivitesi Üzerine Etkileri .....	53

5.4. Fe, Cu, Co, Pb, ve Cd'nin PPO Aktivitesi Üzerine Etkileri .....	55
KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	61

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABS	: Absorbans
BSA	: Serum Albumin
CAT	: Katalaz
Cd	: Kadmiyum
Co	: Kobalt
Cu	: Bakır
Ea	: Aktivasyon Enerjisi
EC	: Enzim Kodu
EU	: Enzim Ünitesi
IUB	: Uluslararası Biyokimya Birliği
mM	: Milimolar
NBT	: Nitro Tetra Bluezolum
Pb	: Kurşun
POD	: Peroksidaz
PPO	: Polifenil Oksidaz
PVP	: Polivinil Prolidon
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
$\mu$ l	: Mikrolitre
$\mu$ M	: Mikromolar

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Aktif merkezin substrata uygunluğu .....	12
Şekil 2.2.	Katalizörlü ve katalizörsüz reaksiyon için reaksiyon profili .....	13
Şekil 2.3.	Sıcaklık-reaksiyon hızı grafiği .....	15
Şekil 2.4.	[S]-Reaksiyon Hızı Grafiği .....	17
Şekil 2.5.	[E]-Reaksiyon Hızı Grafiği .....	17
Şekil 2.6.	Katalaz enziminin etki mekanizması .....	23
Şekil 2.7.	Peroksidaz enziminin reaksiyon mekanizması .....	24
Şekil 3.1.	Bradford yönteminin standart grafiği .....	31
Şekil 4.1.	Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L $\text{Cu}^{2+}$ , ve $\text{Fe}^{2+}$ çözeltileri ile 15 mg/L ve 30mg/L $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ ve $\text{Pb}^{2+}$ çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde süperoksit dismutaz aktiviteleri .....	34
Şekil 4.2.	Normal şartlarda yetiştirilen $\text{Fe}^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen süperoksit dismutaz aktivitesi .....	34
Şekil 4.3.	Normal şartlarda yetiştirilen $\text{Cu}^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen süperoksit dismutaz aktivitesi .....	35
Şekil 4.4.	Normal şartlarda yetiştirilen $\text{Pb}^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen süperoksit dismutaz aktivitesi .....	35
Şekil 4.5.	Normal şartlarda yetiştirilen $\text{Co}^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen süperoksit dismutaz aktivitesi .....	36
Şekil 4.6.	Normal şartlarda yetiştirilen $\text{Cd}^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen süperoksit dismutaz aktivitesi .....	36
Şekil 4.7.	Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L $\text{Cu}^{2+}$ , ve $\text{Fe}^{2+}$ çözeltileri ile 15 mg/L ve 30mg/L $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ ve $\text{Pb}^{2+}$ çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde katalaz aktivite değerleri .....	38



Şekil 4.8.	Normal şartlarda yetiştirilen $Fe^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen katalaz aktivitesi .....	38
Şekil 4.9.	Normal şartlarda yetiştirilen $Cu^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen katalaz aktivitesi .....	39
Şekil 4.10.	Normal şartlarda yetiştirilen $Pb^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen katalaz aktivitesi .....	39
Şekil 4.11.	Normal şartlarda yetiştirilen $Co^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen katalaz aktivitesi .....	40
Şekil 4.12.	Normal şartlarda yetiştirilen $Cd^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen katalaz aktivitesi .....	40
Şekil 4.13.	Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L $Cu^{2+}$ , ve $Fe^{2+}$ çözeltileri ile 15 mg/L ve 30mg/L $Co^{2+}$ , $Cd^{2+}$ ve $Pb^{2+}$ çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde peroksidaz aktiviteleri .....	42
Şekil 4.14.	Normal şartlarda yetiştirilen $Fe^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen peroksidaz aktivitesi .....	42
Şekil 4.15.	Normal şartlarda yetiştirilen $Cu^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen peroksidaz aktivitesi .....	43
Şekil 4.16.	Normal şartlarda yetiştirilen $Pb^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen peroksidaz aktivitesi .....	43
Şekil 4.17.	Normal şartlarda yetiştirilen $Co^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen peroksidaz aktivitesi .....	44
Şekil 4.18.	Normal şartlarda yetiştirilen $Cd^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen peroksidaz aktivitesi .....	44
Şekil 4.19.	Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L $Cu^{2+}$ , ve $Fe^{2+}$ çözeltileri ile 15 mg/L ve 30mg/L $Co^{2+}$ , $Cd^{2+}$ ve $Pb^{2+}$ çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde polifenol oksidaz aktiviteleri .....	46
Şekil 4.20.	Normal şartlarda yetiştirilen $Fe^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen polifenil oksidaz aktivitesi .....	46
Şekil 4.21.	Normal şartlarda yetiştirilen $Cu^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen polifenil oksidaz aktivitesi .....	47

Şekil 4.22.	Normal şartlarda yetiştirilen $Pb^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen polifenil oksidaz aktivitesi .....	47
Şekil 4.23.	Normal şartlarda yetiştirilen $Co^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen polifenil oksidaz aktivitesi .....	48
Şekil 4.24.	Normal şartlarda yetiştirilen $Cd^{2+}$ uygulanmış tere bitkisinden elde edilen polifenil oksidaz aktivitesi .....	48
Şekil 4.25.	Bradford standart grafiği .....	49

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Enzim sınıfları .....	14
Tablo 3.1.	Aktivite ölçümü için kullanılan substratlar .....	28
Tablo 4.1.	Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L $\text{Cu}^{2+}$ ve $\text{Fe}^{2+}$ çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ ve $\text{Pb}^{2+}$ çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde süperoksit dismutaz aktivite değerleri .....	33
Tablo 4.2.	Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L $\text{Cu}^{2+}$ ve $\text{Fe}^{2+}$ çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ ve $\text{Pb}^{2+}$ çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde katalaz aktivite değerleri .....	37
Tablo 4.3.	Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L $\text{Cu}^{2+}$ ve $\text{Fe}^{2+}$ çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ ve $\text{Pb}^{2+}$ çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde peroksidaz aktivite değerleri .....	41
Tablo 4.4.	Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L $\text{Cu}^{2+}$ ve $\text{Fe}^{2+}$ çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ ve $\text{Pb}^{2+}$ çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde polifenol oksidaz aktivite değerleri .....	45
Tablo 4.5.	Bradford yöntemiyle bulunan protein miktarları .....	49

## ÖZET

Anahtar kelimeler: Tere (*Lepidium Sativum*), süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, polifenol oksidaz, Fe, Cu, Co, Pb, Cd

Bu araştırmada, tere bitkisinde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD) ve polifenol oksidaz (PPO) aktiviteleri üzerine bitki için esas elementlerden olan Fe, Cu ve esas olmayan elementlerden olan Co, Pb ve Cd'nin etkileri incelenmiştir. Bitkilerin büyütüldüğü ortama 2 gün ara ile farklı konsantrasyonlarda FeCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> ve CdCl<sub>2</sub> çözeltileri stres faktörleri olarak uygulanmıştır. Bitkiler, 4-5 yaprak, belirli bir büyüklüğe erişince hasat edilmiştir. Bitki yaprakları ekstrakte edilerek enzim elde edilmiştir. Bu enzimlerden SOD, CAT, POD ve PPO aktiviteleri ölçülmüştür.

Fe, Cu, Co, Pb ve Cd stresleri sonucunda SOD, CAT, POD, PPO aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir. Bitkideki strese cevapta, SOD, CAT, POD, PPO enzimlerin önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak, bu enzimlerin Fe, Cu, Co, Pb ve Cd stres etkilerinin uzaklaştırılmasında da önemli roller aldığı düşünülmektedir.

# **INVESTIGATION IN SOME ENZYME ACTIVITIES AT CRESS (*Lepidium Sativum*) INTERACTED WITH METALS**

## **SUMMARY**

Key words: cress (*Lepidium Sativum*), superoxide dismutase, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase, Fe, Cu, Co, Pb, Cd

In this study, the cress (*Lepidium Sativum*) plant superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) activities were investigated for the plant on the basis of the elements Fe, Cu and non-essential elements of the Co, Pb and Cd. Environment where of plants raised , FeCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub> and CdCl<sub>2</sub> were applied with an interval of 2 days with different concentrations solutions as stress factors. Plants were harvested 4-5 sheets when size reached a certain. Plant leaves were extracted and enzyme was obtained. SOD, CAT, POD and PPO activities were measured from these enzymes.

Generally, SOD, CAT, POD, PPO activities were increased as a result of statistical Fe, Cu, Co, Pb and Cd stresses. SOD, CAT, POD, PPO enzymes are known to play important roles in the plant response to stress. As a result, the important roles of these enzymes are thought Fe, Cu, Co, Pb and Cd in the removal of the effects of stress.

## BÖLÜM 1. GİRİŞ

Özellikle yirminci yüzyılın ikinci yarısında endüstri gelişimine bağlı olarak ortaya çıkan ve artarak devam eden ekosistem kirliliği günümüzde bütün canlıları tehdit eder bir duruma gelmiştir. Bu tehdit bitkiler üzerinde çok fazladır. Bitkiler yaşadıkları çevrelerde yaşamlarının her safhasında bir veya daha fazla olumsuz şartla karşılaşınca önemli derecede strese maruz kalırlar. Stres, çevresel ve biyolojik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte fizyolojik olaylarda belirgin değişimler meydana getirmesidir. Pek çok tanımı olmakla birlikte stres kısaca; bitkilerde zarar meydana getiren potansiyel güç olarak kabul edilir. Bitkiler bu stres durumunu ortadan kaldırmak, sakınmak veya aşmak için çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalarını devreye sokarlar. Bu mekanizmaların tepkilerinin sınırlı olması sebebiyle, bitkiler bir veya daha fazla olumsuz şartlara karşı sınırlı bir cevap kapasitesine sahiptirler [1,2].

Ülkemizin gerek hızla sanayileşmesi ve gerekse her geçen gün artan bir trafik yoğunluğuna maruz kalması diğer birçok kirleticiyle beraber ağır metallerin de çevredeki miktarlarını arttırmaktadır. Bu durum özellikle aktif hareket etme yeteneği olmayan bitkilerde başta ürün kaybı olmak üzere birçok olumsuzluğa neden olmaktadır. Çeşitli ağır metal iyonlarının in vitro şartlarda tere (*Lepidium Sativum*) üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu çalışma ile ülkemizde konu üzerine dikkat çekmek ve bu konudaki çalışmalara katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Bitkiler atmosferden, gübrelerden, atık su ve çamurdan veya tarımda kullanılan inorganik pestisitlerden toprağa bulaşmış olan ağır metalleri derişimlerine göre biriktirme eğilimindedirler. Tarım ürünlerinde insan ve hayvan beslenmesinde olumsuzluk meydana getirecek düzeyde ağır metal birikimine rastlanmaktadır. Bu tür elementler solunum ile veya diğer yollardan bünyeye artan dozlarda

alındığında, sözü edilen kaynakların içerdiği düşük miktarlar bile risk etmeni sayılabilecek nitelik taşımaktadır [3].

Serbest radikaller hücre içi reaksiyonlara zarar veren ve toksik etki gösteren bileşenlerdir. Genellikle saldırı hedefleri somatik hücreler veya bağışıklık sistemidir. Dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içerdikleri için, bu elektronlarını paylaşabilmek için diğer moleküller ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerler [4]. Serbest radikaller hem normal metabolizmanın hem de toksik maddelerin etkileri sonucu yan ürün olarak oluşabilirler. Örneğin radyasyon, sigara dumanı, ekzoz gazları, deodorantlar, kimyasal maddeler , insektisit ve peptisit olarak bilinen böcek öldürücüler serbest radikal oluşumuna sebep olmaktadır [4,5].

Serbest radikaller hücre zarında bulunan proteinleri parçalayarak hücre yapısına zarar veren; hücre çoğalmasını ve büyümesini sağlayan nükleik asit'e (DNA'ya) etki edip yapısını bozan bileşikler oldukları için nötralize edilmeleri gerekmektedir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek veya oluşan radikallerin hücreye zarar vermesini önlemek amacı ile vücutta birçok savunma sistemi (mekanizması) gelişmiştir. Antioksidan türlerine karşı vücutta oluşan bu savunma sistemlerine antioksidan savunma sistemleri denilir [6,7].

Tere (*Lepidium sativum*), kültür bitkisi olarak Anadolu'da bolca yetiştirilir. Anavatanı Asya kıtasıdır. Bir veya iki yıllık otsu bitkidir. Yapraklar toplu, dişli kenarlı ve tüylüdür. Sert kokulu ve baharatlı bir bitkidir. Kök ve tohumdan üretilir.

Tere (*Lepidium sativum*), turpgiller (Brassicaceae) familyasından, yaprakları salata olarak yenen bir bitki türüdür, vücuttaki yağ yakımını hızlandırır, hazmı kolaylaştırır, idrar söktürücüdür, iştah açıcı özelliği vardır, karaciğer ve safra kesesi hastalıklarına faydalıdır, ödem söktürücüdür. Sigaranın zararlarını azaltır. İnce yaprakları pişince acılaştığı için çiğ yemek gerekir. Ayrıca içinde birçok vitamin barındıran bir bitkidir [8,9].

Kadmiyum; oksidatif stresi oluşturan; genel bitki metabolizmasında çok önemli zararlı etkilere sebep olan en toksik ağır metaldir. Fosforlu gübre ve arıtma çamurlarının uzun süreli kullanılması nedeniyle dünyanın birçok bölgesindeki tarım toprakları az veya orta düzeyde kadmiyum birikimine maruz kalmaktadır. Kadmiyum toprak-bitki sistemindeki yüksek mobilitesi nedeniyle kolaylıkla besin zincirine dâhil olabilmekte böylece bitki, hayvan ve insan sağlığı açısından tehlikeli olabilmektedir. Bitkiler tarafından alınan ve bitki bünyesinde biriktirilen kadmiyum, protein sentezi, azot ve karbonhidrat metabolizması, enzim (nitrat redüktaz) aktivasyonu, fotosentez ve klorofil sentezi gibi birçok metabolik aktivitenin bozulmasına neden olmaktadır. Bitki bünyesinde kadmiyum biriktirilmesinin sonucunda verim ve kalite azalmakta, dolayısıyla önemli düzeyde ürün kaybı meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra günümüz koşullarında örtü altında yoğun gübre kullanımıyla yetiştirilen ürünlerin kullanıldığı modern toplumlardaki insanların kadmiyum toksisitesinden kaçınmaları imkânsız gibi görünmektedir. Kadmiyum ve bileşenleri böbrekler ve karaciğerde birikerek yüksek tansiyon, akciğer kanseri, kemik erimesi ve kansızlık gibi önemli rahatsızlıklara neden olabilmektedir[10].

Kurşun; bitkiler için kuvvetli toksik bir elementtir. Az miktarda dahi bitkide toksik etki gösterir. Yaşlı yapraklarda solma meydana gelir. Mitozun inhibe olması ile gövde ve kök büyümesini engeller. Kloroplastlarda ATP sentezinin bozulması, fotosentezin inhibe olması, solunum, CO<sub>2</sub> fiksasyonu ve su metabolizmasının bozulmasına neden olur. Hücrede stomaların kapanması, hücre çeperlerinin esnekliğinin azalması, elektron transfer reaksiyonlarının, enzim aktivitelerinin olumsuz etkilenmesi, mitokondri, nukleus ve nükleik asit yapısının bozulması, elektrolit dengesinin olumsuz yönde etkilenmesi gibi hasarlara neden olur [11].

Demir; bitkiler tarafından az miktarda alınan bir elementtir. Metabolizma için iz halinde varlığı gereklidir. Demirin klorofil ve protein biyosentezinde önemli rolü vardır. Bitki tarafından yalnızca Fe<sup>2+</sup> formu alınmakta, Fe<sup>3+</sup> formu ise topraktaki mikroorganizmalar tarafından dönüşüme uğradıktan sonra alınabilmektedir. Enzimlerin yapısına katılmaktadır. Noksanlığında bitkideki bütün kimyasal reaksiyonlar olumsuz etkilenmekte, klorofil sentezi gerilemektedir. Demir ortamda aşırı bulunduğunda ise oksidatif strese neden olmaktadır [12].



Kobalt; topraklardaki bulunuş formları  $Co^{2+}$  ve  $Co^{3+}$  şeklindedir. Co uygulaması ile patatesten nişasta içeriği yüksek daha fazla yumru ürünü elde edildiği, domateste meyvelerin daha iri olduğu, hücre büyümesinin teşvik edildiği, peroksidaz aktivitesinin geriletılarak P-indol asetik asit parçalanmasının yavaşladığı, enolaz ve pirüvik asit kinaz gibi enzim aktivitelerinin arttığı belirtilmiştir. Bitki gelişmesi üzerine kobaltın olumlu etkisi vardır. Tüm bu olgulara karşın günümüzde yüksek bitkiler için kobaltın mutlak gerekli olduğunu gösteren yeterli bir kanıt bulunmamaktadır. Aşırı miktarda bitki tarafından alındığında toksik etki yaratmakta ve oksidatif strese sebep olmaktadır [13].

Bakır; metabolizma için iz halinde varlığı gereklidir. En önemli rolü fenolaz, askorbik asit oksidaz ve tirozinaz gibi redoks enzimlerinin kofaktör olarak bileşimlerine katılmasıdır. Bakır bitkide redoks reaksiyonlarında katalitik görev üstlendiğinden bakır eksikliği solunumda enerji akışını ve fotosentezi olumsuz etkiler. Bitkilerde lignifikasyon (odunlaşma) eksikliği veya kaybı, bakır eksikliğinin spesifik bir göstergesidir. Cu aşırı olduğunda oksidatif strese sebep olabilir. Bakır fazlalığı toksisitesi ise genellikle sararma halinde kendini gösterir. Bakır toksisitesi ilk önce kök uçlarında görülür, yan köklerin gelişimi engellenir. Kök sistemindeki zayıflama diğer elementlerin absorpsiyonunu azaltır, böylece büyüme engellenir [14].

## 1.2. Literatur Çalışması

Bitkilerde hücreSEL SOD, CAT, POD, PPO aktivitelerine etki eden faktörlerle ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bitkide metal stres faktörlerine SOD, CAT, POD, PPO enzimlerinin yanıtı faktörün kullanımı ve uygulandığı zamana, bitkinin gelişme durumuna, dokusuna ve bitki türlerine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir.

Domateste sodyum klorür ( $NaCl$ ) tipi tuz ve ağır metal ( $CdCl_2$ ) streslerinin antioksidan enzimler üzerine etkileri incelenmiştir. Bitkiler; tuz (0, 100, 200 mM  $NaCl$ ), kadmiyum klorür (0, 100, 200  $\mu M$   $CdCl_2$ ) ve tuz+ $CdCl_2$  kombinasyonlarına maruz bırakılmıştır. Çalışmanın sonunda elde edilen bulgulara göre; tuz,  $CdCl_2$  ve

tuz+CdCl<sub>2</sub> kombinasyonları çalışılan bitki antioksidan enzimlerinden süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini her iki domates varyetesinde çok fazla değiştirmemiştir. Bununla beraber, stres uygulamaları ile tuza nispeten toleranslı varyetenin katalaz (CAT) aktivitesi artarken, tuza duyarlı olan varyetede azalmıştır [15].

Bazı mısır çeşitleri üzerinde, kadmiyum (Cd) ve kurşun (Pb) ağır metalinin antioksidan enzimler üzerine etkileri incelenmiştir. Mısır çeşitleri farklı konsantrasyonlarda Cd (0, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 mM) ve Pb (0, 1, 2, 4 ve 6 mM) stresine maruz bırakılmıştır. Deneme sonucunda Cd ve Pb ağır metallerinin, mısır çeşitlerinin yapraklarında toplam SOD ve POD enzimlerinin aktivitelerinde belirli konsantrasyon aralığında genellikle artış şeklinde önemli değişiklikler meydana getirdiği saptanmıştır [16].

B'a dayanıklı (Anadolu) ve hassas (Hamidiye) arpa çeşitlerinde B toksisitesinin yarattığı antioksidan etkileşimleri incelenmiştir. Bitkilere 5 ve 10 mM Borik asit uygulanarak yetiştirilmiş ve deneme sonunda SOD, CAT enzim aktiviteleri belirlenmiştir. B toksisitesi SOD, CAT aktiviteleri her iki çeşitte de B toksisitesine bağlı olarak değişmemiş, hassas çeşidin köklerinde toplam SOD ve CAT aktivitesi artmıştır. Dayanıklı çeşidin kök CAT aktivitesi artmış, SOD aktivitesinde bir değişme olmamıştır [17].

Tuz stresinin karpuz (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) yapraklarındaki antioksidatif enzim aktiviteleri (Superoksit dismutaz SOD, katalaz-CAT) üzerine etkisini belirlemek için bir çalışma yapılmıştır. Tuz uygulanan karpuzlarda, tuza tolerant genotiplerin SOD ve CAT enzim aktivitelerinin duyarlı olanlara göre çok yüksek olduğu saptanmıştır [18].

Antioksidatif enzimler üzerine çoklu ağır metal basıncının etkisi iki mangrov (hindistansakızıağacı) kökleri ve yaprakları için incelenmiştir. Kontrol altında yetiştirilen *Kandelia candel* ve *Bruguiera gymnorrhiza*, NaCl Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, ve Hg<sup>2+</sup>'nin farklı konsantrasyonunu içeren gıda solüsyonu verilmiş ve bitkilerin yaprakları ve kökleri iki ay sonra hasat edilmiştir. Ağır metalli bitkilerin yaprakları süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POD) etkinlikleri ve katalaz (CAT)

etkinliği *K. candel* içinde artarken, *B. Gymnorhiza* için değişmez kalmıştır. Kontrol ile kıyasta, yüksek yoğunluklu metal- basınçlı bitkilerin köklerinde SOD, CAT ve POD etkinliklerinin dinamik eğilimi tümü yükselmiş daha sonra düşmüştür. Enzim aktivitelerindeki artış *K.candel*'in *B. gymnorrhiza*'den yüksek yoğunluklu metallerin daha geniş olduğunu göstermiştir [19].

Soya Cd metali ortamında yetiştirilerek peroksidaz (POD) etkinlikleri, katalaz (CAT) etkinliği ve polifenol oksidaz (PPO) etkinliği incelenmiştir.. Artan kadmiyum konsantrasyonunda CAT aktivitesi azalırken, POD ve PPO enzim aktiviteleri değişmemiştir [20].

Al stresi yüzünden reaktif oksijen türleri üretimindeki artış, SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini değiştirmektedir. Düşük B+düşük Mo uygulanmasıyla soya fasulyesi yapraklarında, Zn eksikliğinde fasulyede ve pamukda, Cd uygulanınca bezelye ve *Helianthus annuus* yapraklarında ve havuç ve turpun köklerinde SOD aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Cu ayçıçeği yapraklarında, Zn çavdar yapraklarında, Pb bezelye köklerinde ve Cd şeker kamışında SOD aktivitesini artırmıştır. Cd uygulanmasıyla bazı bitkilerde SOD aktivitesinin değişmediği de bulunmuştur [14].

Düşük B+düşük Mo uygulanmasıyla soya fasulyesi yapraklarında, Al uygulanmasıyla soya fasulyesi fidelerinde, Cd varlığında *Phaseolus vulgaris*, *Lemna minor*, bezelye, biber ve ayçıçeği yapraklarında, *Phaseolus aureus*'da, şeker kamışında, havuç ve turpun köklerinde CAT aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Cu uygulanan bitki türlerinde, Al uygulanan pirinç yapraklarında, Pb uygulanan bezelye köklerinde, Cd uygulanan arpa köklerinde, şeker kamışında, *Raphanus sativus*'da ve *Agropyron repens*'de CAT aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Cu fazlalığında ayçıçeği yapraklarında, Cd uygulaması ile soya fasulyesinde CAT aktivitesinin değişmeden kaldığı tespit edilmiştir. Cu uygulanan domates yapraklarında, önce CAT aktiviteleri geçiici olarak artarken yüksek Cu konsantrasyonlarında ise CAT aktiviteleri düşmüştür [14].

Düşük B+düşük Mo uygulanmasıyla soya fasulyesi yapraklarında, Cd uygulanınca bezelye yaprağında, Phaseolus aureus'da, havuç ve turpun köklerinde POD aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. 10 ve 20 mM B uygulanması ile tütün hücrelerinde, Cu ve Zn uygulandığında fasulye yapraklarında, Cu fazlalığında ayçiçeği yapraklarında, Cd eklenmesinden sonra Ceratophyllum demersum'da ve A. Thaliana'da POD enzim aktivitelerinin artmış olduğu bulunmuştur. Cu uygulanan domates yapraklarında, önce POD aktiviteleri geçici olarak artarken yüksek Cu konsantrasyonlarında ise POD aktiviteleri düşmüştür. Cd uygulanan ladin ağacı yapraklarının POD aktivitesi başlangıçta artarken, daha sonra düşmüştür [14].

Gram (Cicer arietinum L. cv. Avrodhi) ile yapılan bir çalışmada, yapraklarda düşük ve aşırı B uygulamasında ve Japon turpu köklerindeki diğer bir çalışmada B, PPO aktivitelerini düşürmüştür. Ayçiçeğinde yüksek ve düşük Cu uygulaması ile yapraklardaki, buğdayda Cu veya Zn eksikliğinde yapraklardaki ve havuç ve turpun köklerinde artan Cd konsantrasyonlarında PPO aktiviteleri düşmüştür. Soya fasulyesi ve tütün yapraklarında B uygulamasının ve Marsilea minuta'ya Cd uygulanmasının PPO aktivitelerini artırdığı tespit edilmiştir. Mısır yapraklarında, Cu eksikliğinde PPO aktivitesi düşerken aşırı Zn ile bu aktivite düzeltilmiştir. Mısır tohumlarının embriyo ve endosperm dokularındaki PPO aktivitesi düşük B konsantrasyonlarında (0.1 ve 1 mM) artarken, B'un aşırı konsantrasyonlarında (10 ve 20 mM) düşmüştür. Cu uygulanan domates yapraklarında, önce PPO aktiviteleri geçici olarak artarken yüksek Cu konsantrasyonlarında ise PPO aktiviteleri düşmüştür [14].

Bu çalışmanın amacı, ağır metal etkisi altında tere (*Lepidium Sativum*) bitkisinde bazı enzim (Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Peroksidaz, Polifenol Oksidaz) aktivitelerinin belirlenmesidir.

## **BÖLÜM 2. ENZİMLER**

### **2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi**

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki maddelere enzim denir. Enzim kelimesi mayada bulunan anlamına gelir. Bu maddeler kendileri bir değişikliğe uğramadan hücre içinde meydana gelen reaksiyonların hızını arttırırlar [21].

Enzimler, biyolojik sistemlerin reaksiyon katalizörleridirler; biyokimyasal olayların vücutta yaşam ile uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan kimyasal maddelerdir. Biyolojik katalizörler olarak da tanımlanan enzimler; besleyici moleküllerin yıkıldığı, kimyasal enerjinin depolandığı ve şeklinin değiştirildiği, basit prekürsörlerden biyolojik makromoleküllerin yapıldığı metabolik yollarda yüzlerce reaksiyon basamağını katalize ederler. Enzimlerle katalize edilen tepkimeye katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Enzimler, spesifik kimyasal reaksiyonları hızlandırır; substratları için yüksek derecede spesifiteye sahiptirler; sulu çözeltilerde çok ılımlı sıcaklık ve pH durumları altında fonksiyon gösterirler. Metabolizmaya katılan birçok enzimin bazıları düzenleyici enzimlerdir. Enzim sistemleri, düzenleyici enzimlerin etkisi vasıtasıyla, yaşamı sürdürmek için gerekli birçok farklı metabolik aktivite arasında uyumlu bir etkileşim oluşturmak üzere ayarlanır. Düzenleyici enzimler, çeşitli metabolik sinyallere katalitik aktivitelerini gerektiği şekilde değiştirerek cevap verirler. Biyokimya tarihçesinin çoğu, enzim araştırmalarının tarihçesidir. Enzimlerin incelenmesinin çok büyük pratik önemi vardır. Özellikle kalıtsal genetik bozukluklar gibi bazı hastalıklarda dokulardaki bir veya daha fazla enzimin eksikliği veya tam yokluğu söz konusu olabilir; anormal şartlar, spesifik bir enzimin aşırı aktivitesi nedeniyle oluşmuş olabilir. Bu nedenle

kan plazmasındaki, eritrositlerdeki veya doku örneklerindeki belli enzimlerin aktivitelerinin ölçülmesi, hastalıkların tanısı için önemlidir [22].

Biyokimya tarihinde araştırmaların büyük çoğunluğunu enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmuştur. Kataliz olayı ile ilgili ilk önemli denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerinde yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışmayı 1835 yılında S.S. Berzelius gerçekleştirmiş, diastazın nişastayı ‘‘in vivo’’ olarak sülfürik asitten daha yüksek verimde hidrolizlediğini göstermiştir [21].

1860 yılında Pasteur fermantasyon olayının enzimlerce gerçekleştirildiğini göstermiş, bu yüzden enzimler için ‘‘ferment’’ kelimesi kullanılmaya başlanmıştır. Enzimlerle ilgili en önemli gelişme, 1926 yılında Sumner’in üreaz enzimini kristallendirdikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya koymasıdır. Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim tanımlanmış, enzimlerin birçoğu saf halde elde edilip kinetikleri incelenmiş ve 200’den fazlası da kristallendirilmiştir [21].

### **2.1.2. Enzimlerin genel özellikleri**

Enzimlerle ilgili pek çok konu aydınlatılmış olmakla birlikte, hala yeni enzimlerin saflaştırılması, özelliklerinin ve kataliz mekanizmalarının aydınlatılması için yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Enzimlerle ilgili biyokimya dalına enzimoloji denir.

Enzimler doğal olarak yalnızca canlılar tarafından sentezlenen protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Solunumun, büyümenin, kas kasılmasının, sinirdeki iletimin, fotosentezin, azot bağlanması, deaminasyonun, sindirim gibi birçok sistemin temelini oluştururlar. Canlı hücrelerde tepkimeler kural olarak 0 - 50 °C; çoğunlukla da 20 – 42 °C arasında meydana gelir. Bu sıcaklıkta tepkimelerin oluşması biyokatalizör denen enzim ya da fermentlerle olur. Bu, aktivasyon enerjisinin düşürülmesi ile olur [22].

Enzimler mol kütlesi  $10^4$ – $10^6$  akb arasında değişen büyük moleküllerdir. Enzimler reaksiyon hızını  $10^6$ - $10^{16}$  defa arttırabilirler. Örneğin CO<sub>2</sub>’nin suyla etkileşerek

karbonik aside dönüşmesini katalizleyen karbonik anhidraz enzimi 1 saniyede  $10^5$  tane  $\text{CO}_2$  molekülünün reaksiyona girmesini sağlar [23].

Enzimlerin katalizleme gücü diğer kimyasal katalizörlere göre çok fazladır. Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını  $10^{20}$  kat arttırırken, diğer katalizörler  $10^2$ – $10^4$  kat arttırabilmektedir [24].

Enzimlerin katalizör olarak etki ettiği maddelere substrat denir [23,24,25]. Enzimler, hem katalizledikleri reaksiyon tiplerine hem de ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifiktirler. Genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizlerler. Substratlara karşı spesifikleri ise oldukça yüksek hatta bazen mutlaklıdır. Birbirlerine çok benzeyen maddeleri, hatta aynı maddenin stereoizomerlerini bile dönüşüme uğratmazlar. Bu yüksek seçicilik sayesinde en basit bir hücrede bile aynı anda binlerce biyokimyasal reaksiyon meydana gelmektedir [25].

Bazı enzimler tek başlarına katalizör olarak etki edebildikleri halde bazılarının proteinlerden farklı yapıda maddelere ihtiyacı vardır. Enzimlerin aktivitesini gösterebilmesi için gereken bu maddelere kofaktör denir. Kofaktörler bir metal iyonu olabileceği gibi koenzim adı verilen bir organik molekül de olabilir. Bazı enzimler her ikisini birlikte kullanır. Enzim kofaktör kompleksine holoenzim denir. Kofaktör ayrılınca kendi başına biyolojik aktiflik gösteremeyen protein kısmına ise apoenzim adı verilir.

Bazı kofaktörler enzime gevşek bağlanır ve diyalizle ayrılabilirler; bazıları ise enzimle kovalent bağlar yapar ve enzimden kolayca ayrılamazlar. Bu tip kofaktörlere prostetik grup denir [25,26].

Apoenzimlerin protein yapısındaki türleri ve dizilişleri her enzimde farklılık gösterir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve özgüllüğünü belirleyen kısım apoenzimdir. Apoenzim, enzimin dializ edilemeyen ve ısıya dayanıklı kısmıdır [23,24].

Apoenzimler tek başlarına aktivite gösteremezler, ancak koenzimle birlikteyken katalitik aktivite kazanır. Metal iyonları Lewis asidi olarak davrandıklarından elektron çifti alıcısıdır. Biyolojik açıdan önemli karboksil ucundan hidrolizler. Enzimin aktivite göstermesi için parçalayacağı protein karboksil grubu, enzim aktif bölgesini oluşturan histidin 69,196 ve glutamat 72 ile bir koenzim olan  $Zn^{2+}$  arasında koordinasyon kompleksi oluşturması gerekmektedir. Metal iyonu ile oluşan bu koordinasyon kompleksinin konformasyonu sonucu optimum kataliz gerçekleşir.

Koenzim olarak kullanılan önemli maddelerden birisi de vitaminler veya onların türevleridir. Bu amaçla genellikle B grubu vitaminleri kullanılır. Bu maddeler, yerdeğiştirme tepkimelerinde çok, yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinde daha az oranda kullanılırlar. Nikotinamid adenin dinükleotid ( $NAD^+$ ), bir çok yükseltgenme-indirgenme tepkimesinde yer alan bir koenzimdir. Nikotinamid halkası, adenin halkası ve iki riboz halkasının birleşmesinden oluşmuştur. Yükseltgenme-indirgenme reaksiyonu nikotinamid halkasındaki amid üzerinden yürür. Nikotinik asit diğer adı B grubu vitaminlerinden birisi olan niasindir. B6 vitaminleri olan piridoksal, piridoksamin ve piridoksin de amino gruplarının bir molekülünden diğerine transferinde görev alırlar [24,27].

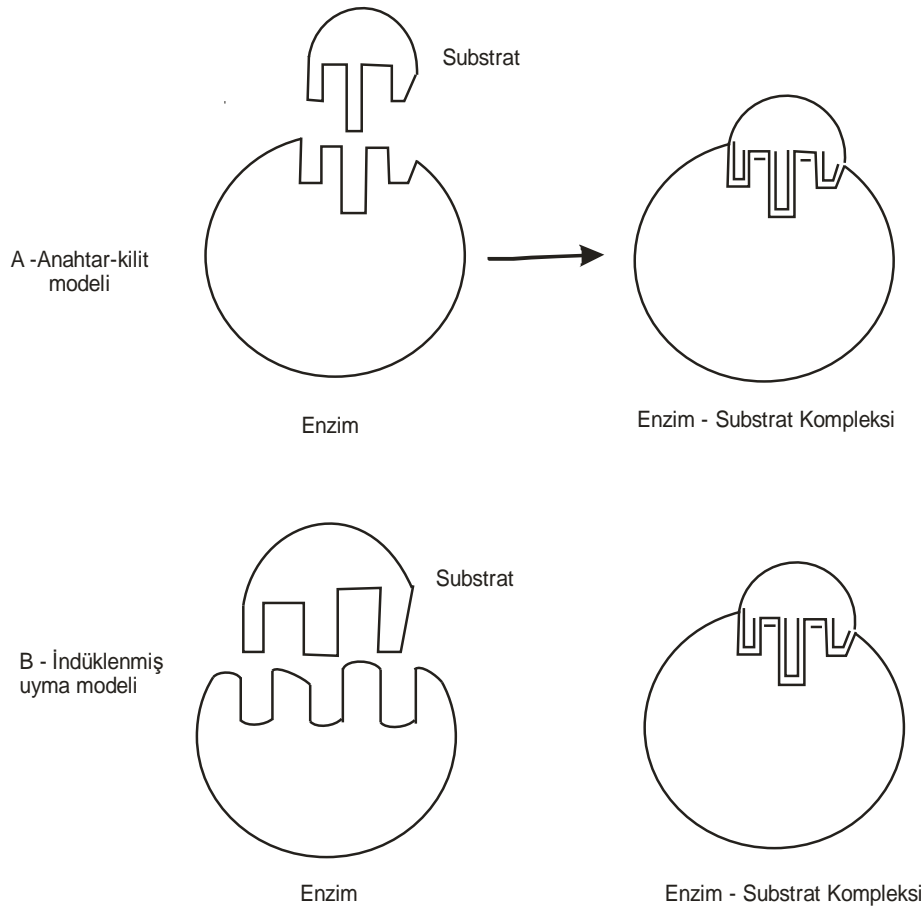
Kofaktör olarak rol oynayan metal iyonlarının fonksiyonu üç şekilde açıklanmaktadır.

- Metal iyonu birinci derecede kataliz merkezi olabilir.
- Enzim substratla koordinasyon kompleksi şeklinde bağlayan bir köprü ödevi yapabilir.
- Enzimin, katalitik aktivitesini gösterebileceği bir konformasyonda, kararlı olmasını sağlayabilir.

Enzimler genellikle substratlardan daha büyük moleküllerdir. Enzim molekülü üzerinde kofaktör ve koenzimlerin yer aldığı enzim substrat kompleksinin şekillendiği dar bir bölge aktif merkezi teşkil eder. Aktif merkezde substrat bağlama bölgesi ve bir veya daha fazla katalitik aktivite bölgeleri mevcuttur. Enzimin aktif merkezde substrata bağlanması hakkında iki hipotez mevcuttur. Bunlardan birisi substrat ile enzim arasında anahtar-kilit modelidir. Diğerisi ise indüklenmiş uyma



modelidir. İkinci hipoteze göre aktif merkez fleksibl bir durum göstermekte ve ancak substrat enzim yüzeyine bağlanınca belirli bir şekil almaktadır [25].

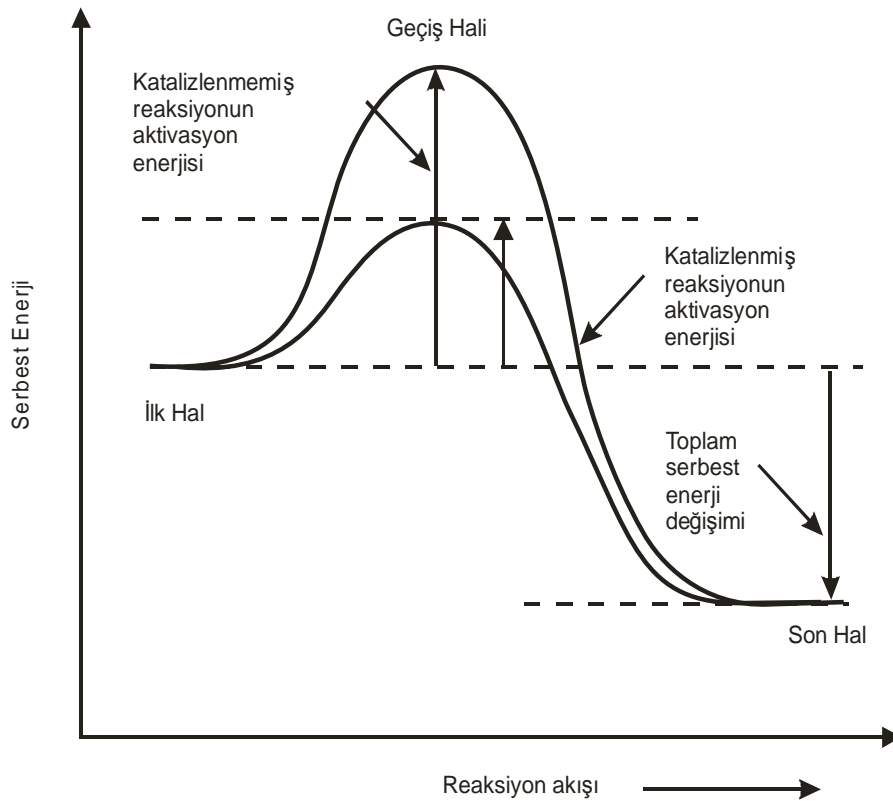


Şekil 2.1. Aktif merkezin substrata uygunluğu

Enzimlerin katalitik aktiviteleri çeşitli şekillerde düzenlenebilir. Bir enzimatik reaksiyonun hep aynı hızla meydana gelmemesi organizmaya ihtiyacı olan esnekliği sağlar. Hücredeki enzim miktarları sabit olmayıp ihtiyaca göre artar veya azalır. Bu durum enzimlerin sentez ve yıkım hızlarının ayarlanması ile gerçekleşir. [23]

Enzimler katalizledikleri reaksiyonlarda denge konumunu ve denge sabitini değiştirmez, sadece dengeye daha çabuk erişilmesini sağlarlar. Hızın artması kimyasal katalizörlerde olduğu gibi aktivasyon enerjisinin küçülmesinden ileri gelir. Şekil 2.2'de katalizörlü ve katalizörsüz bir reaksiyon için reaksiyon profili görülmektedir. Reaktif ve ürünü ayıran enerji bariyerinin tepe noktası aktif kompleksi gösterir. Reaktiflerin ürüne dönüşmesi için önce aktif kompleksin oluşması gerekir. Bir mol substrat molekülünü aktif kompleks haline geçirmek için

gereken enerjiye aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) denir. Aktivasyon enerjisi reaksiyonun oluşması için, aşılması gereken bir enerji bariyeridir. Bu bariyeri aşıp aktif kompleksi oluşturan substrat molekülleri ürüne dönüşebilir. Aktivasyon enerjisine sahip moleküllerin sayısını artırmak yani reaksiyonu hızlandırmak için iki yol vardır. Birincisi sıcaklığı yükseltmek, diğeri katalizör ilave etmektir. Biyokimyasal reaksiyonlarda sıcaklığın yükselmesi mümkün olmadığına göre, reaksiyon hızı ancak enzim katalizörlüğü ile artırılabilir. Şekil 2.2 'den görüldüğü gibi katalizörlü bir reaksiyon için aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) daha küçüktür. Dolayısıyla reaksiyon hızlanmış olur [23].



Şekil 2.2. Katalizörlü ve katalizörsüz reaksiyon için reaksiyon profili

## 2.2. Enzimlerin Adlandırılmaları Ve Sınıflandırılmaları

Enzimler önceleri genellikle “az” eki ile biten (Üreaz, amilaz, arjinaz, proteaz ve lipaz gibi) isimlerle ve bazı proteolitik enzimler de “in” eki ile biten (pepsin, tripsin, kimotripsin, gibi) isimlerle adlandırılmışlardır. Ancak zamanla enzimlerin sayısı

hızla artınca özel isimlerin yeterli olamayacağı anlaşılmıştır. Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) bir enzim komisyonu kurmuş ve bu komisyon 1964 yılında sistematik bir isimlendirme ve sınıflandırma yapmıştır. Bu sistem üzerinde 1972 ve 1978 yıllarında yapılan düzenlemelerle enzimlere kod numaraları verilmiş ve enzimler 6 ana gruba ayrılmıştır. Enzim kod numaraları noktalarla ayrılmış 4 rakamdan ibaret olup ilk rakam enzimin 6 ana enzim grubundan hangisine girdiğini, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam akseptörü, dördüncü rakam ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını gösterir. Bu 6 grup tabloda belirtilmiştir [23,25].

Tablo 2.1. Enzim sınıfları

Sınıf	İsim	Katalize ettiği reaksiyon tipi
1	Oksidoredüktazlar	Oksidasyon-Redüksiyon reaksiyonları
2	Transferazlar	İki molekül arasında bir atom veya grubun transferi
3	Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonları
4	Liyazlar	Çift bağa katılma ve eliminasyonla çift bağ oluşumu
5	İzomerazlar	İzomerizasyon reaksiyonları
6	Ligazlar	ATP hidrolizi ile bağ oluşması

Sistematik adlandırmaya göre; ATP-kreatin fosfotransferaz (EC 2.7.3.2) için EC harfleri enzim komisyonunu ifade eder. Enzimin adı, ATP ile kreatin arasında fosfat transferi yapan bir enzimi belirtir. Numaralandırmada yer alan ilk sayı (2) enzim sınıfını (transferaz), ikinci sayı (7) alt sınıfı (fosfat), üçüncü sayı (3) alıcı grubun azotlu olduğunu, dördüncü sayı (2) enzime ait bir seri numarasını belirtir [23].

### 2.3. Enzimlere Etki Eden Faktörler

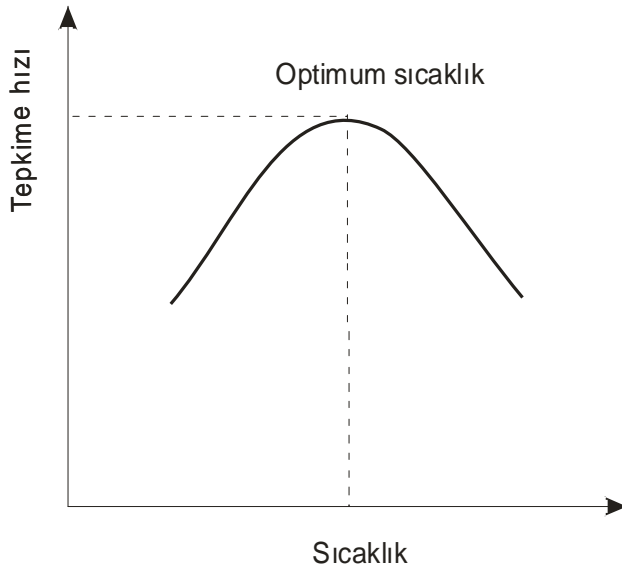
Enzimatik reaksiyonların hızını değiştiren faktörler

- Sıcaklık
- pH
- Enzim konsantrasyonu
- Zaman

- Substrat konsantrasyonu
- Ürün konsantrasyonu
- Çeşitli iyonlar
- Fiziksel faktörler
- İnhibitör

### 2.3.1. Sıcaklığın etkisi

Enzimlerin katalizör olarak etki gösterdiği reaksiyonlar üzerinde sıcaklığın hızı doğrudan arttırıcı bir etkisi vardır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir. İn vitro enzim reaksiyonları çoğu zaman 37°-40°C’de yapılır. Çoğu enzim 50°-60°C’de inaktive olur. Sıcakta denatüre olan enzimler, denatürasyon sıcaklığı belli bir değerin altında kalmak şartıyla soğutulunca tekrar aktifliklerini kazanır, renatüre olurlar [23].



Şekil 2.3. Sıcaklık – reaksiyon hızı grafiği

### 2.3.2. pH

Enzimler katalizör olarak reaksiyona etki ederken ortamın hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteleri değişmektedir. Bazı enzimler düşük pH

seviyelerinde (asit ortamda) daha aktif olmakla beraber, bazıları ise yüksek pH'lı ortamlarda (bazik ortamda) aktiftirler.

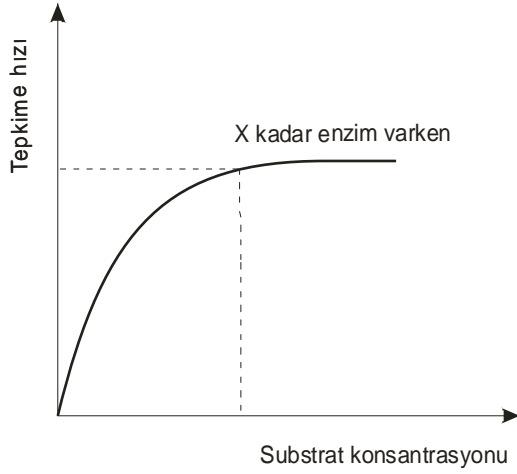
Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'ı adı verilir. Bu da çeşitli enzimlerde farklılık gösterir. Asit ve alkali ortam enzimatik reaksiyonun hızını etkilediğinden enzim analizlerinde tampon solüsyonları ile stabil ve uygun pH temin edilir. Optimum pH, kullanılan tamponun cinsine, özel substratın yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlıdır.

### **2.3.3. Zaman**

Bir enzim tarafından katalize edilen bir reaksiyon sürerken reaksiyonun hızı giderek düşer. Bunun nedeni reaksiyon devam ederken oluşan ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla inaktive olması, reaksiyonu önleyen maddelerin teşekkül etmesi ve substratın tükenmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları çoğunlukla substratın yaklaşık %10'unun sarf edildiği reaksiyonun başlangıç aşamasında gerçekleştirilir [25].

### **2.3.4. Substrat konsantrasyonu**

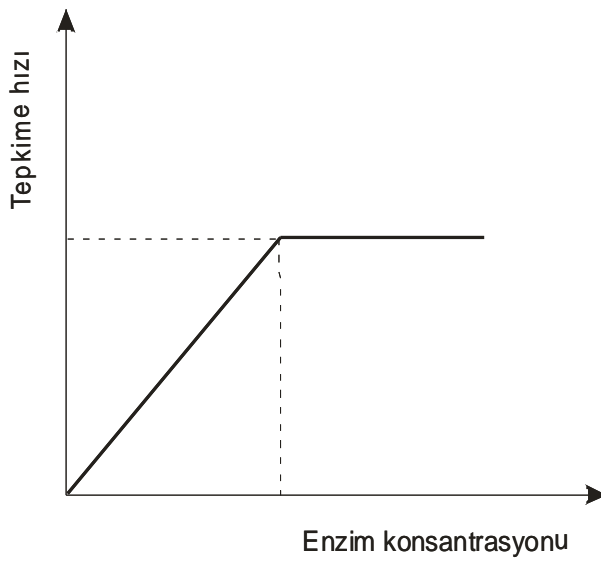
Sabit enzim konsantrasyonunda, enzim reaksiyonunun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artar. Buradan sonra enzim substratına karşı doygunluğuna ulaştığında reaksiyon hızı değişmeden devam eder. Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışıyor demektir. Maksimum hız  $V_{max}$  ile gösterilir [25].



Şekil 2.4. [S] - Reaksiyon hızı grafiği

### 2.3.5. Enzim konsantrasyonu

Enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin substratına doymuş olduğu koşullarda enzim konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Ortamdaki enzim molekülü ne kadar çoksa reaksiyon o kadar hızlı yürür. Enzimin hücrede lokalize olduğu yerde yeterince substrat bulunmadığı için reaksiyon o derece yüksek düzeyde meydana gelmez. Substratın bol olduğu koşullarda enzim konsantrasyonu reaksiyon hızı ile doğru orantılıdır.



Şekil 2.5. [E] - Reaksiyon hızı grafiği

### 2.3.6. İnhibitör

Enzimle katalize edilen reaksiyonların hızını azaltan maddelere inhibitör denir. İnhibitörler enzimatik reaksiyonların hızını azaltan maddelerdir. İnhibitörler, substratın enzimin aktif merkezine bağlanıp, enzim-substrat kompleksinin oluşumunu önler. Siyanid, hidrojen sülfür ve karbon monoksit gibi maddelerin canlı organizma üzerine zararlı etkileri enzimleri inhibe etmelerinden ileri gelir. Çeşitli ilaçların etkileri de enzimatik reaksiyonlar üzerindeki inhibitör özelliklerine dayanır [25].

### 2.4 Antioksidan Enzimler

Antioksidan kelimesi çeşitli şekillerde kullanıldığı için tanımlaması oldukça zordur. Antioksidan terimi, aktif oksijen türlerini, kendisi bir yıkıcı radikale dönüşmeden, baskılayan bir molekül olarak tanımlanabilir [16]. Antioksidan veya yükseltgeme önleyici, yağların otoksidasyonunu yavaşlatan madde olarak tanımlanır. İlk belirlenen etkileri hücre zarında bulunan lipitleri oksidasyona karşı korumaları olmuştur. Bunun sonucu olarak antioksidan maddeler lipit peroksidasyonunu engelleyen maddeler olarak adlandırılmışlardır. Antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda okside edici ajanlarla karşılaştıklarında bu ajanlarla yarışarak substratın oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen maddeler olarak tanımlanmışlardır. Canlılarda, kimyasal süreçler (prosesler), özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere, canlıya zarar verebilir. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ kurarak) onların hücrelere zarar vermelerini önler. Bu özellikleriyle hücrelerin anomalileşme, ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azalttıkları için, daha sağlıklı ve yaşlılık etkilerinin minimum olduğu bir hayat yaşama şansını yükseltir [16].

Antioksidanlar çeşitli şekillerde sınıflandırılırlar.

- 1) Yapılarına göre;

- a. Enzimler
  - b. Enzim olmayan proteinler, küçük moleküller
- 2) Kaynaklarına göre;
- a. Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar)
  - b. Dışardan alınanlar (eksojen antioksidanlar)
- 3) Çözünürlüklerine göre;
- a. Suda çözünenler
  - b. Lipitlerde çözünenler
- 4) Yerleşimlerine göre
- a. Hücre içinde bulunanlar
  - b. Ekstraselüler sıvılarda bulunanlar [28].

#### **2.4.1. Antioksidan savunma sistemi**

Ağır metaller doğrudan etkileri yanında, serbest radikal oluşumunu teşvik ederek dolaylı yoldan da bir çok zarara (oksidatif stres) neden olurlar. Serbest radikaller içinde özellikle aktif oksijen türleri olan  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  radikalleri ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde bitkiye zarar verecek düzeylere çıkabilmektedir. Bitkiler serbest radikallerin zararlarından korunmak için kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Antioksidan savunma sistemi, enzimleri ve bazı indirgen molekülleri içeren bir sistemdir.

Antioksidan maddeler etkileri aşağıdaki gibi gösterirler.

- 2- Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi,
- 3- Reaktif oksijen türlerinin baskılama yoluyla engellenmesi,
- 4- Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi
- 5- Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi [28].



### 2.4.2. Stres sonucu oluşan serbest radikaller

Bitki hücrelerinde antioksidan savunma mekanizması reaktif oksijen türlerine karşı koruma için geliştirilmiştir. Antioksidan savunma mekanizmalarından biri olan antioksidan enzim mekanizması zararlı oksijen türlerinin yok olması için kullanılır ve bitki hücresinin değişik organellerinde rol oynar. Ayrıca karotenoidlerin de fotosentetik sistemlerde önemli bir antioksidan etkisi vardır [29].

Doğal ve insanlardan kaynaklanan etkiler zararlı oksijen türlerinin oluşumundaki artışı hızlandırır. Bunun sonucu olarak antioksidan savunma mekanizmasının kapasitesi artar. Son yıllarda çeşitli bitkiler üzerine bazı stres koşulları uygulanarak bu antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişimler incelenmektedir.

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu tip maddeler, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksid, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar “antioksidan savunma sistemleri” veya kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz enzimatik antioksidanlar olarak sayılabilirler. Bazı stres koşullarına bağlı olarak çeşitli dokularda antioksidan enzim düzeylerinin değişebileceğini gösteren birçok çalışma yapılmıştır [30].

### 2.4.3. Antioksidan enzimler

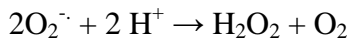
Antioksidan enzimler [süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7), askorbat peroksidaz (APX; EC 1.1.1.11), glutatyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) ve diğer askorbat-glutatyon çevrimi enzimleri (monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR; EC 1.6.5.4) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR; EC 1.8.5.1)] ağır metaller üzerinde doğrudan etkili değildir, oluşan

serbest radikalleri çeşitli dönüşümler yaparak etkisiz hale getirirler ya da antioksidan moleküllerin çevrimini, degridasyonunu ve sentezini katalizler [16].

#### 2.4.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1, EC-SOD) süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir .

Süperoksit dismutaz enzimi (superoxide oxido reductase, EC 1.15.1.1) oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. Oksijen toksisitesine karşı önemli bir savunmadır. Süperoksit dismutaz'ın fonksiyonu aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisine karşı korumaktır. Süperoksit radikallerinin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve oksijene hızlıca dismutasyonunu katalize eder.



Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılır. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki O<sub>2</sub><sup>·-</sup> düzeyleri kontrol altında tutulur [31].

SOD katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir. İlk olarak sığır kanından izole edilen SOD, eritrosuprein, indofenol oksidaz ve tetrazolium oksidaz olarak değişik adlarla tanımlanmıştır. Enzimin katalitik fonksiyonu ise ilk kez McCord ve Fridovich (1969) tarafından keşfedilmiştir. Aktif merkezlerinde yer alan metal kofaktörlerine bağlı olarak SOD'un üç izoenzimi vardır. Bunlar bakır veya çinko içeren Cu/ZnSOD, mangan içeren MnSOD ve demir içeren FeSOD'lardır. Cu/Zn SOD'lar ökaryot hücreler ve kloroplastların sitosolünde, MnSOD'lar mitokondri matriksi ve prokaryotlarda, FeSOD'lar ise genel olarak prokaryotlarda bulunmaktadır. Yeşil bitki yapraklarında süperoksit dismutaz (SOD) enziminin % 90'ından fazlası kloroplastlar içerisinde bulunur [32].

### 2.4.3.2. Katalaz (CAT)

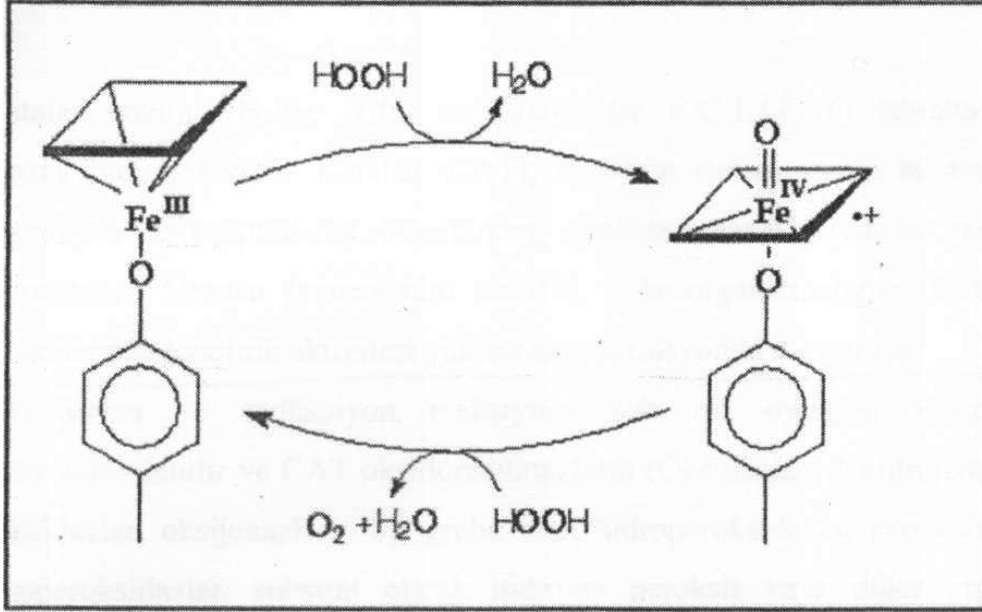
Katalaz enzimi ( $H_2O_2$ :  $H_2O_2$  oxidoreductase E.C.1.11.1.6) bitki hayvan ve aerobik bakterilerde bulunan ve hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ), su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Yapısında 4 adet hem molekülü bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositler, katalazın en yüksek aktiviteye sahip olduğu organlardır [ 33].

Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında rol oynayan enzimlere oksidoredüktazlar denilir ve CAT oksidoredüktazların (Oksidazlar, dehidrojenazlar, hidroperoksidazlar, oksijenazlar) bir grubu olan hidroperoksidazlar sınıfında yer alır. Hidroperoksidazlar, substrat olarak hidrojen peroksit veya diğer organik peroksitleri kullanırlar, aynı zamanda canlıyı zararlı peroksitlere karşı korurlar. Peroksitlerin birikmesi serbest radikallerin ortaya çıkmasına ve membran yapısının bozulmasına, aterosikleroz ve muhtemelen kanser oluşumuna neden olur.

Katalaz, hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüştürülmesini tek yönlü olarak katalizleyen ve böylece hidrojen peroksitin hücresele bileşiklere zarar vermesini engelleyen koruyucu bir enzimdir. Hidrojen peroksit, katalaz tarafından parçalanmazsa vücut için çok tehlikeli bir serbest radikal olan hidroksil radikalinin öncülü olarak davranır ve bu radikal hücrede kalıcı hasarlara neden olur.



CAT enzimi, substrat olarak kullandığı hidrojen peroksitten, hem elektron alıcısı hemde elektron vericisi olarak faydalanmaktadır [34].



Şekil 2.6. Katalaz enziminin etki mekanizması

Şekil 2.6. 'da da görüldüğü gibi katalitik reaksiyonda iki basamak yer alır:

Birinci basamakta katalazın Ferrik (Fe<sup>3+</sup>) içeren hali (Porfirin Katyon Radikali) oluştururken peroksit molekülü ile tepkime verir ve burada peroksit molekülü indirgenir.

İkinci basamakta başka bir hidrojen peroksit molekülü yükseltgenerek bileşik doğal halini alır. Bu reaksiyonlarda hidrojen peroksit hem elektron alıcısı hem de vericisi olarak görev yapar.

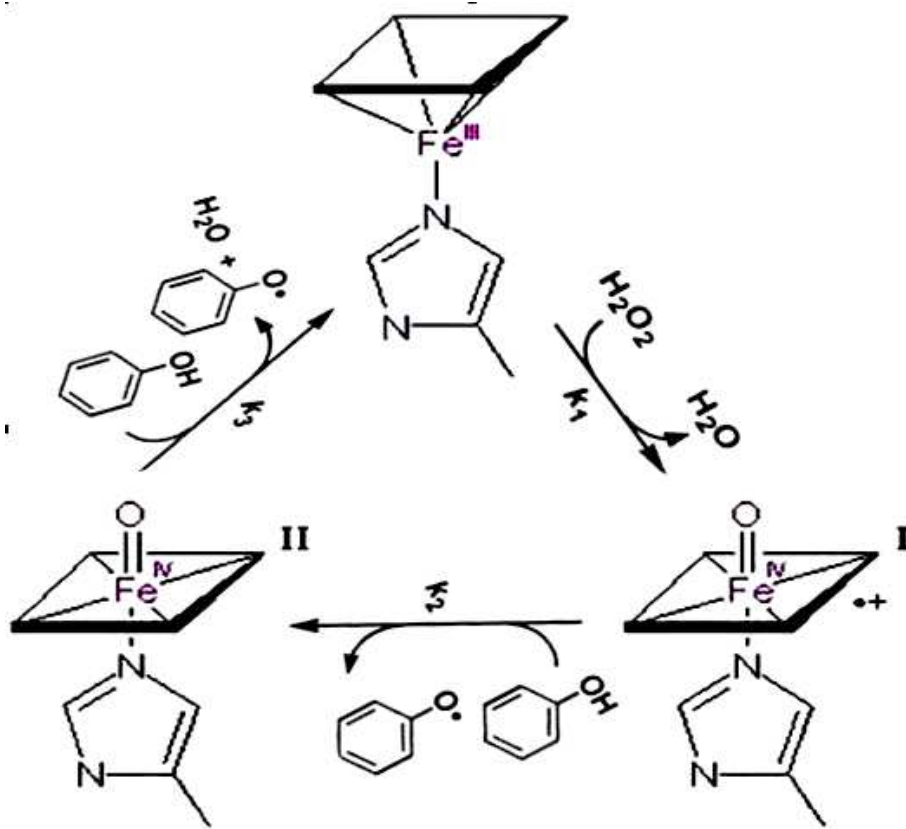
Katalazın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmez [34].

### 2.4.3.3. Peroksidaz

Bitkilerde bulunan peroksidaz (EC1.11.1.7) enzimi bir demir içeren enzim olup prostetik grup olarak ferriprotoporfirin III içerir. Bu enzim membran bağımlı formlarında (mPOD) ya da çözünür halde bulunmaktadır. Kırmızıturptan elde edilen iki mPOD izoenziminin moleküler ağırlığı 44 ve 45 kDa olup çilekten elde

edilenlerin moleküler ağırlığı ise 58,1 ve 65,5 kDa olarak bulunmuştur. Bitki peroksidazları peroksit için belirli ihtiyaçlara sahip olup bunlar peroksit çöpçüleri olarak düşünülebilir. Peroksidin varlığında bitki dokularından izole edilen peroksidazlar, guiakol, pirogallol, klorojenik asit, katekin ve katekol gibi fenolik bileşiklerin geniş bir alanını oksitleyebilir [35].

Peroksidazlar başlıca bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda bulunur. Birbirini izleyen benzerliğin temelinde heme peroksidazlar iki üstfamilya içinde sınıflandırılabilir. Bunlar; mantar, bitki ve bakteri peroksidazları ile hayvan peroksidazlarıdır [36].



Şekil 2.7. Peroksidaz enziminin reaksiyon mekanizması

Bu mekanizmada enzim, Fe<sup>IV</sup> içeren bir porfirin katyon radikali olan bileşik I'i oluşturmak için peroksitin bir ekivalenti ile reaksiyon verir. Bu iki elektronlu bir yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonu olup bu reaksiyondaki hidrojen peroksit suya indirgenirken enzim de yükseltgenmektedir. Bir oksitleme ekivalenti ortadaki oksiferrili (Fe<sup>IV</sup>=O) vererek demir üzerine yerleşir. Bileşik I sonra bir substrat

radikali vermek için organik bir substratı yükseltger. Bileşik I, bileşik II ürününü vererek ikinci bir reaksiyona maruz kalır. Bileşik II normal(dianyonik) bir porfirin ligand için düzenlenmiş oksiferril bir merkez içerir. Sonuç olarak bileşik II bir diğer substratla etkileşerek doğal haline geri indirgenir [37].

#### **2.4.3.4. Polifenol oksidaz (PPO)**

Sebze ve meyvelerde kesim yüzeylerinde fenol bileşiklerinin oksitlenme ürünleri sonucu kahverengi renk oluşumuna sebep olan bir grup enzim için genel bir terimdir. PPO ilk olarak mantarlarda Schoenbein tarafından 1856 yılında bulunan bakır içeren oksidoredüktaz sınıfından bir enzimdir PPO; birçok bitki dokusunda, ıstakoz, karides, yengeç gibi kabuklu deniz hayvanlarında ve bazı mikroorganizmalarda bulunur [27 ].

PPO ayrıca organizma içerisinde koyu pigmentlerin birleşimle birlikte gelişmesi, melanin pigmentinin biyosentezini, başlatılması ve polifenolik grupların korunması görevini sağlar.

Bitkiler kesildikleri yada çürüdükleri zaman, PPO savunma mekanizması içerir, genel olarak fenolik bileşikler oksijenin hazır bulunduğu ortamda polimer yapılara oksitlenir. Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enziminin miktarı ve dağılımı, bitkinin cinsine, yaşına ve olgunluğa bağlıdır [38].

Meyve ve sebzelerde meydana gelen PPO enzimi katalizli enzimatik kararmalar; bunların depolanmaları ve endüstriyel işlenmeleri sırasında kesilme, zedelenme, dondurulmuş meyvenin çözülmesi durumlarında hava oksijeninin etkisiyle meydana gelir. İstenmeyen bu tür kararma reaksiyonları enzim inaktive edilerek önlenmeye çalışılmaktadır.

Bazı gıda teknolojilerinde ise enzimatik polifenol oksidazın neden olduğu enzimatik kararma istenen bir durumdur. Örneğin; siyah çay, siyah üzüm ve kuru erik üretiminde bu enzimatik kararma çok önemlidir [24].

## **BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD**

Metallerle etkileştirilen tere (*lepidium sativum*) bitkisindeki bazı enzim aktivitelerinin incelenmesi amacıyla yürütülen bu çalışmada kullanılan materyal ve yöntemler hakkındaki bilgiler aşağıda verilmiştir.

### **3.1. Materyal**

Deneysel çalışmalar polivinil pirolidon (PVP), askorbik asit dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojenfosfat, 4-metil katekol, hidrojen peroksit, Na<sub>2</sub>EDTA, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, l-methionin, nitro blue tetrazolium (NBT), riboflavin, sığır serum albumini (BSA), bradford reaktifi kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmada alet ve cihaz olarak Shimatzu UV-2401 PC UV-VIS recording spectrophotometer marka UV, derin dondurucu, pH metre (ORION pH 420 A), otomatik pipetler(Mikrolit), hassas terazi (OHAUS analytical standart), blender, mağnetik karıştırıcı ve santrifüj kullanılmıştır.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Tere bitkisinin yetiştirilmesi**

Deneyde materyal olarak tere yetiştirilebilmesi amacıyla, tarla toprağı ( Yalova Subaşı Beldesi toprağı) ve 30 mg/L ve 50 mg/L Cu<sup>2+</sup> ve Fe<sup>2+</sup> çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> ve Pb<sup>2+</sup> çözeltileri kullanılmıştır. Tere tohumu olarak Arzuman Tohumculuk firmasından elde edilen tohumlar kullanılmıştır.

Tere tohumu ekimi saksılarda yapılmıştır. İki gün ara ile 30 mg/L ve 50 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  çözeltileri ve 15 mg/L ve 30 mg/L  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Pb}^{2+}$  çözeltileri kullanılarak sulama yapılmıştır. Sekiz saat güneş göreceğ şekilde muhafaza edilmiştir. Tere bitkisinden 4-5 yaprak, belirli bir büyüklüğe erişince hasat edilmiştir.

### 3.2.2. Enzim aktivite tayini için homojenat hazırlanması

Derin dondurucuda depolanan tere bitkisinden enzim izolasyonu için, 6 gr alınmıştır. 0,1 gr polivinil pirolidon (PVP), 0,0035 gr askorbik asit içeren 30 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7.0) ve 6 gr tere blenderde parçalanmıştır. İzolasyon aşamasında kullanılan PVP, tere de fenolik maddeleri bağlayarak, POD enziminin aktivite göstermesini engellemek amacıyla kullanılmıştır. Fenolik maddelerin oksidasyonu sonucu oluşan kinonlar, enzimi inhibe edebilmektedir. Askorbik asit izolasyon sırasında oluşan o-kinonları azaltmak amacı ile kullanılmıştır. Parçalanmış karışım ham enzim ekstraktı olarak adlandırılmıştır.

Ham enzim ekstraktı çift kat süzgeç kağıdından süzülmüştür. Soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant çökelekten ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant kullanılıncaya kadar 4 °C' de muhafaza edilmiştir.

Bu işlem kontrol grubu teresi, 30 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$ , 50 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$ , 30 mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ , 50 mg/L  $\text{Fe}^{2+}$ , 15 mg/L  $\text{Co}^{2+}$ , 30 mg/L  $\text{Co}^{2+}$ , 15 mg/L  $\text{Cd}^{2+}$ , 30 mg/L  $\text{Cd}^{2+}$ , 15 mg/L  $\text{Pb}^{2+}$ , 30 mg/L  $\text{Pb}^{2+}$  çözeltileri ile beslenen tere bitkileri için ayrı ayrı uygulanmıştır.

### 3.2.3. Kullanılan substratlar

Çalışma sırasında kullanılan çözeltiler günlük olarak hazırlanmıştır. Yapılan çalışmada enzim aktivitesi belirlenirken çeşitli substratlar kullanılmıştır. Aktivite tespiti için kullanılan substratlar Tablo 3.1'de belirtilmiştir.



Tablo 3.1. Aktivite ölçümü için kullanılan substratlar

Enzim	Substrat
SOD	NBT
CAT	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
POD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'li ortamda 4-metil katekol
PPO	4-metil katekol

### 3.2.4. Süperoksit dismutaz aktivite ölçümü

SOD aktivite ölçümü için çeşitli çözeltiler hazırlanmıştır. 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA içeren 50 mM fosfat tamponu (pH:7,6) hazırlamak için 240 ml tampona 0,0089 gr Na<sub>2</sub>EDTA eklenmiştir. 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH:10,2) çözeltisi hazırlamak için 3 ml saf su içerisinde 0,0954 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözülmüştür. 12 mM L-Methionin çözeltisi hazırlamak için 3 ml saf su içerisinde 0,032 gr L-Methionin çözülmüştür. 75 µM Nitro Blue Tetrazolium (NBT) çözeltisi hazırlamak için 10 ml saf su içerisinde 0,0036 gr L-Methionin çözülmüştür.

Toplam süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi, 560 nm'de nitroblue tetrazolium'un (NBT) fotokimyasal indirgenmesinin örnekte bulunan SOD enzimi tarafından inhibe edilmesine dayanarak belirlenmiştir.

SOD analizi için, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA içeren 50 mM fosfat tamponu (pH:7,6), 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH:10,2), 12 mM L-Methionin, 75 µM Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 100µl enzim ekstraktı ve 10µM Riboflavin 10x100 mm'lik cam tüplerde hazırlanmıştır. Reaksiyon hacmi 3 ml'dir. Reaksiyon karışımları 14000 lux ışık şiddetinde 15 dakika bekletilerek ışıklandırılmıştır. 1 birim SOD aktivitesi, 560 nm'de NBT'nin %50 indirgenmesine eşit olacak şekilde aşağıdaki formül uygulanarak belirlenmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (ABS2 - ABS1) / (ABS2) \times 100$$

ABS2: Enzim içermeyen reaksiyonun kör absorbansı

ABS1: Enzim içeren reaksiyonun absorbansı

### 3.2.5. Katalaz (CAT) aktivite ölçümü

50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlamak için 102 µl %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Çözeltisi bidistile su ile 20 ml'ye tamamlanmıştır.

Katalaz enziminin aktivite tayininde spektrofotometrik metot kullanılmıştır. Absorbans ölçümleri 240 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kullanılan metodun esası; aktivite ölçüm ortamında bulunan katalazın, ortamda bulunan hidrojen peroksit ile etkileşimi sonucu meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de izlenmesine dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için 15 mM'lık hidrojen peroksit miktarı hesaplanmıştır ve 3 mL'lik kuartz küvetler kullanılmıştır. 3 mL'lik kuartz küvete 15 mM (450 µl) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sırasıyla 50-100-200-300-400-500 µl enzim ekstraktı ve 3 ml'ye tamamlamak üzere fosfat tamponu (pH 7,0) ilave edildikten sonra küvet içindeki numune karıştırılmış ve fosfat tamponu (pH 7,0) ile substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ihtiva eden köre karşı 240 nm'deki absorbans ölçümleri yapılmıştır.

Ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'ye dönüşümünü sağlarken meydana gelen azalma enzimin aktivitesini göstermektedir. 180 saniye boyunca 240 nm'de meydana gelen absorbans azalışı köre karşı kaydedilmiştir. Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan, dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır.

25 °C'de 1 dakika içinde absorbansı 0,01 azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir.

### 3.2.6. Peroksidaz (POD) aktivite ölçümü

50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi hazırlamak için 102 µl %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi bidistile su ile 20 ml'ye tamamlanmıştır. 100 mM 4-metil katekol çözeltisi hazırlamak için 1,24 gr 4-metil katekol bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Peroksidaz (POD) aktivitesinin belirlenmesi sırasında bütün çalışmalar hidrojen peroksit varlığında gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebi, peroksidaz enziminin hidrojen peroksit substratı varlığında diğer bir substrata karşı aktivite göstermesidir.

Enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle 60 sn süresince 420 nm absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir.. Substrat olarak 5 mM'lık 4-metil katekol ve 2 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır.

3 mL'lik küvete 2 mM (60 µl) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 mM 4-metil katekol ile sırasıyla 50-100-200-300-400-500 µl enzim ekstraktı ve 3 ml'ye tamamlamak üzere fosfat tamponu (pH 7,0) ilave edildikten sonra küvet içindeki numune karıştırılmış ve fosfat tamponu (pH 7,0) ihtiva eden köre karşı 420 nm'deki absorbans ölçümleri yapılmıştır. Ölçümlerde lineer olarak absorbans artışı olan aralıktan, dakika başına absorbans artışı hesaplanmıştır.

25 °C'de 1 dakika içinde absorbansı 0,01 arttıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir.

### **3.2.7. Polifenol oksidaz (PPO) aktivite ölçümü**

100 mM 4-metil katekol çözeltisi hazırlamak için 1,24 gr 4-metil katekol bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

PPO enzimi ile sabit substrat (4-metil katekol), konsantrasyonuna karşı farklı enzim konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılmıştır. Enzim aktivite tayinleri spektrofotometrik yöntemle 60 sn süresince 420 nm absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak 25 mM 4-metil katekol kullanılmıştır.

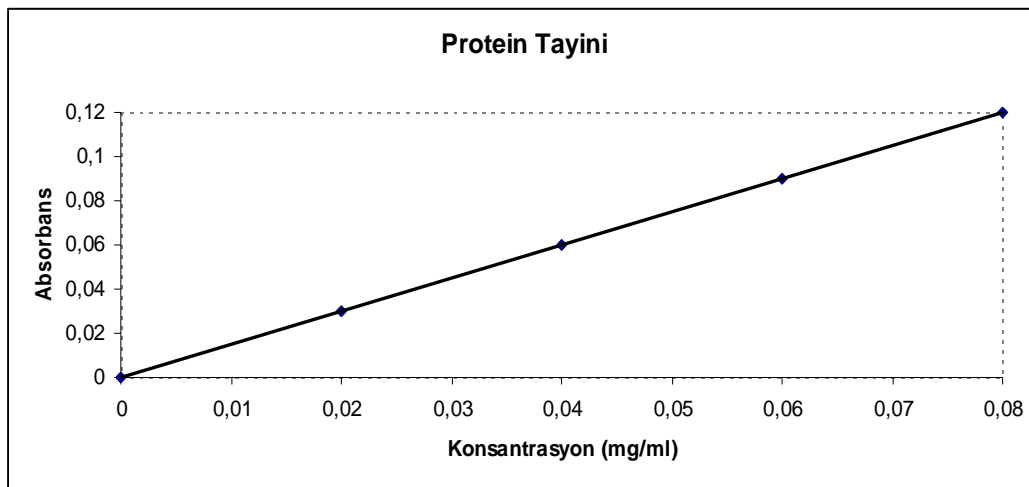
3 mL'lik küvete 25 mM 4-metil katekol ile sırasıyla 50-100-200-300-400-500 µl enzim ekstraktı ve 3 ml'ye tamamlamak üzere fosfat tamponu (pH 7,0) ilave edildikten sonra küvet içindeki numune karıştırıldı ve fosfat tamponu (pH 7,0) ihtiva eden köre karşı 420 nm'deki absorbans ölçümleri yapılmıştır. Ölçümlerde lineer olarak absorbans artışı olan aralıktan, dakika başına absorbans artışı hesaplanmıştır. 25 °C'de 1 dakika içinde absorbansı 0,001 arttıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir.

### 3.2.8. Bradford metodu ile çözümlü protein miktar tayini

Oldukça duyarlı olan bu yöntem (5-100 µg/ml); organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturmasını esas alır. Mavi rengin oluşmasında proteinin amino asit bileşimi (özellikle arjinin gibi bazik amino asitler ve aromatik amino asitler) önemlidir. Yöntemde temel alınan olgu, boya normal şartlarda 465 nm'de maksimum absorbans verirken, protein ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesidir.

Anlatılan metotların yanı sıra protein tayini yapılırken, koşullar uygun olduğu takdirde, Smith yöntemi, Kjeldahl analizi, bulanıklık ölçümleri (turbidimetri), özgül aktivitenin ölçülmesi, kırılma indeksinin ölçülmesi (refraktometri) ve saflaştırılıp kurutulmuş örneklerin doğrudan, tartılması yöntemlerinden de faydalanılabilir [37].

Bu deneyde standart protein çözeltileri, sığır serum albumini (BSA) kullanılarak hazırlanmış ve standart grafikleri şekil 3.1'de belirtildiği gibi çizilmiştir.



Şekil 3.1. Bradford yönteminin standart grafiği

Bu amaçla bizim çalışmamızda standart protein grafiğinin elde edilmesi için 1 mg/ml serum albumin miktarı olacak şekilde 250 ml serum albumin çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl alınmıştır. Hacim 1ml Bradford ile tamamlanmıştır. 595 nm'de absorbans ölçülmüştür. Standart protein grafiği elde edilen sonuçlara göre çizilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen kısmen

saf enzim 595 nm'de absorbansı ölçülerek standart, standart protein grafiği ile protein miktarı tayin edilmiştir.

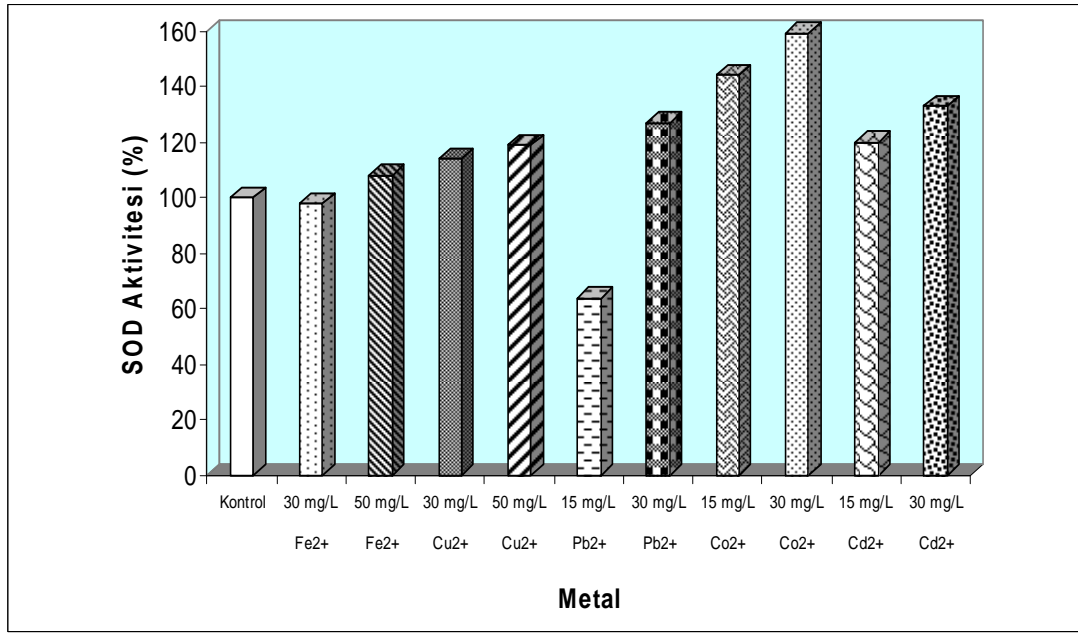
## BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Tere Bitkisinden Elde Edilen Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Bulguları

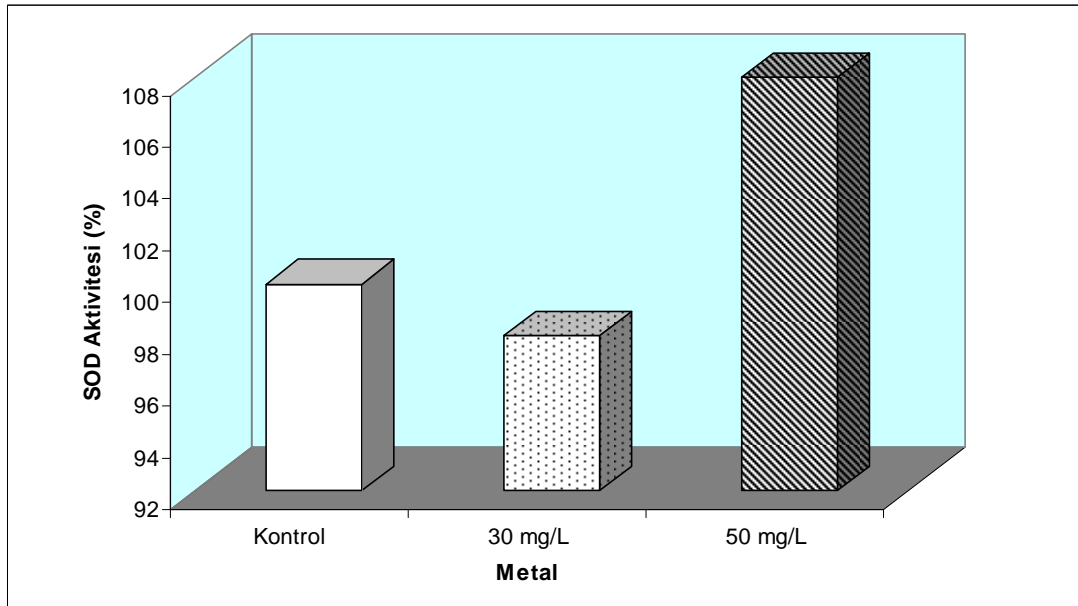
Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde süperoksit dismutaz aktiviteleri Tablo 4.1. ve Şekil 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5., 4.6. 'da gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Cu^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde süperoksit dismutaz aktivite değerleri

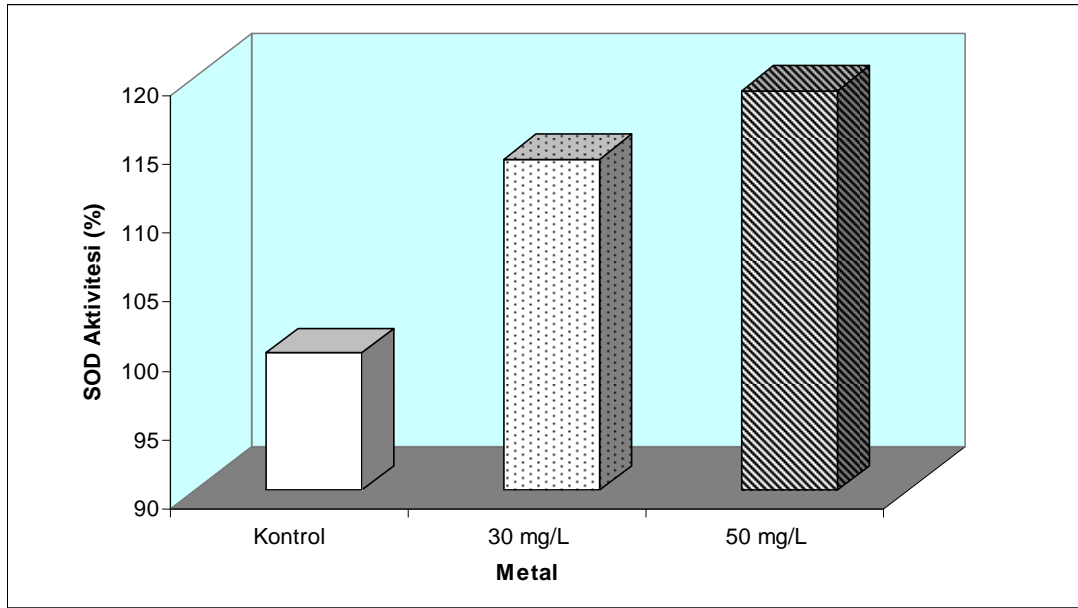
			$\Delta A/300\mu l$	EU/ml	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Aktivite
Kontrol			0,6928	0,64	4,38	100
$Fe^{2+}$	30	mg/L	0,7035	0,63	4,02	98
	50	mg/L	0,6743	0,69	2,69	108
$Cu^{2+}$	30	mg/L	0,6565	0,73	4,55	114
	50	mg/L	0,6372	0,76	3,55	119
$Pb^{2+}$	15	mg/L	0,8187	0,41	2,47	64
	30	mg/L	0,6129	0,81	3,13	127
$Co^{2+}$	15	mg/L	0,5548	0,92	5,41	144
	30	mg/L	0,5059	1,02	3,62	159
$Cd^{2+}$	15	mg/L	0,6302	0,77	4,28	120
	30	mg/L	0,5918	0,85	3,10	133



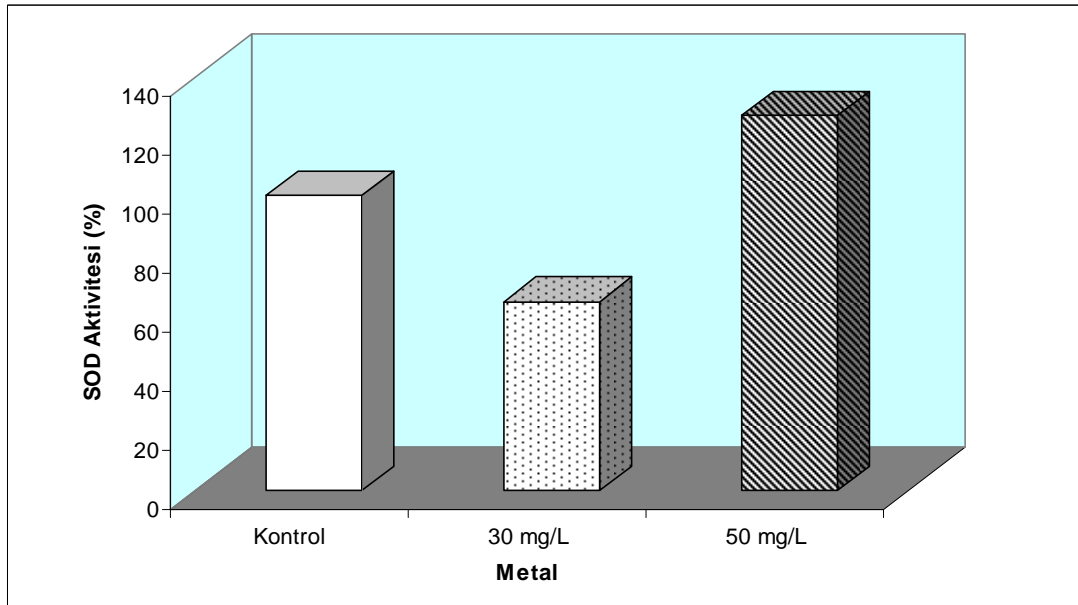
Şekil 4.1. Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Pb}^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde süperoksit dismutaz aktiviteleri



Şekil 4.2. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Fe}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen süperoksit dismutaz aktivitesi

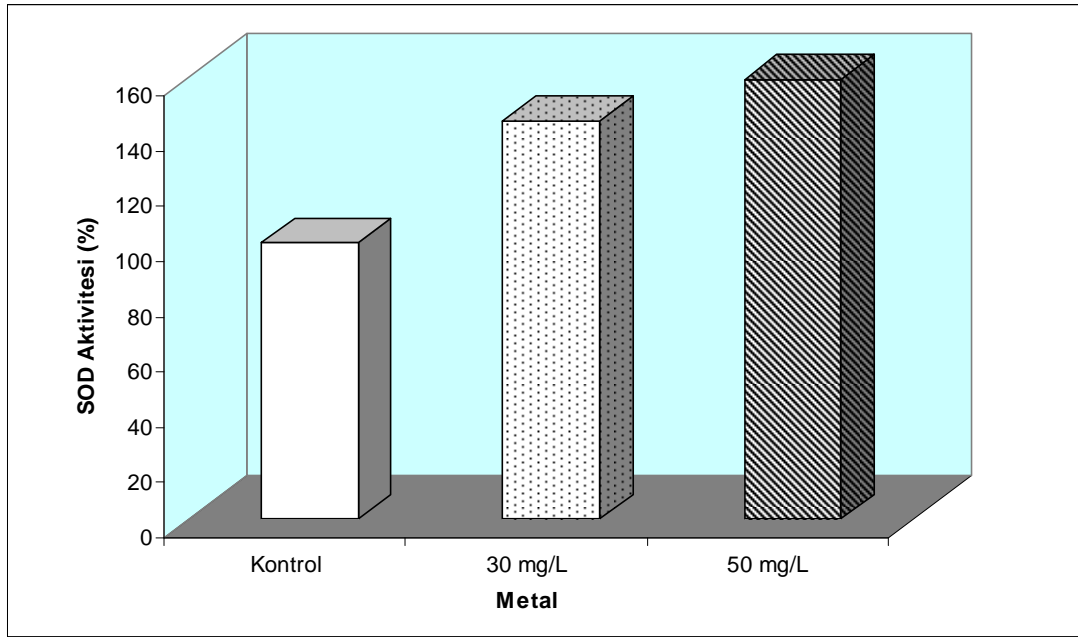


Şekil 4.3. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Cu}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen süperoksit dismutaz aktivitesi

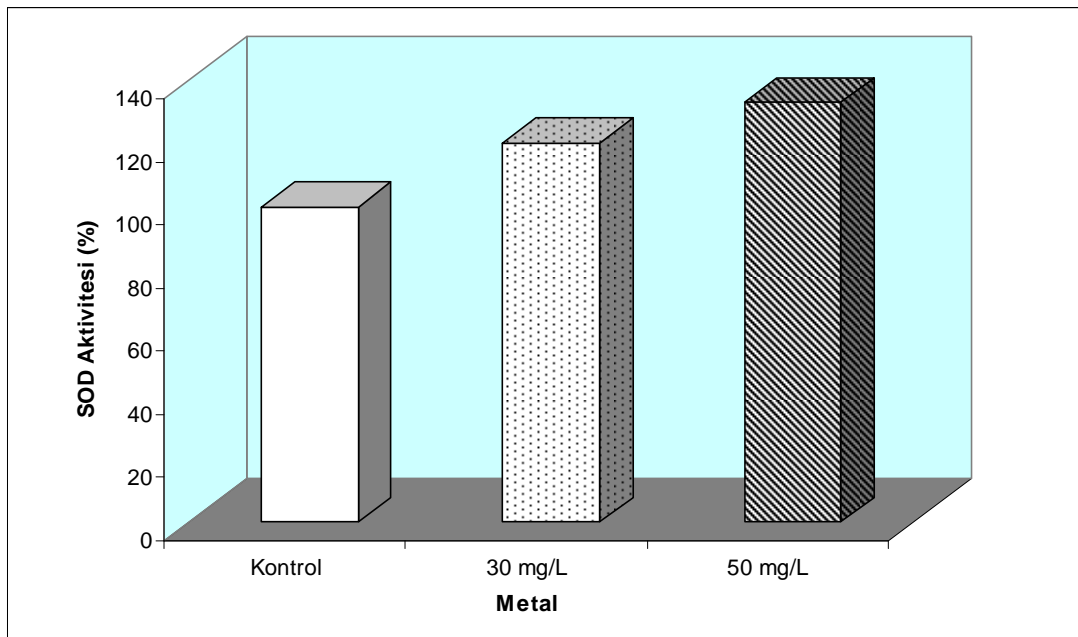


Şekil 4.4. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Pb}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen süperoksit dismutaz aktivitesi





Şekil 4.5. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Co}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen süperoksit dismutaz aktivitesi



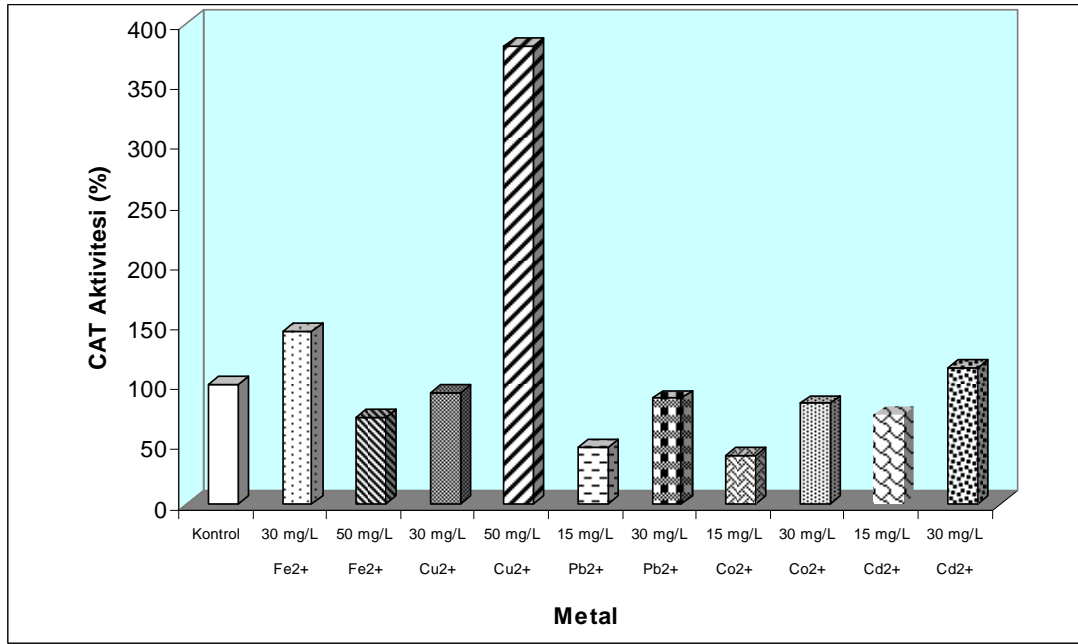
Şekil 4.6. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Cd}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen süperoksit dismutaz aktivitesi

#### 4.2. Tere Bitkisinden Elde Edilen Katalaz Enzim Aktivitesi Bulguları

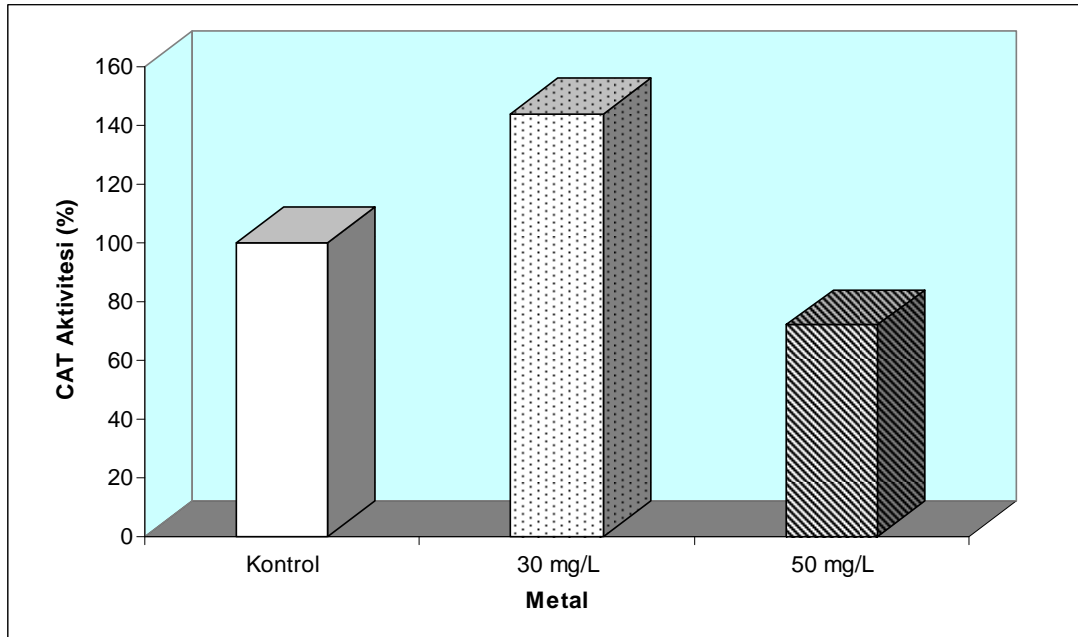
Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde katalaz aktiviteleri Tablo 4.2. ve Şekil 4.7., 4.8., 4.9., 4.10., 4.11., 4.12. 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Cu^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde katalaz aktivite değerleri

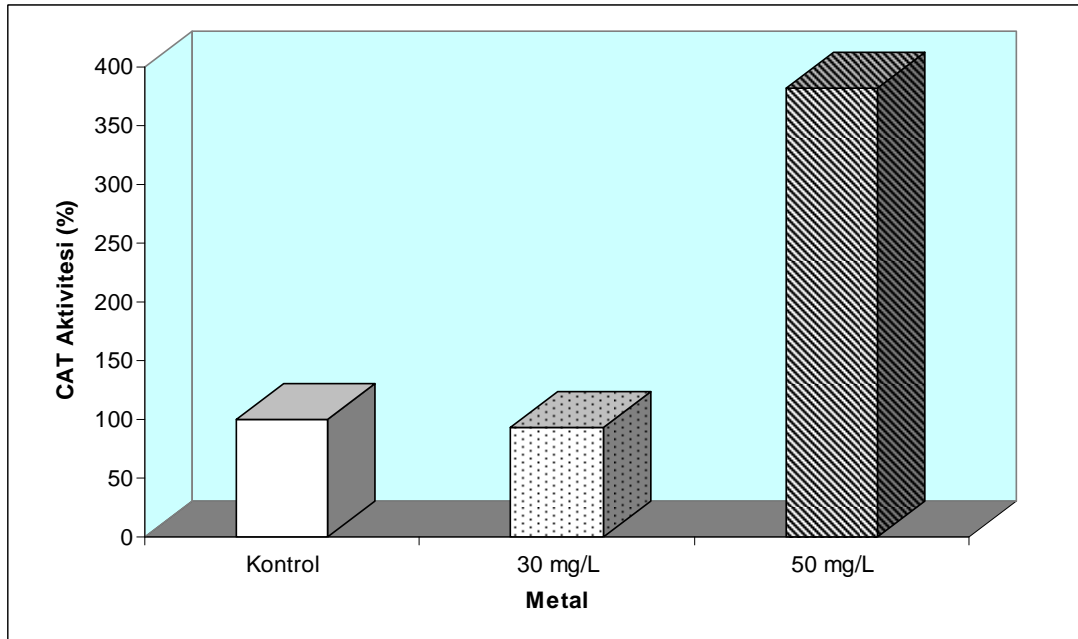
			$\Delta A/300\mu l$	EU/ml	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Aktivite
Kontrol			0,0057	1,90	13,00	100
$Fe^{2+}$	30	mg/L	0,0082	2,73	17,44	144
	50	mg/L	0,0041	1,37	5,33	72
$Cu^{2+}$	30	mg/L	0,0053	1,77	11,01	93
	50	mg/L	0,0218	7,27	33,96	382
$Pb^{2+}$	15	mg/L	0,0027	0,90	5,41	47
	30	mg/L	0,005	1,67	6,45	88
$Co^{2+}$	15	mg/L	0,0023	0,77	4,51	40
	30	mg/L	0,0048	1,60	5,68	84
$Cd^{2+}$	15	mg/L	0,0043	1,43	7,96	75
	30	mg/L	0,0065	2,17	7,91	114



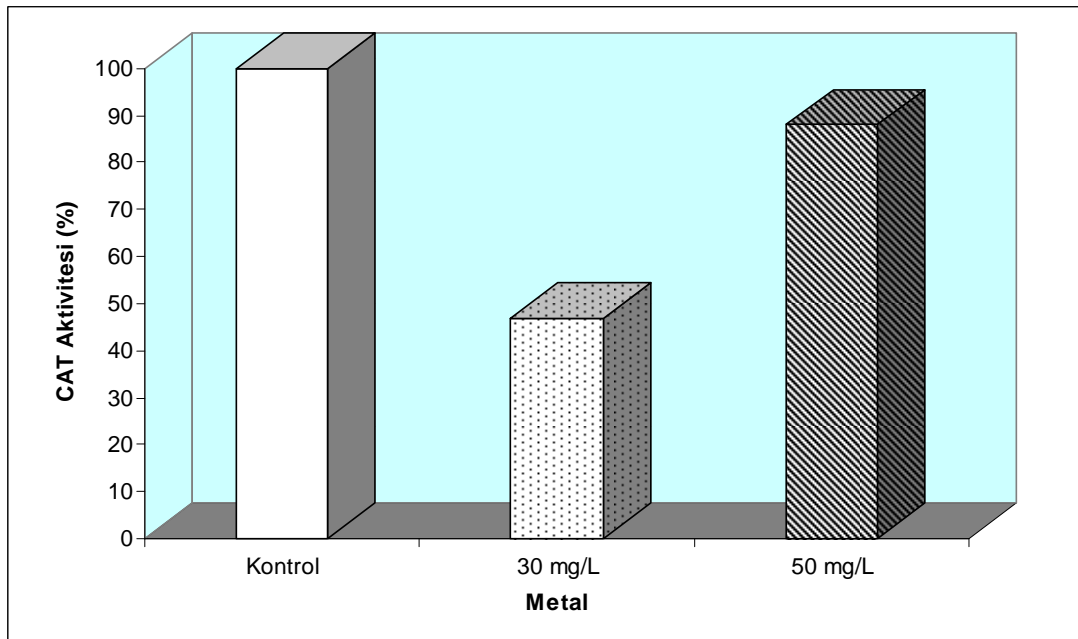
Şekil 4.7. Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Pb}^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde katalaz aktivite değerleri



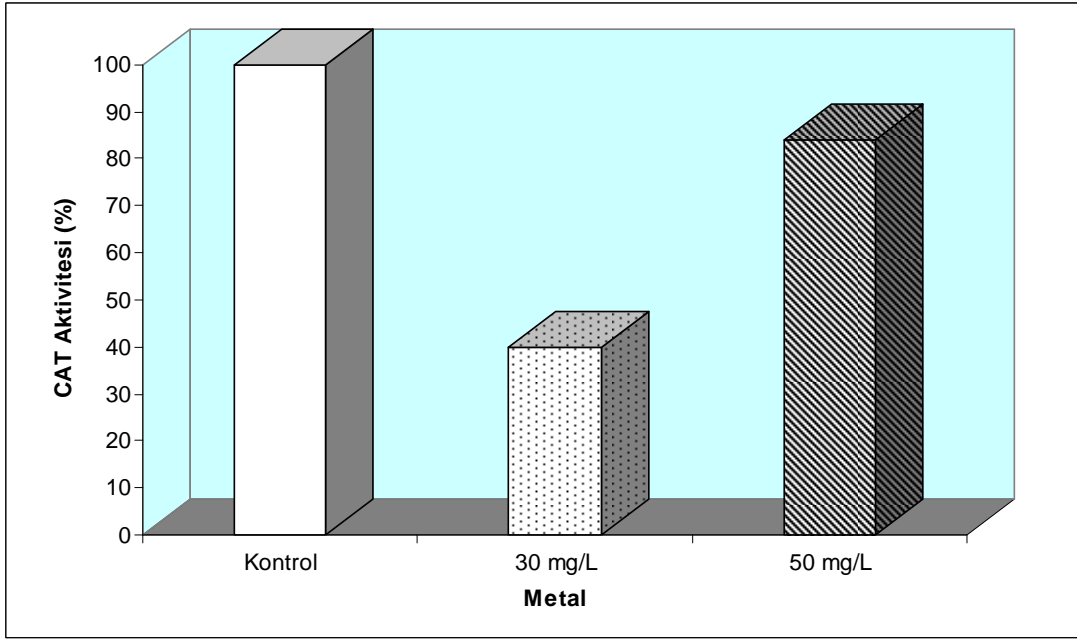
Şekil 4.8. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Fe}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen katalaz aktivitesi



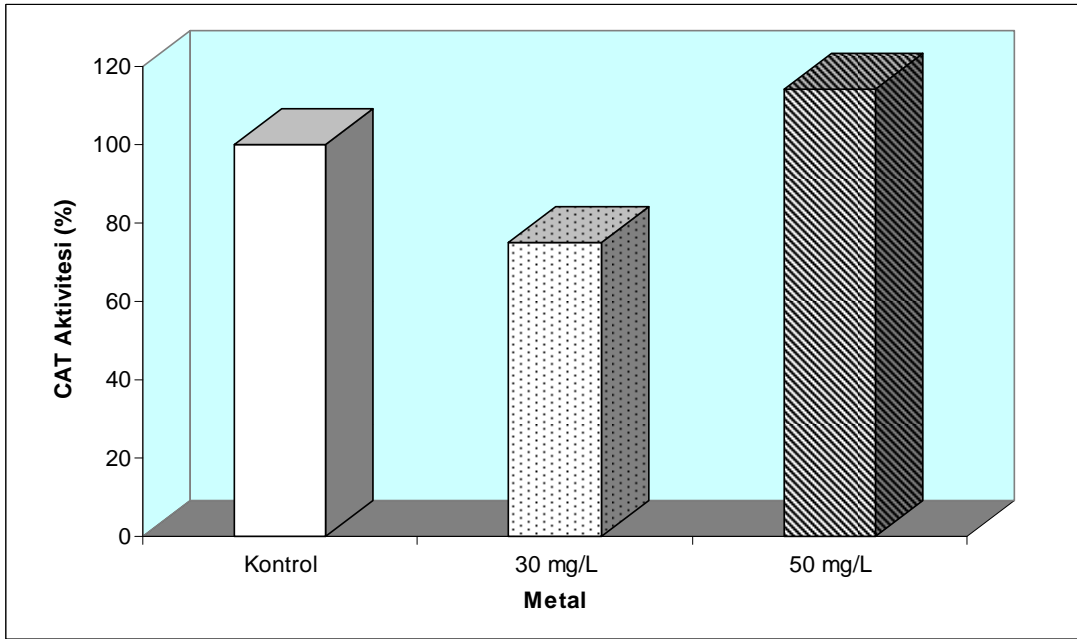
Şekil 4.9. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Cu}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen katalaz aktivitesi



Şekil 4.10. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Pb}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen katalaz aktivitesi



Şekil 4.11. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Co}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen katalaz aktivitesi



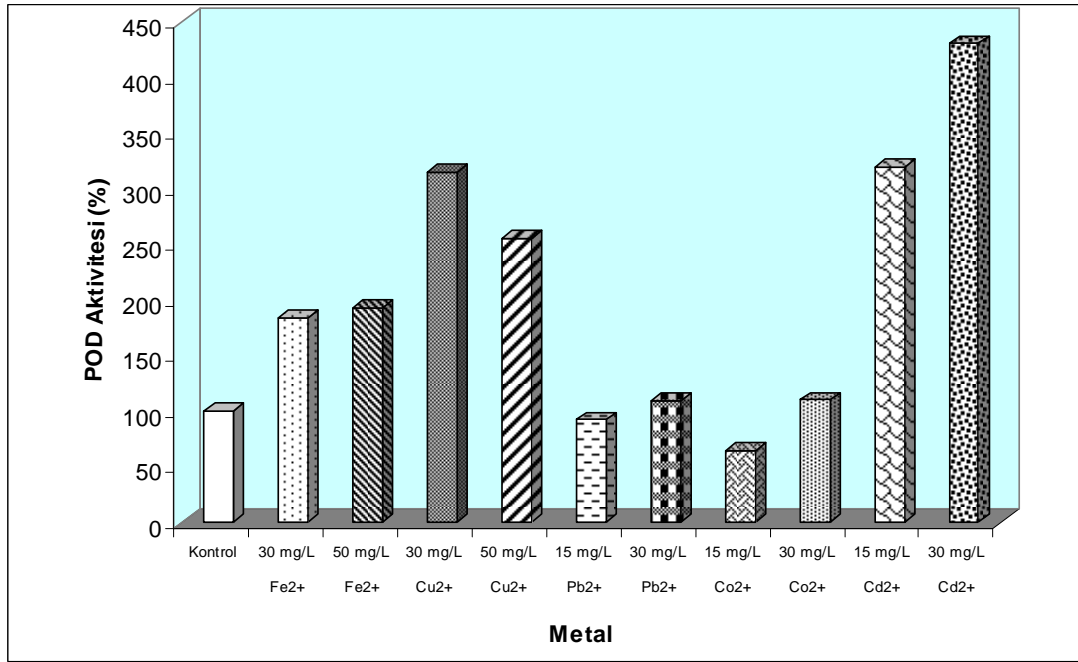
Şekil 4.12. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Cd}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen katalaz aktivitesi

### 4.3. Tere Bitkisinden Elde Edilen Peroksidaz Enzim Aktivitesi Bulguları

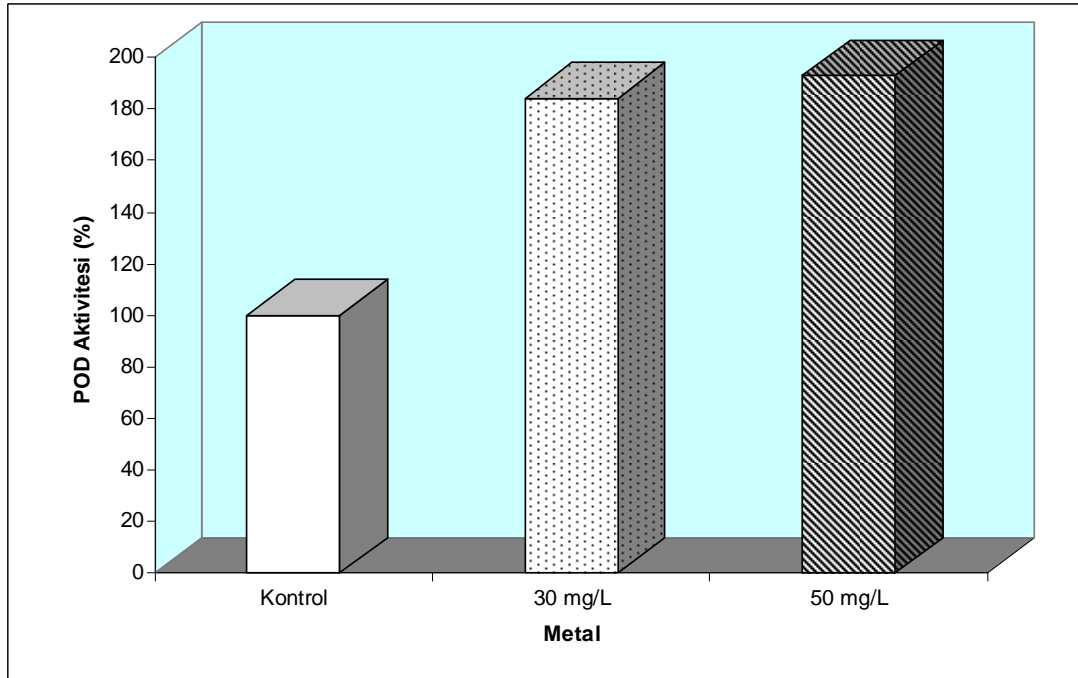
Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde peroksidaz aktiviteleri Tablo 4.3. ve Şekil 4.13., 4.14., 4.15., 4.16., 4.17. ve 4.18. 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Cu^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde peroksidaz aktivite değerleri

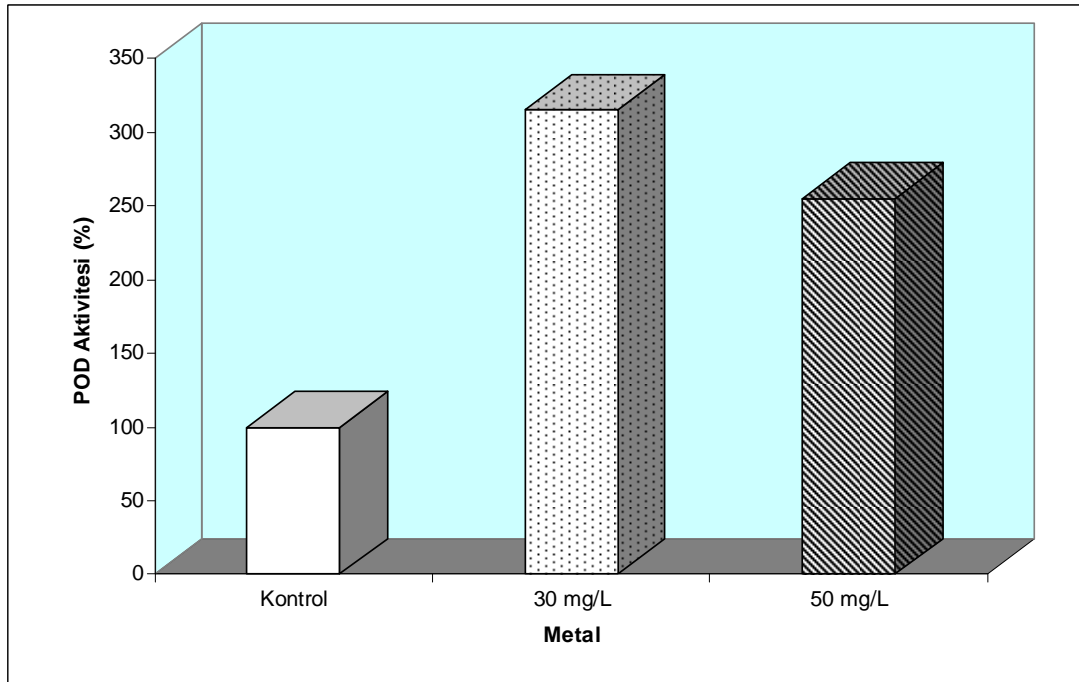
			$\Delta A/300\mu l$	EU/ml	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Aktivite
Kontrol			0,0814	27,13	185,68	100
$Fe^{2+}$	30	mg/L	0,15	50,00	319,02	184
	50	mg/L	0,157	52,33	204,16	193
$Cu^{2+}$	30	mg/L	0,2568	85,60	533,54	315
	50	mg/L	0,2079	69,30	323,90	255
$Pb^{2+}$	15	mg/L	0,0749	24,97	150,16	92
	30	mg/L	0,0886	29,53	114,27	109
$Co^{2+}$	15	mg/L	0,0523	17,43	102,56	64
	30	mg/L	0,0898	29,93	106,23	110
$Cd^{2+}$	15	mg/L	0,2606	86,87	482,48	320
	30	mg/L	0,3512	117,07	427,52	431



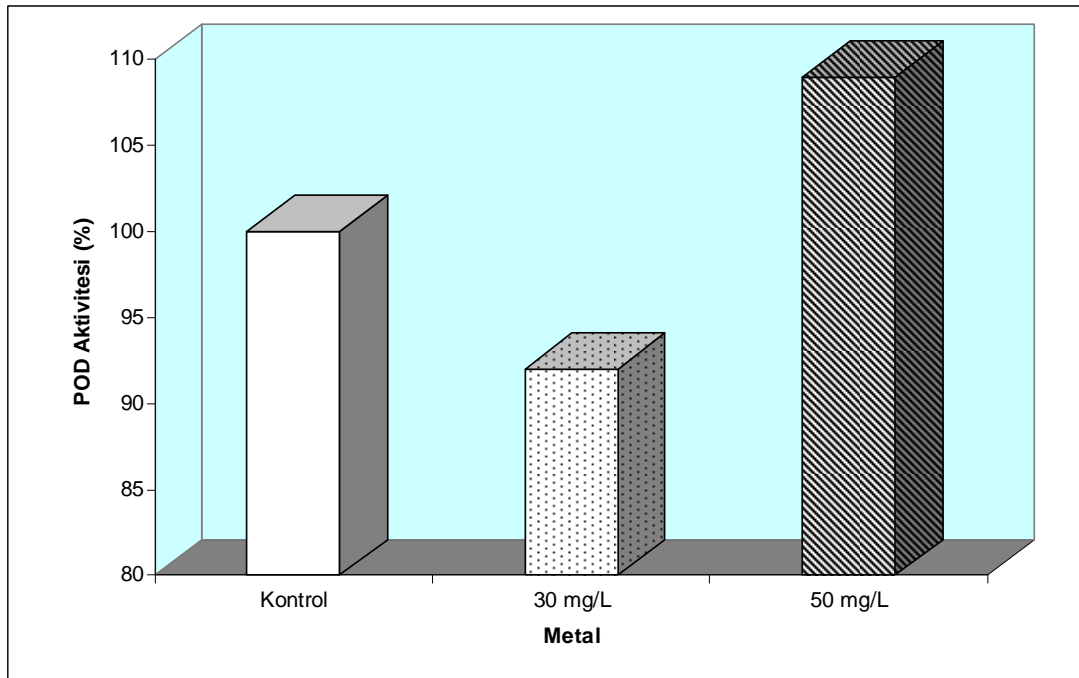
Şekil 4.13. Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Pb}^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde peroksidaz aktiviteleri



Şekil 4.14. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Fe}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen peroksidaz aktivitesi

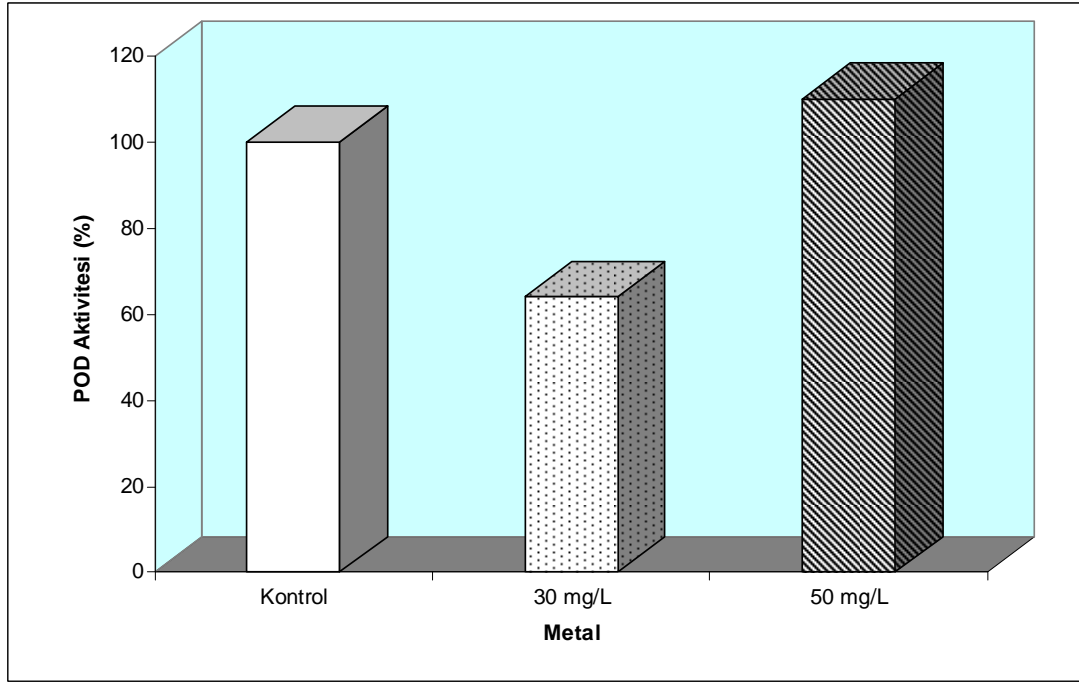


Şekil 4.15. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Cu}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen peroksidaz aktivitesi

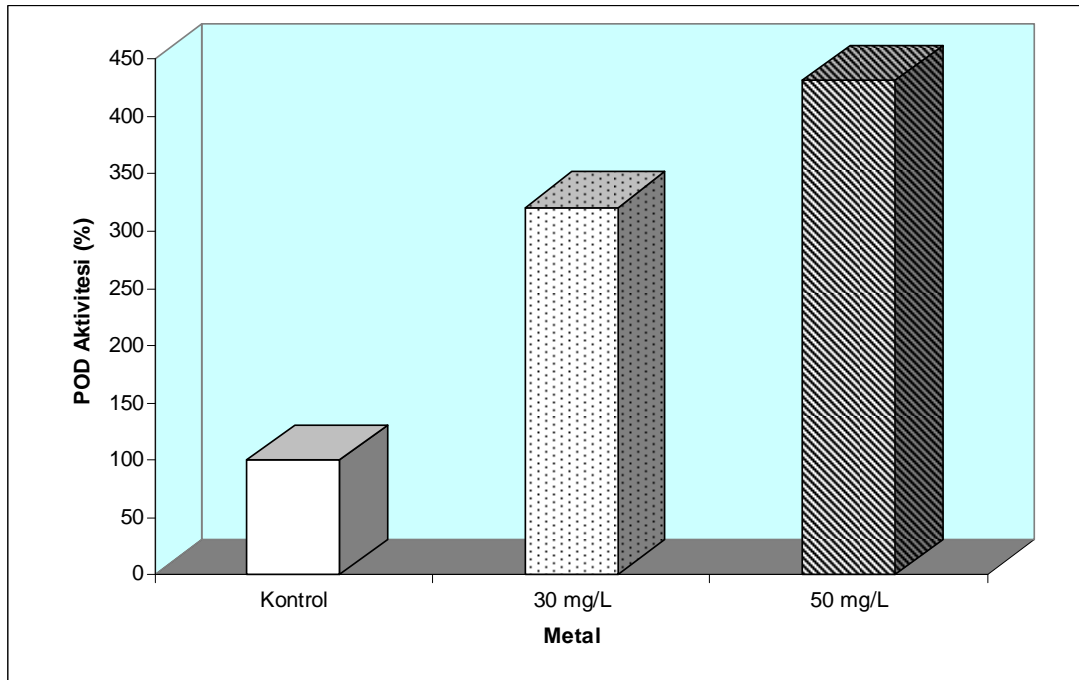


Şekil 4.16. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Pb}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen peroksidaz aktivitesi





Şekil 4.17. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Co}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen peroksidaz aktivitesi



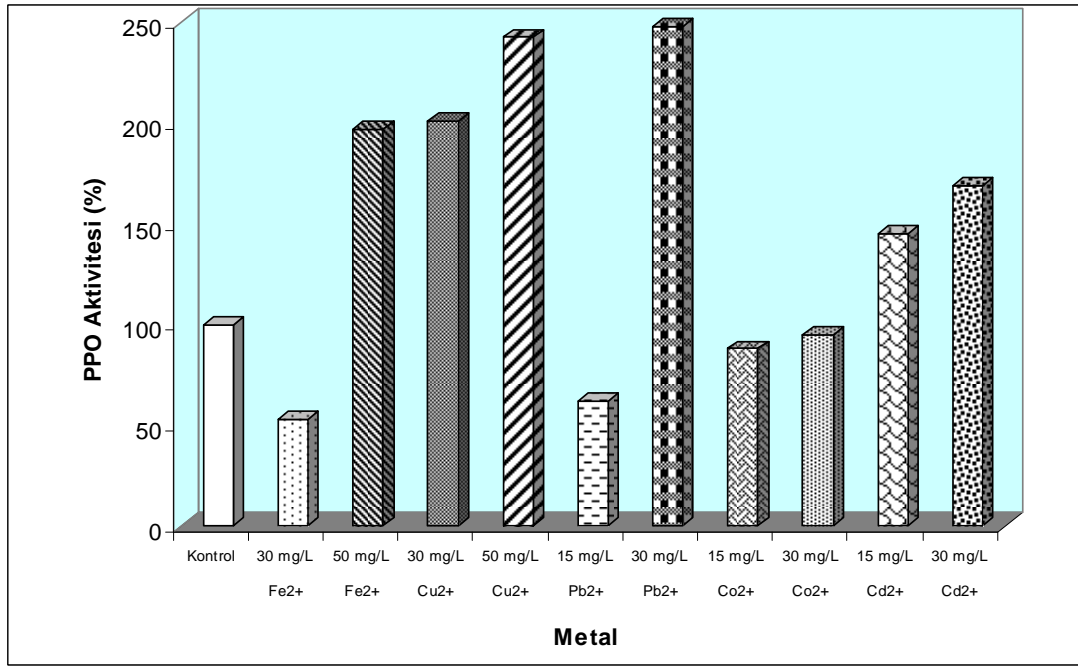
Şekil 4.18. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Cd}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen peroksidaz aktivitesi

#### 4.4. Tere Bitkisinden Elde Edilen Polifenol Oksidaz Enzim Aktivitesi Bulguları

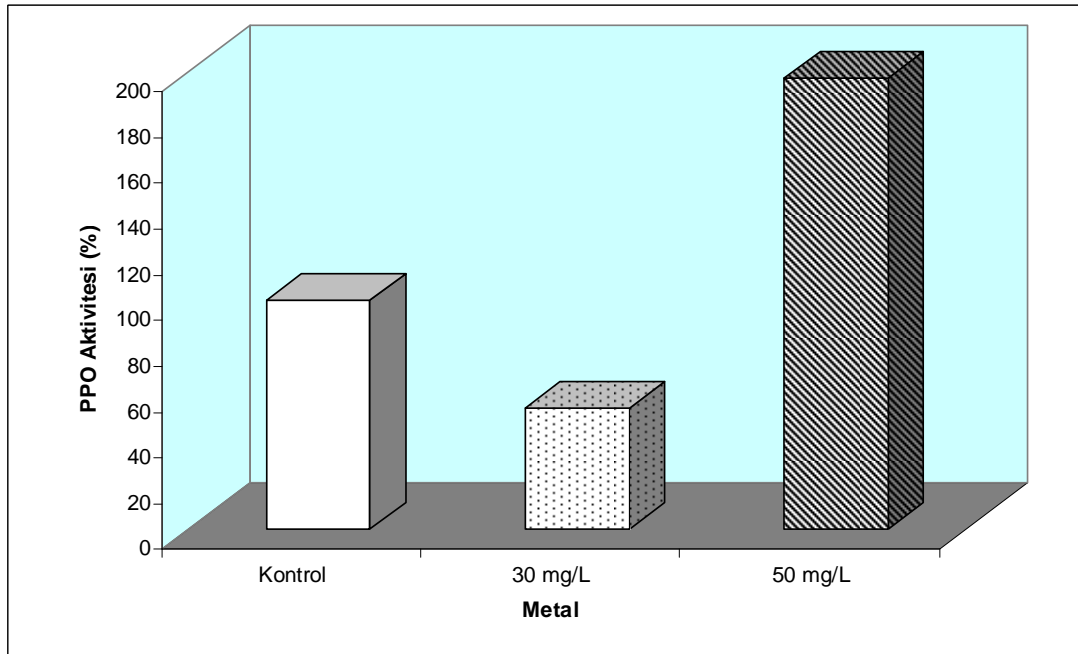
Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde polifenol oksidaz aktiviteleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.19., 4.20., 4.21., 4.22., 4.23. ve 4.24. 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Cu^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ve  $Pb^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde polifenol oksidaz aktivite değerleri

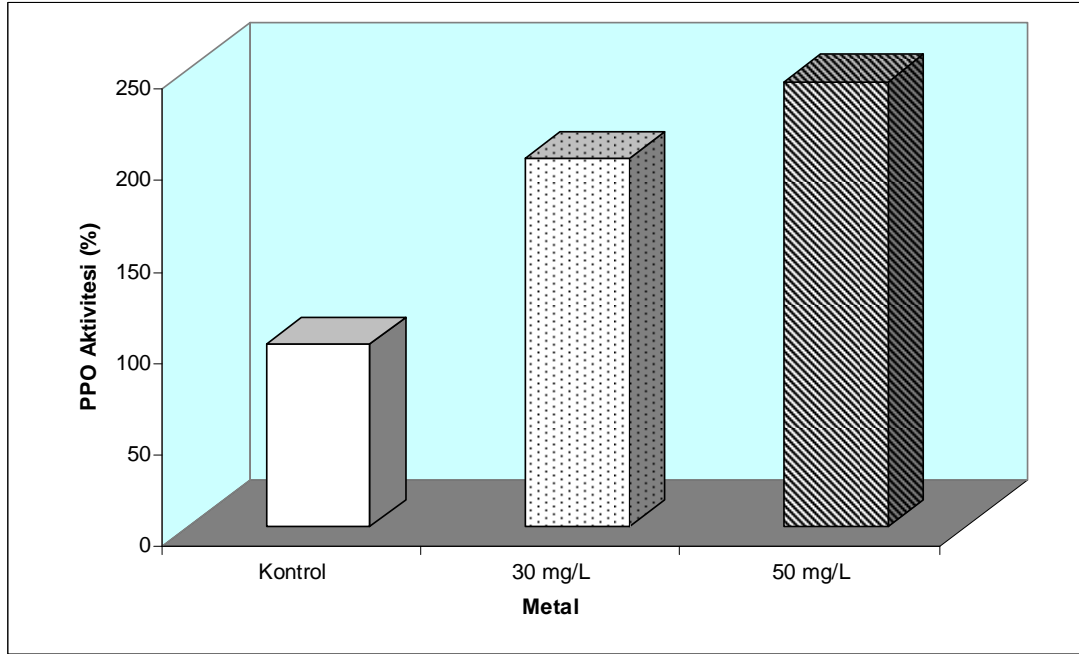
			$\Delta A/300\mu l$	EU/ml	Spesifik Aktivite (EU/mg)	% Aktivite
Kontrol			0,1868	622,67	4.260,98	100
$Fe^{2+}$	30	mg/L	0,0985	328,33	2.094,91	53
	50	mg/L	0,3676	1.225,33	4.780,10	197
$Cu^{2+}$	30	mg/L	0,376	1.253,33	7.811,95	201
	50	mg/L	0,4534	1.511,33	7.063,87	243
$Pb^{2+}$	15	mg/L	0,1152	384,00	2.309,55	62
	30	mg/L	0,4631	1.543,67	5.972,56	248
$Co^{2+}$	15	mg/L	0,1651	550,33	3.237,73	88
	30	mg/L	0,177	590,00	2.093,88	95
$Cd^{2+}$	15	mg/L	0,2708	902,67	5.013,63	145
	30	mg/L	0,3163	1.054,33	3.850,38	169



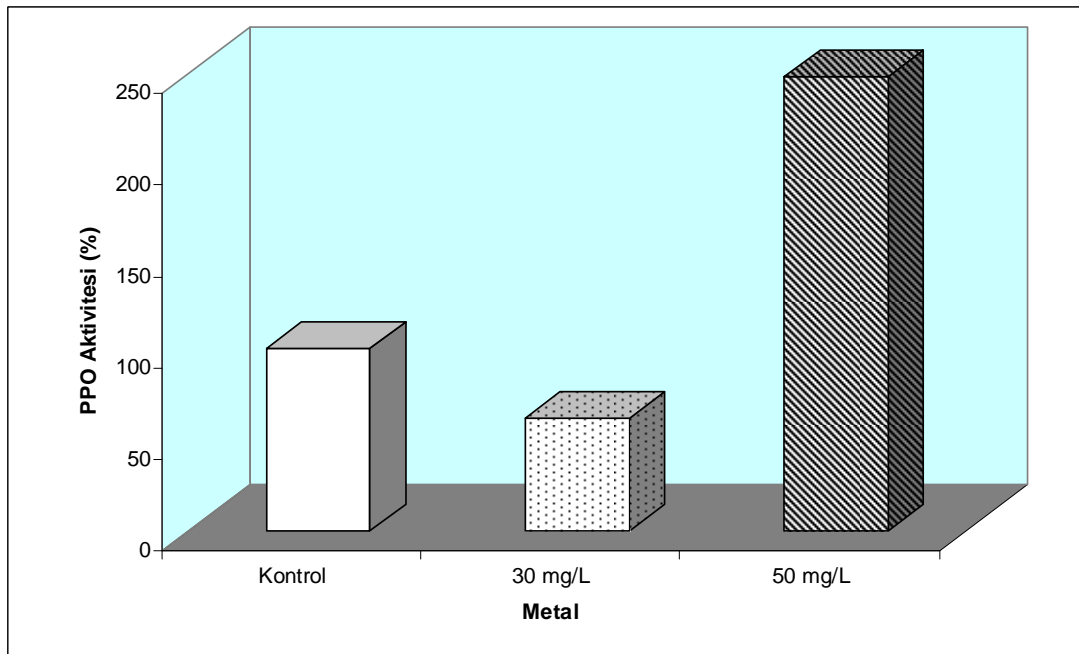
Şekil 4.19. Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Pb}^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde polifenol oksidaz aktiviteleri



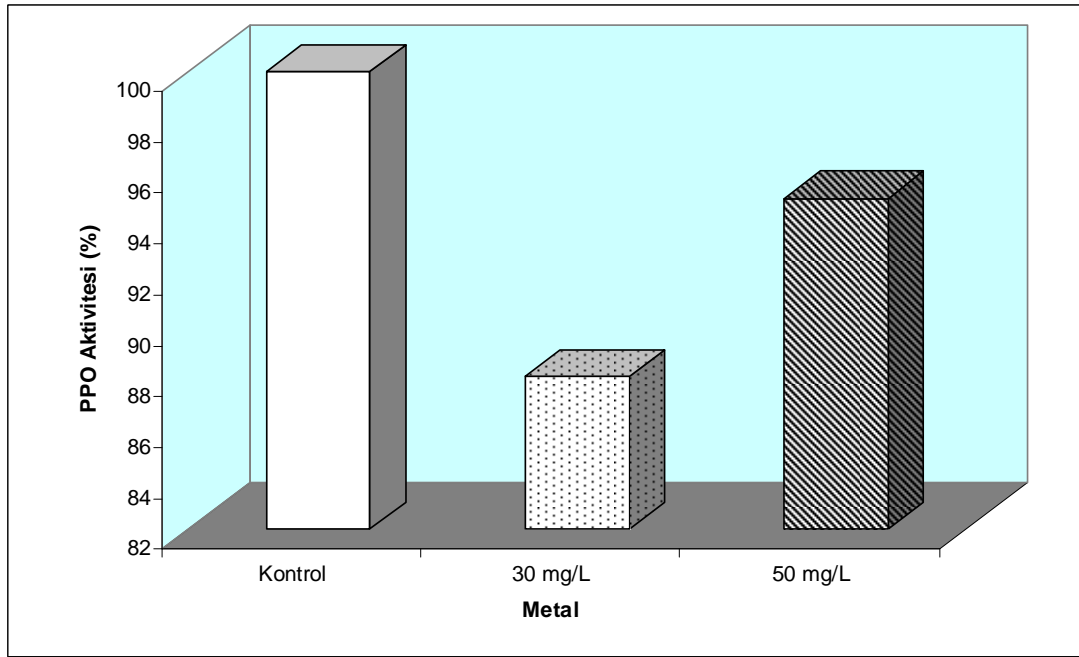
Şekil 4.20. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Fe}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi



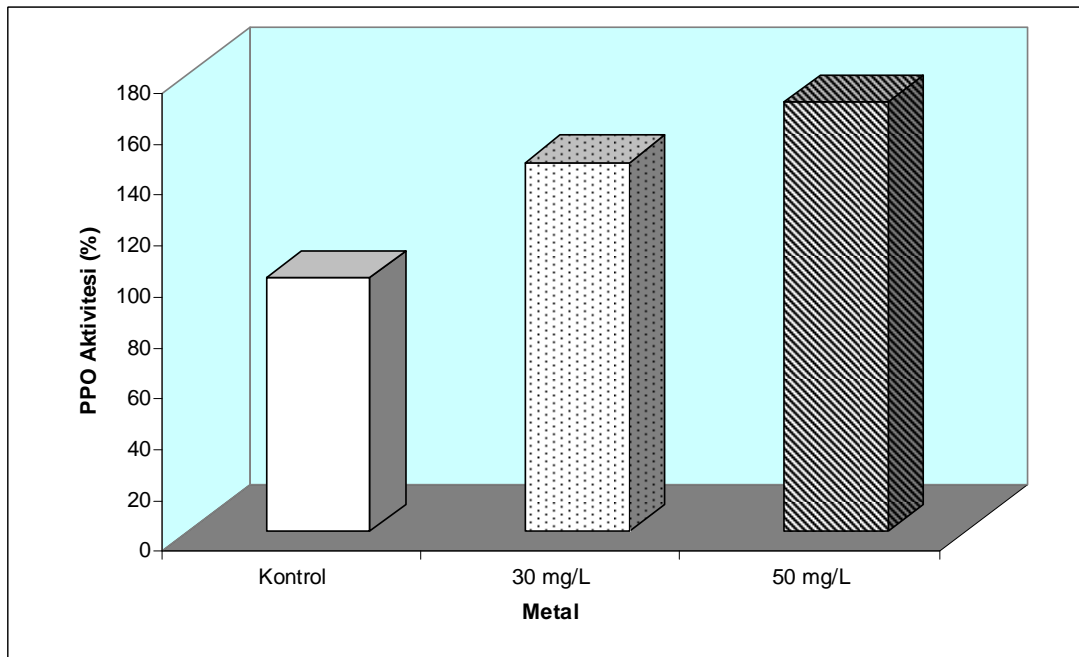
Şekil 4.21. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Cu}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi



Şekil 4.22. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Pb}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi



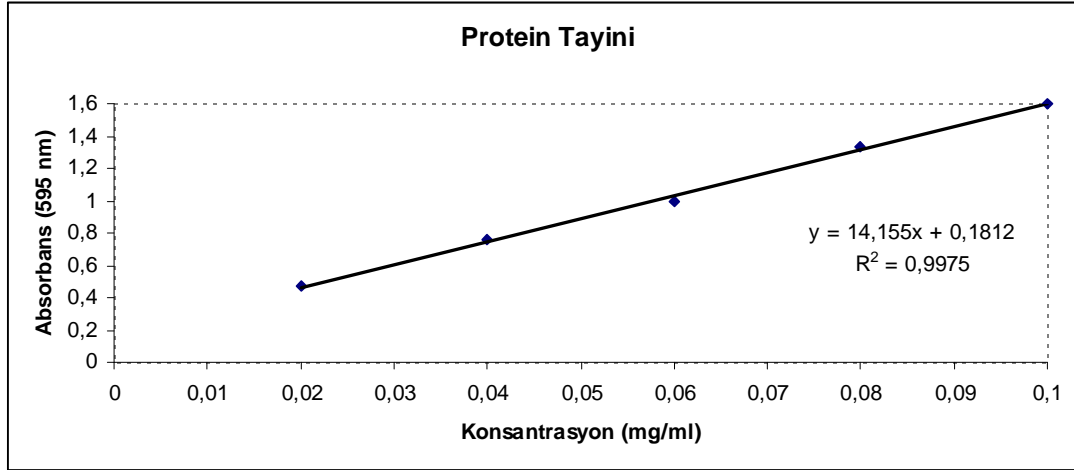
Şekil 4.23. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Co}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi



Şekil 4.24. Normal şartlarda yetiştirilen  $\text{Cd}^{2+}$  uygulanmış tere bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz aktivitesi

#### 4.5. Protein Tayini

Bradford yöntemiyle çözünür protein miktar tayini yapılmıştır. Bunun için standart protein grafiğinden elde edilen  $y = ax + b$  ( $y = 14,155x + 0,1812$ ) denkleminde yararlanılmıştır.



Şekil 4.25. Bradford standart grafiği

Tere bitkisinden (*Lepidium Sativum*) elde edilen enzim homojenatları bradford çözeltileri ile etkileştirildikten sonra 595 nm'de gözlenen absorbans değerleri denklemde yerine konularak bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 4.5.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.5. Bradford yöntemiyle bulunan protein miktarları

			Absorbans	40 µl Protein konsantrasyonu	300 µl Protein konsantrasyonu
Kontrol			0,457	0,02	0,15
Fe <sup>2+</sup>	30	mg/L	0,477	0,02	0,16
	50	mg/L	0,665	0,03	0,26
Cu <sup>2+</sup>	30	mg/L	0,484	0,02	0,16
	50	mg/L	0,585	0,03	0,21
Pb <sup>2+</sup>	15	mg/L	0,495	0,02	0,17
	30	mg/L	0,669	0,03	0,26
Co <sup>2+</sup>	15	mg/L	0,502	0,02	0,17
	30	mg/L	0,713	0,04	0,28
Cd <sup>2+</sup>	15	mg/L	0,521	0,02	0,18
	30	mg/L	0,698	0,04	0,27

## BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada Fe, Cu, Co, Pb, ve Cd streslerine maruz bırakılan tere bitkisinde (*Lepidium Sativum*) apoplastik SOD, CAT, POD ve PPO enzim aktivitelerinin bu streslere yanıtındaki rolleri incelenmiştir.

### 5.1. Fe, Cu, Co, Pb, ve Cd'nin SOD Aktivitesi Üzerine Etkileri

Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde süperoksit dismutaz aktiviteleri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Kontrol teresi ve 30 mg/L ile 50 mg/L  $Fe^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Fe etkisine bakılmıştır. SOD aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.2.'de grafik olarak da sunulmuştur. SOD'nin % aktiviteleri kontrol 30 mg/L ile 50 mg/L  $Fe^{2+}$  için sırasıyla 100, 98, 108 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % SOD aktivite değerleri 30 mg/L  $Fe^{2+}$  için değişmemiş, 50 mg/L  $Fe^{2+}$  için artmıştır.

Kontrol teresi ve 30 mg/L ile 50 mg/L  $Cu^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Cu etkisine bakılmıştır. SOD aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.3.'de grafik olarak da sunulmuştur. SOD'nin % aktiviteleri kontrol 30 mg/L ile 50 mg/L  $Cu^{2+}$  için sırasıyla 100, 114, 119 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % SOD aktivite değerleri 30 mg/L ve 50 mg/L  $Cu^{2+}$  için artmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Pb^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Pb etkisine bakılmıştır. SOD aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için

Şekil 4.4.'de grafik olarak da sunulmuştur. SOD'nin % aktiviteleri kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Pb^{2+}$  için sırasıyla 100, 64, 127 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % SOD aktivite değerleri istatistiksel olarak 15 mg/L  $Pb^{2+}$  için azalmış, 30 mg/L  $Pb^{2+}$  için artmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Co^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Co etkisine bakılmıştır. SOD aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.5.'de grafik olarak da sunulmuştur. SOD'nin % aktiviteleri kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Co^{2+}$  için sırasıyla 100, 144, 159 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % SOD aktivite değerleri 15 mg/L  $Co^{2+}$  için ve 30 mg/L  $Co^{2+}$  için önemli derecede artmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Cd^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Cd etkisine bakılmıştır. SOD aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.6.'da grafik olarak da sunulmuştur. SOD'nin % aktiviteleri kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Cd^{2+}$  için sırasıyla 100, 120, 133 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % SOD aktivite değerleri istatistiksel olarak 15 mg/L  $Cd^{2+}$  için ve 30 mg/L  $Cd^{2+}$  için önemli derecede artmıştır.

Yapılan çalışmalarda, Cd uygulanarak domateste, Cd, Pb uygulanarak mısırdada ve hindistan sakız ağacında SOD enzim aktivitesi artmıştır. [14,19] . Bu çalışmada da Fe, Cu, Pb, Co, Cd uygulanarak SOD aktivitesinin genelde arttığı belirlenmiştir. SOD aktivitesindeki artış; metal stresin  $O_2^-$  (süperoksit) ve  $H_2O_2$ 'nin temel kaynağı olduğunu göstermektedir.

## 5.2. Fe, Cu, Co, Pb, ve Cd'nin CAT Aktivitesi Üzerine Etkileri

Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde katalaz aktiviteleri Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Kontrol teresi ve 30 mg/L ile 50 mg/L  $Fe^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Fe etkisine bakılmıştır. CAT aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için



Şekil 4.8.'de grafik olarak da sunulmuştur. CAT 'nin % aktiviteleri kontrol 30 mg/L ile 50 mg/L  $Fe^{2+}$  için sırasıyla 100, 144, 72 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % CAT aktivite değerleri 30 mg/L  $Fe^{2+}$  için artmış, 50 mg/L  $Fe^{2+}$  için azalmıştır.

Kontrol teresi ve 30 mg/L ile 50 mg/L  $Cu^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Cu etkisine bakılmıştır. CAT aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.9.'da grafik olarak da sunulmuştur. CAT 'nin % aktiviteleri kontrol 30 mg/L ile 50 mg/L  $Cu^{2+}$  için sırasıyla 100, 93, 382 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % CAT aktivite değerleri 30 mg/L için değişmemiş ve 50 mg/L  $Cu^{2+}$  için artmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Pb^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Pb etkisine bakılmıştır. CAT aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.10.'da grafik olarak da sunulmuştur. CAT 'nin % aktiviteleri kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Pb^{2+}$  için sırasıyla 100, 47, 88 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % CAT aktivite değerleri 15 mg/L  $Pb^{2+}$  için ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$  için azalmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Co^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Co etkisine bakılmıştır. CAT aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.11.'de grafik olarak da sunulmuştur. CAT 'nin % aktiviteleri kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Co^{2+}$  için sırasıyla 100, 40, 84 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % CAT aktivite değerleri 15 mg/L  $Co^{2+}$  için ve 30 mg/L  $Co^{2+}$  için azalmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Cd^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Cd etkisine bakılmıştır. CAT aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.12.'de grafik olarak da sunulmuştur. CAT 'nin % aktiviteleri kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Cd^{2+}$  için sırasıyla 100, 75, 114 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % CAT aktivite değerleri 15 mg/L  $Cd^{2+}$  için azalmış ve 30 mg/L  $Cd^{2+}$  için artmıştır.

Yapılan çalışmalarda, Cd varlığında *Phaseolus vulgaris*, *Lemna minor*, bezelye, biber ve ayçiçeği yapraklarında, *Phaseolus aureus*'da, şeker kamışında, havuç ve turpun köklerinde CAT aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Cu uygulanan bitki türlerinde, Al uygulanan pirinç yapraklarında, Pb uygulanan bezelye köklerinde, Cd uygulanan arpa köklerinde, şeker kamışında, *Raphanus sativus*'da ve *Agropyron repens*'de CAT aktivitesinin arttığı bulunmuştur [14].

Çalışmamızda CAT enzim aktivitesi hem artış hem de azalma göstermiştir. Çalışmamızda CAT enzim aktivitesinin azalması ve artması uygulanan stres faktörlerinin muhtemelen bitkideki CAT enzim miktarını arttırması veya azaltması ile açıklanabilir.

### 5.3. Fe, Cu, Co, Pb, ve Cd'nin POD Aktivitesi Üzerine Etkileri

Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde peroksidaz aktiviteleri Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

Kontrol teresi ve 30 mg/L ile 50 mg/L  $Fe^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Fe etkisine bakılmıştır. POD aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.14.'de grafik olarak da sunulmuştur. POD 'nin % aktiviteleri kontrol 30 mg/L ile 50 mg/L  $Fe^{2+}$  için sırasıyla 100, 184, 193 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % POD aktivite değerleri 30 mg/L  $Fe^{2+}$  için ve 50 mg/L  $Fe^{2+}$  için önemli derecede artmıştır.

Kontrol teresi ve 30 mg/L ile 50 mg/L  $Cu^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Cu etkisine bakılmıştır. POD aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.15.'de grafik olarak da sunulmuştur. POD 'nin % aktiviteleri kontrol 30 mg/L ile 50 mg/L  $Cu^{2+}$  için sırasıyla 100, 315, 255 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % POD aktivite değerleri 30 mg/L için ve 50 mg/L  $Cu^{2+}$  için artmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Pb^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Pb etkisine bakılmıştır. POD aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.16.'da grafik olarak da sunulmuştur. POD 'nin % aktiviteyi kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Pb^{2+}$  için sırasıyla 100, 92, 109 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % POD aktivite değerleri 15 mg/L  $Pb^{2+}$  için azalmış ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$  için artmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Co^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Co etkisine bakılmıştır. POD aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.17.'de grafik olarak da sunulmuştur. POD 'nin % aktiviteyi kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Co^{2+}$  için sırasıyla 100, 64, 110 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % POD aktivite değerleri 15 mg/L  $Co^{2+}$  için azalmış ve 30 mg/L  $Co^{2+}$  için artmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Cd^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Cd etkisine bakılmıştır. POD aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.18.'de grafik olarak da sunulmuştur. POD 'nin % aktiviteyi kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Cd^{2+}$  için sırasıyla 100, 320, 431 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % POD aktivite değerleri 15 mg/L  $Cd^{2+}$  için ve 30 mg/L  $Cd^{2+}$  için önemli derecede artmıştır.

Farklı çalışmalarda, Cu fazlalığında ayçiçeği yapraklarında, Cd eklenmesinden sonra *Ceratophyllum demersum*'da ve *A. Thaliana*'da Cd ve Pb uygulanınca Hindistan sakız ağacında POD enzim aktivitesinin artmış olduğu bulunmuştur [14,19].

Çalışmamızda POD enzim aktivitesi genel olarak artış göstermiştir. Çalışmamızda POD enzim aktivitesinin azalması ve artması uygulanan stres faktörlerinin muhtemelen bitkideki POD enzim miktarını arttırması veya azaltması ile açıklanabilir.

#### 5.4. Fe, Cu, Co, Pb, ve Cd'nin PPO Aktivitesi Üzerine Etkileri

Normal şartlarda kontrol teresi ve 30 mg/L ve 50 mg/L  $Fe^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$  çözeltileri ile 15 mg/L ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  ve  $Cd^{2+}$  çözeltileri kullanılarak yetiştirilen tere bitkisinde polifenol oksidaz aktiviteleri Tablo 4.4.'de gösterilmiştir.

Kontrol teresi ve 30 mg/L ile 50 mg/L  $Fe^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Fe etkisine bakılmıştır. PPO aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.20.'de grafik olarak da sunulmuştur. PPO 'nin % aktiviteleri kontrol 30 mg/L ile 50 mg/L  $Fe^{2+}$  için sırasıyla 100, 53, 197 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % PPO aktivite değerleri 30 mg/L  $Fe^{2+}$  için azalmış, 50 mg/L  $Fe^{2+}$  için artmıştır.

Kontrol teresi ve 30 mg/L ile 50 mg/L  $Cu^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Cu etkisine bakılmıştır. PPO aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.21.'de grafik olarak da sunulmuştur. PPO 'nin % aktiviteleri kontrol 30 mg/L ile 50 mg/L  $Cu^{2+}$  için sırasıyla 100, 201, 243 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % PPO aktivite değerleri 30 mg/L için ve 50 mg/L  $Cu^{2+}$  için artmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Pb^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Pb etkisine bakılmıştır. PPO aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.22.'de grafik olarak da sunulmuştur. PPO 'nin % aktiviteleri kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Pb^{2+}$  için sırasıyla 100, 62, 248 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % PPO aktivite değerleri 15 mg/L  $Pb^{2+}$  için azalmış ve 30 mg/L  $Pb^{2+}$  için artmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Co^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Co etkisine bakılmıştır. PPO aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.23.'de grafik olarak da sunulmuştur. PPO 'nin % aktiviteleri kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Co^{2+}$  için sırasıyla 100, 88, 95 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % PPO aktivite değerleri 15 mg/L  $Co^{2+}$  için ve 30 mg/L  $Co^{2+}$  için azalmıştır.

Kontrol teresi ve 15 mg/L ile 30 mg/L  $Cd^{2+}$  uygulanarak yetiştirilen tere bitkisinde Cd etkisine bakılmıştır. PPO aktivitesi sonuçlarının daha iyi yorumlanabilmesi için Şekil 4.24.'de grafik olarak da sunulmuştur. PPO 'nin % aktiviteyi kontrol 15 mg/L ile 30 mg/L  $Cd^{2+}$  için sırasıyla 100, 145, 169 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında, % PPO aktivite değerleri 15 mg/L  $Cd^{2+}$  için ve 30 mg/L  $Cd^{2+}$  için artmıştır.

Bir çalışmada, ayçiçeği yapraklarında yüksek ve düşük Cu uygulaması ile buğdayda Cu veya Zn eksikliğinde ve havuç ve turpun köklerinde artan Cd konsantrasyonlarında PPO aktiviteyi düşmüştür. *Marsilea minuta*'ya Cd uygulanmasının PPO aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir. Mısır yapraklarında, Cu eksikliğinde PPO aktivitesi düşerken aşırı Zn ile bu aktivite düzeltilmiştir [14].

Çalışmamızda PPO enzim aktivitesi hem artmış hem de azalış göstermiştir. Çalışmamızda PPO enzim aktivitesinin azalması ve artması uygulanan stres faktörlerinin muhtemelen bitkideki PPO enzim miktarını arttırması veya azaltması ile açıklanabilir.

## KAYNAKLAR

- [1] HALE, M. G., ORCUTT D. M., The physiology of plants under stress. Wiley and Sons, New York, 206p. 1987
- [2] KOCAÇALIŞKAN, İ., Bitki Fizyolojisi. Kütahya., 2001
- [3] HAKTANIR, K., Toprak kirliliği ve bu konuda hazırlanacak yönetmelikler üzerine düşünceler, TÇSV. Çalışma grubu raporu, p75, 1987
- [4] HURST, R., BAO, Y., JEMTH, P., MANNERNVI B., WILLIAMSN, G., Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Activity of Rat Class Theta Glutathione Transferase T2-2. Biochem. Soc. Trans., 25, S559, 1997
- [5] JORNOT, L., PETERSEN, H., JUNOD, A.F., Biochem J, 335: 85-94 1998
- [6] AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M., Oxidants, Antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci; 90: 7915-7922, 1993
- [7] MÜFTÜOĞLU, O., Yaşasın hayat. Doğan kitapçılık; 113, İstanbul, 2003
- [8] <http://bitkimarket.blogspot.com>; Nisan 2011
- [9] <http://tr.wikipedia.org/wiki/Tere>; Nisan 2011
- [10] ASRİ, F.Ö., SÖNMEZ, S., ÇITAK, S., Kadmiyumun çevre ve insan sağlığı üzerine etkileri, Akdeniz üniversitesi, Ziraat fakültesi, Toprak bölümü
- [11] BAYÇU, G., *Ailanthus Altissima* 'da kadmiyum, kurşun birikimi ve kadmiyumun bitki gelişmesine etkisi, Yüksek lisans tezi, İ üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Biyoloji anabilim dalı, Ekoloji programı,1992
- [12] GÜNEŞ, A., Mısır bitkisinde demir noksanlığının giderilmesinde nitrifikasyon inhibasyonunun etkisi, Yüksek lisans tezi, Ankara üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Toprak anabilim dalı, 1989
- [13] KULU, N. E., Kemalpaşa yöresi organik ve entegre kiraz yetiştiriciliğinde salihli çeşidinin beslenme ve ağır metal durumlarının incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Ege üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Toprak anabilim dalı, 2006

- [14] ÇUVAÇ, M., Apoplastik antioksidatif enzim aktiviteleri üzerine B, Cu, Zn, Al, Pb ve Cd'nin etkilerinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Atatürk üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Kimya anabilim dalı, 2007
- [15] ÇEKİÇ, F. Ö., Tuz (nacl) ve ağır metal (kadmiyum) stresine maruz bırakılan domates bitkisinde bazı fizyolojik parametrelerin ve antioksidant savunma sisteminin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Mersin üniversitesi Fen bilimleri enstitüsü, Biyoloji ana bilim dalı, 2004
- [16] AYHAN, B., Mısır (zea mays l.)'In bazı çeşitlerinde ağır metal (cd, pb) stresinin etkilerinin belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Hacettepe üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Biyoloji anabilim dalı, 2006
- [17] KARABAL, E., Yücel, M. and ÖKTEM, H. A., Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to Bon toxicity, Plant Science, 164, p 925-933, 2003
- [18] YAŞAR F., ELLİALTIOĞLU, Ş., ÖZPAY, T., UZAL, Ö., Tuz stresinin karpuzda (*citrullus lanatus* (thunb.) mansf.) antioksidatif enzim (SOD, CAT, APX ve GR) aktivitesi üzerine etkisi, Araştırma Makalesi/Article, Yüzüncü yıl üniversitesi, Ziraat fakültesi, Tarım bilimleri dergisi (J. Agric. Sci.), p 61-65, 2008
- [19] ZHANG, F. Q., WANG, Y. S., LOU, Z. P., DONG J. D., Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*) Original Research Article Chemosphere, Volume 67, Issue 1, February 2007, p 44-50,2007
- [20] JAYAKUMARA, K., VİJAYARENGAN, P., CHANGXİNG, Z., JALEEL, C. A., Soil applied cobalt alters the nodulation, leg-haemoglobin content and antioxidant status of Glycine max (L.) Merr, 2008
- [21] KEHA, E., KÜFREVİOĞLU, İ., Biyokimya, Aktif Yayınevi, 2010
- [22] <http://biyokimyaci.net/content/view/13/27/>, Şubat 2011
- [23] PAMUK, F., Biyokimya, Gazi Kitapevi, Ankara, 2000
- [24] ZİYAN, E., "Polifenol oksidaz enziminin Ankara armudu (*pyrus communis*)'ndan izole edilmesi, saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi" ,Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, 1998
- [25] KALAYCIOĞLU, L., Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2000
- [26] ÖZATA, A., KUTLU, M., Enzimoloji ders notları, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No:1254, Fen Fakültesi Yayınları No:15, Eskişehir,2000

- [27] ÖNEZ, Z., " Üzümünden (*vitis vinifera l.*) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2006
- [28] GÖGER, F., *Salvia virgata Jacq. ve S. halophila hedge*'nin Antioksidan Etkilerinin ve Bileşimlerinin Belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, Anadolu üniversitesi, Sağlık bilimleri enstitüsü, Farmakognozi anabilim dalı, 2006
- [29] MERCAN, U., Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, Yüzüncü yıl niversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji-Toksikoloji Anabilim Dalı, 2004
- [30] EREZ, Z., Investigation of some antioxidant activity various and lipid peroxidation levels in lentil leaves (*Lens Esculante*) treated with copper (Cu) zinc (Zn) and salt stres, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- [31] DÜZCAN, B., Karahindiba (*taraxacum officinale*) bitkisinden süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzimlerinin karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, Sakarya üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, 2010
- [32] ACAR, O., Kurağa Duyarlı Ve Dayanıklı Bazı Arpa (*Hordeum Spp.*) Çeşitlerinde Süperoksit Dismutaz (Sod, Ec 1.15.1.1) Aktivitelerinin Araştırılması Doktora tezi, Ege üniversitesi, Biyoloji anabilim dalı, s 87 Şubat 1999
- [33] PEKTAŞ, İ., Bitki gelişim düzeylerinin antioksidan enzimler üzerindeki etkisinin araştırılması, Yüksek lisans tezi, Balıkesir üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Temmuz 2009
- [34] KARA, D., Sakarya'da yetişen iki farklı kabak çekirdeğinden (*cucurbita maxima ve moschata*) katalaz enziminin karakterizasyonu, Yüksek lisans tezi, ,Sakarya üniversitesi, Fen bilimleri enstitüsü, Mayıs 2008
- [35] ONSA, G. H., SAARI, N. B., SELAMET, J., BAKAR, J., Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*, *Food Chemistry*, 85 :365–376, 2004
- [36] ROMPEL, A., ALBERS, M., NASERI, J.I., GERDEMANN, C., et al., Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*), *Biochimica et Biophysica Acta* 1774:1422–1430, 2007
- [37] [metallo.scripps.edu/promise/PEROXIDASES.html](http://metallo.scripps.edu/promise/PEROXIDASES.html), Nisan 2011



- [38] CRUMIERE, F.," Inhibition of enzymatic ,browning in food products using bio-ingredient", A thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial fulfillment of the requirements of the degree of Master of Science, Department of Food Science and Agricultural Chemistry McGill University Montreal, Québec, Eylül, 2000

## ÖZGEÇMİŞ

Mustafa AYDIN, 1980 yılında Malatya’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Malatya’da tamamladı. 2005 Yılında Hacettepe Üniversitesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanlar Bölümü Kimya Eğitimi Anabilim Dalı’ndan mezun oldu. 2005 ve 2008 yılları arasında Milli Eğitim Bakanlığı’na bağlı çeşitli dershanelerde Kimya Öğretmeni olarak görev yaptı. Halen Yalova Üniversitesi Strateji Geliştirme Daire Başkanlığı Bütçe ve Performans Şubesi’nde görev yapmakta olup aynı zamanda da Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Eğitimine devam etmektedir. Evlidir.