

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI STRES KOŞULLARININ DEFNE (*Laurus Nobilis* L.) BİTKİSİNDE
ANTİOKSİDAN ENZİM SİSTEMİ VE VERİM PARAMETRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Mutlu YALÇIN

Danışman
Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

SAMSUN
2020

TEZ ONAYI

Mutlu YALÇIN tarafından hazırlanan “Farklı Stres Koşullarının Defne (*Laurus Nobilis L.*) Bitkisinde Antioksidan Enzim Sistemi ve Verim Parametreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Deniz EKİNCİ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan : **Prof. Dr. Deniz EKİNCİ**
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Hakan ARSLAN**
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Yapılar ve Sulama Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK**
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Yukardaki sonucu onaylarım .../.../20...

Prof. Dr. Ali BOLAT

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.



Tarih

İmza

Mutlu YALÇIN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI STRES KOŞULLARININ DEFNE (*Laurus Nobilis* L.) BİTKİSİNDE ANTİOKSİDAN ENZİM SİSTEMİ VE VERİM PARAMETRELERİNİN ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mutlu YALÇIN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

Bu çalışmada, bitkiler üzerinde önemli ölçüde olumsuz etkiye sahip kuraklık ve tuz streslerinin defne (*Laurus nobilis* L.) bitkisinde antioksidan mekanizmanın önemli üyeleri olan glutatyon redüktaz (E.C. 1.8.1.7: GR), glutatyon S-transferaz (E.C. 2.5.1.18: GST), gualikol peroksidaz (E.C. 1.11.1.17: GPx), askorbat peroksidaz (E.C. 1.11.1.11: APx) aktiviteleri, klorofil içeriği, stoma içeriği ve verim üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bitki yapraklarından homojenat elde edildikten sonra Bradford yöntemi ile protein tayini yapılmıştır. Defne bitkisi yapraklarında GR, GST, GPx ve APx enzimleri için optimum iyonik şiddet ve pH miktarı belirlenmiştir. Bu değerler sırasıyla GR için 200 mM TRIS, pH 7, GST 20 mM TRIS, pH 7.5, GPx 200 mM KH₂PO₄, pH 6, APx 20 mM TRIS, pH 6 olarak bulunmuştur. Defne bitkisi yaprağında GR, GST, GPx ve APx için optimum ortam içerikleri belirlendikten sonra aktivite ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda zamana bağımlı bir şekilde olarak uygulanan stres faktörlerinin, tuz stresi altındaki bitkilere kıyasla kuraklık stresi altındaki bitkilerde GR, GST, APx, GPx, klorofil ve stoma içeriklerinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Haziran/2020

Anahtar Kelimeler: Defne Bitkisi, Antioksidan, Enzim Aktivite, Stres Faktörü, Optimizasyon, Klorofil, Stoma

ABSTRACT

Master's Thesis

Investigation of the Effects of Different Stress Conditions on
Antioxidant Enzyme System and Yield Parameters in Laurel
(*Laurus Nobilis* L.) Plant

Mutlu YALÇIN

Ondokuz Mayıs University
Graduate Education Institute
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

In this study, glutathione reductase (EC 1.8.1.7: GR), glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18), which are important members of the antioxidant mechanism of drought and salt stresses in laurel (*Laurus nobilis* L.) plant, which have a significant negative effect on plants. Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18: GST), glutathione reductase (EC 1.8.1.7: GR), gualicol peroxidase (EC 1.11.1.17: GPx), ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11: APx) activities and their effects on yield parameters including chlorophyll and stomata were investigated. After homogenate was obtained from plant leaves, protein amount was determined by Bradford method. Optimum ionic intensity and pH values were found for GR, GST, GPx and APx enzymes in bay leaves. These values were found for GR as 200 mM TRIS, pH 7, GST 20 mM TRIS, pH 7.5, GPx 200 mM KH₂PO₄, pH 6, APx 20 mM TRIS, pH 6. After determining optimum media contents for bay leaf, GR, GST, GPx and APx, activity measurements were made. As a result of the obtained data, it was observed that the stress factors applied in a time dependent manner reduce the activities of GR, GST, GPx, APx, chlorophyll and stomata content was determined in plants under drought stress compared to plants under salt stress.

June/2020

Key Words: *Laurus nobilis* L., Antioxidant, Enzyme Activity, Stress Factor, Optimization, Chlorophyll, Stoma

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak gerçekleştirilmiştir.

Farklı Stres Koşullarının Defne Bitkisinde (*Laurus nobilis* L.) Antioksidan Enzim ve Verim Parametrelerinin Üzerine Etkileri konulu bu araştırmayı bana öneren ve konu üzerinde çalışma fırsatını veren, bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlandığım öncelikle danışman hocam Sayın Prof. Dr. Deniz EKİNCİ olmak üzere, tecrübelerinin benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Hakan Arslan'a ve öğrenimim boyunca emeği geçen bütün hocalarıma sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve her daim paylaşıcağımıza inandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli Araş. Gör. Ömer TAŞ, Araş. Gör. Ahmet Can OLCAY'a, Araş. Gör. Gürkan BİLİR'e ve Araş. Gör. Mehmet Sait KİREMİT'e değerli arkadaşlarım Eylem TÜRE, Haktan ŞAFAK, Şafak Esra ASLAN, Ayşenur Efşan YARAR, Cansu CAN, Ali Sami BAYKARA ve Birkan YAMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doğduğum günden bugüne hep en iyi yerlere gelmemi arzulayan ve benden uzakta da olsalar her zaman ilgilerini ve sevgilerini çok yakınımda hissettiğim ve benden maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen babam, annem, abim ve Neslihan CANKURTARAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2020, Samsun

Mutlu YALÇIN
Ziraat Mühendisi

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzimler.....	2
1.2 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler.....	5
1.2.1 Substrat Konsantrasyonu.....	6
1.2.2 Enzim Konsantrasyonu	6
1.2.3 Sıcaklık.....	6
1.2.4 pH Etkisi.....	6
1.2.5 İnhibitör Etkisi.....	7
1.2.6 Aktivatör Etkisi	7
1.3 Enzim Tarihi	7
1.4 Enzimlerin Özellikleri	8
1.5 Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	8
2. STRES FAKTÖRLERİ ve ANTİOKSİDANLAR.....	11
2.1 Biyotik Stres Faktörleri.....	12
2.2 Abiyotik Stres Faktörleri	12
2.2.1 Kuraklık Stresi.....	13
2.2.2 Tuz Stresi.....	14
2.3 Serbest Radikaller	15
2.3.1 Reaktif Oksijen Türleri.....	18
2.3.1.1 Süperoksit Anyonu (O_2^-)	18
2.3.1.2 Singlet Oksijen (1O_2)	18
2.3.1.3 Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	19
2.3.1.4 Hidroksil Radikali ($OH^\cdot$)	19
2.4 Oksidatif Stres	20
2.5 Antioksidanlar.....	21
2.5.1 Enzimatik Antioksidanlar.....	23
2.5.1.1 Askorbat Peroksidaz (APx: EC 1.11.1.11).....	23
2.5.1.2 Gualikol Peroksidaz (GPx: EC 1.11.1.17).....	25
2.5.1.3 Glutasyon S-transferaz (GST: EC 2.5.1.18)	26
2.5.1.4 Glutasyon Redüktaz (GR: EC 1.8.1.7).....	29
3. DEFNE BİTKİSİ (<i>Laurus nobilis</i> L.) ve ÖZELLİKLERİ.....	33
3.1 Botanik ve Biyokimyasal Özellikleri	34
3.2 Doğal Yayılışı.....	35
3.3 Kullanım Alanları ve Literatür Özeti.....	35
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	38
4.1 Materyal	38
4.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
4.1.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	38
4.1.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	39
4.1.3.1 Tuzluluk Stresinde Kullanılan Çözeltiler	39
4.1.3.2 Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler.....	39

4.2 Yöntem.....	40
4.2.1 Bitki Yetiştirme Yöntemi	40
4.2.2 Aktivite Tayini için <i>Laurus nobilis</i> L.'den Enzimlerin Kısmi Saflaştırılması yöntemi.....	41
4.2.2.1 Homojenat Hazırlanması	41
4.2.3 Analizler	41
4.2.3.1 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	41
4.2.3.2 Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesinin Tayini	42
4.2.3.2.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	43
4.2.3.2.2 Optimum pH değerinin Değerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	44
4.2.3.3 Glutasyon S-transferaz Enzim Aktivitesi Tayini	45
4.2.3.3.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	46
4.2.3.3.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar...	47
4.2.3.4 Gualikol Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini	47
4.2.3.4.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	48
4.2.3.4.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar...	49
4.2.3.5 Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini	50
4.2.3.5.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar	50
4.2.3.5.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar...	51
5. BULGULAR	53
5.1 Tuz ve Kuraklık Stresi Uygulamalarının Klorofil ve Stoma İçeriği Üzerine Etkisi.....	53
5.2 Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	54
5.3 Defne Bitkisi Yaprğından Elde Edilen GR Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	55
5.3.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	55
5.3.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	56
5.4 Defne Bitkisinin Yaprğından Elde Edilen GST Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	56
5.4.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	56
5.4.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	57
5.5 Defne Bitkisi Yaprğından Elde Edilen GPx Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	57
5.5.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	57
5.5.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	58
5.6 Defne Bitkisi Yaprğından Elde Edilen APx Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	58
5.6.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar.....	58
5.6.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar	59
5.7 Tuz ve Kuraklık Stresi Uygulamalarının Defne Bitkisi Yaprğında GR, GST, APx ve GPx Enzimlerinin Aktivitesine Etkilerinin Sonuçları	60
5.7.1 GR Enzimi Aktivitesine Etkisinin Çalışma Sonuçları	60
5.7.2 GST Enzimi Aktivitesine Etkisinin Çalışma Sonuçları	60
5.7.3 GPx Enzimi Aktivitesine Etkisinin Çalışma Sonuçları	61
5.7.4 APx Enzimi Aktivitesine Etkisinin Çalışma Sonuçları	62
6. TARTIŞMA	64
7. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

dH ₂ O	: Distile (Saf) Su
M	: Molar
mM	: Mili Molar
μmol	: Mikro Mol
Da	: Dalton
nm	: Nano Metre
g	: Gram
L	: Litre
μg	: Mikro Gram
μl	: Mikro Litre
dak	: Dakika
sn	: Saniye
ml	: Mili Litre
U	: Ünite

KISALTMALAR

ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
ROT	: Reaktif oksijen türleri
BSA	: Sığır Serum Albümin
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Fosfat
TRIS	: Hidroksimetil Amino Metan
OD	: Optik Yoğunluk
PVP	: Polivinil Prolidin
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. RNA polimeraz II enziminin görüntüsü (Bushnell vd, 2004).....	1
Şekil 1.2. Enzimlerin yapısı ve bölümleri.....	2
Şekil 1.3. Enzim-substrat ilişkisi şematik gösterim	3
Şekil 1.4. Enzim ve aktivasyon enerjisi arasındaki ilişki.....	4
Şekil 2.1. Serbest radikallerin neden oldukları hasarlar.....	17
Şekil 2.2. Serbest radikallerin antioksidanlar tarafından nötralize edilmesi (Büyük vd, 2012)	21
Şekil 2.3. Oksidatif denge ve oksidatif hasarın hücre içeriklerine etkisi (Özcan vd, 2015)	22
Şekil 2.4. Askorbat peroksidaz enziminin üç boyutlu yapısı (Guimero vd, 2013)	24
Şekil 2.5. Gualikol peroksidaz enziminin üç boyutlu yapısı (Murphy vd, 2012)	26
Şekil 2.6. Glutasyon S-transferaz enziminin üç boyutlu yapısı (Reinemer vd, 1996) ..	28
Şekil 2.7. Glutasyon redüktaz enziminin üç boyutlu yapısı	31
Şekil 3.1. Defne değer zinciri kalkınma raporu (Anonim, 2018).....	34
Şekil 3.2. Defne bitkisinin Türkiye’de yayılım alanları (Davis, 1970).....	35
Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan defne bitkileri ve yaprakları	38
Şekil 4.2. Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması (Habdous vd, 2002)	45
Şekil 5.1. Tuz stresi (136 mM NaCl) ve kuraklık stresi uygulamalarının defne bitkisinin yapraklarındaki klorofil içeriğine etkisi.....	53
Şekil 5.2. Tuz stresi (136 mM NaCl) ve kuraklık stresi uygulamalarının defne bitkisinin yapraklarındaki stoma içeriğine etkisi.	54
Şekil 5.3. Proteinlerin kantitatif tayinlerinde kullanılan standart grafik.....	55
Şekil 5.4. Stres faktörlerinin GR enziminin aktivitesi üzerine etkisi.....	60
Şekil 5.5. Stres faktörlerinin GST enziminin aktivitesi üzerine etkisi	61
Şekil 5.6. Stres faktörlerinin GPx enziminin aktivitesi üzerine etkisi	62
Şekil 5.7. Stres faktörlerinin APx enziminin aktivitesi üzerine etkisi	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

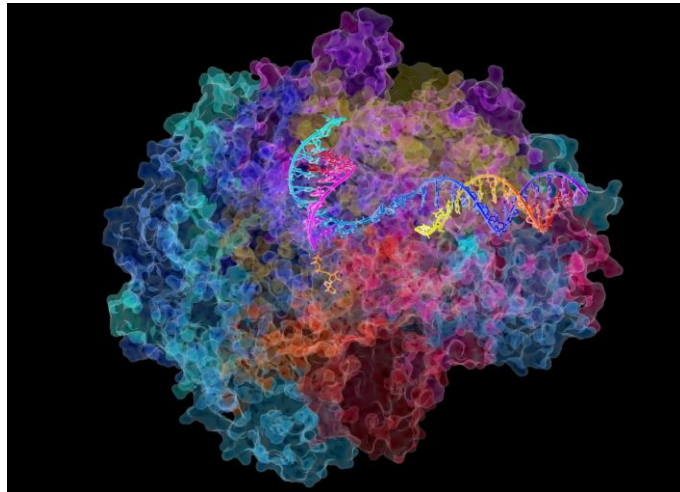
Sayfa

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması	10
Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması	16
Çizelge 3.1. Defne bitkisinin taksonomik sınıflandırması	33
Çizelge 4.1. GR enzimi aktivite ölçümü için kontrol ve numune küveti içeriği.....	43
Çizelge 4.2. Potasyum fosfat tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri	43
Çizelge 4.3. TRIS tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri..	44
Çizelge 4.4. TRIS tamponu pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri	44
Çizelge 4.5. GST enzimi aktivite ölçümü için kontrol ve numune küveti içeriği.....	45
Çizelge 4.6. Potasyum fosfat tamponu optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği	46
Çizelge 4.7. TRIS tamponu optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği....	46
Çizelge 4.8. TRIS tamponu pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği	47
Çizelge 4.9. GPx enzimi aktivite ölçümü için kontrol ve numune küvet içeriği	48
Çizelge 4.10. Potasyum fosfat tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği	48
Çizelge 4.11. TRIS tamponu optimizasyonu için kontrol ve küvet içeriği.....	49
Çizelge 4.12. Potasyum fosfat tamponu pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği	49
Çizelge 4.13. APx enzimi aktivite ölçümü için kontrol ve numune küvet içeriği	50
Çizelge 4.14. Potasyum fosfat tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği	51
Çizelge 4.15. TRIS tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği....	51
Çizelge 4.16. TRIS tamponu pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği	52
Çizelge 5.1. Bradford analizi sonucunda elde edilen veriler	54
Çizelge 5.2. Defne bitkisi yaprağında glutatyon redüktaz enziminin optimum iyonik şiddeti için TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	55
Çizelge 5.3. Defne bitkisi yaprağında glutatyon redüktaz enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	55
Çizelge 5.4. Defne bitkisi yaprağında glutatyon redüktaz enziminin optimum pH değeri için 200 mM TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	56
Çizelge 5.5. Defne bitkisi yaprağında glutatyon S-transferaz enziminin optimum iyonik şiddeti için TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	56
Çizelge 5.6. Defne bitkisi yaprağında glutatyon S-transferaz enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	57
Çizelge 5.7. Defne bitkisi yaprağında glutatyon S-transferaz enziminin optimum pH değeri için 20 mM TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	57

Çizelge 5.8. Defne bitkisi yaprağında gualikol peroksidaz enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	58
Çizelge 5.9. Defne bitkisi yaprağında gualikol peroksidaz enziminin optimum iyonik şiddeti için TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	58
Çizelge 5.10. Defne bitkisi yaprağında gualikol peroksidaz enziminin optimum pH değeri için 200 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	58
Çizelge 5.11. Defne bitkisinin yaprağında askorbat peroksidaz enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	59
Çizelge 5.12. Defne bitkisinin yaprağında askorbat peroksidaz enziminin optimum iyonik şiddeti için TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	59
Çizelge 5.13. Defne bitkisi yaprağında askorbat peroksidaz enziminin optimum pH değeri için 20 mM TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	59

1. GİRİŞ

Enzimler sözlükte canlı bitkisel ve hayvansal hücrelerde biyolojik olayların kimyasal reaksiyonlarını katalize eden kompleks organik maddeler olarak geçmektedir. Diğer bir deyişle enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve biyokimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjilerini düşürerek substratların daha kolay bir şekilde ürünlere dönüşmesinde rol oynayan protein yapılı katalizörlerdir. Katalizör, reaksiyonda tüketilmeden veya kalıcı olarak değiştirilmeden kimyasal reaksiyonun hızını etkileyen bir maddedir. Katalizörler kimyasal reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını arttırmaktadır. Biyolojik sistemlerde katalizörler adı verilen özel bir protein sınıfı olarak bilinen maddeler ise enzimlerdir. Bir enzimin üzerinde çalıştığı madde, onun substratı olarak bilinmektedir (Seah ve Kaplan, 1973). Bir grup katalitik RNA molekülü dışında enzimlerin yapısı proteinden oluşmaktadır. Protein grubunda yer alan katalizleme ve düzenleme fonksiyonlarına sahip olan enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek kimyasal reaksiyonların hızlı gerçekleşmesini sağlamaktadır. Enzimlerin katalitik aktivitesi, spesifikliği ve üç boyutlu yapı kazanmaları için proteindeki aminoasit dizilişleri büyük önem taşımaktadır. Enzimler canlılar için önemli roller oynamaktadır. Enerji alabilme, kendini yenileme, üretim, canlılığın devamı gibi önemli metabolik olaylar için gereklidirler.

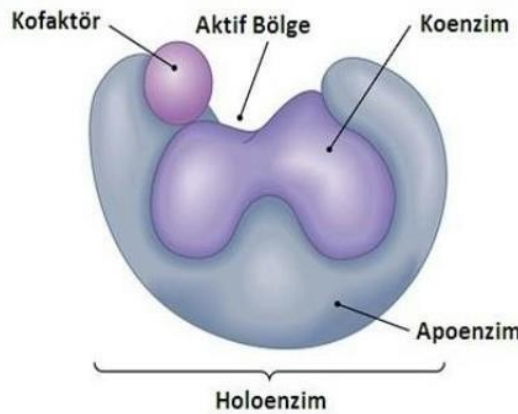


Şekil 1.1. RNA polimeraz II enziminin görüntüsü (Bushnell vd, 2004)

1.1 Enzimler

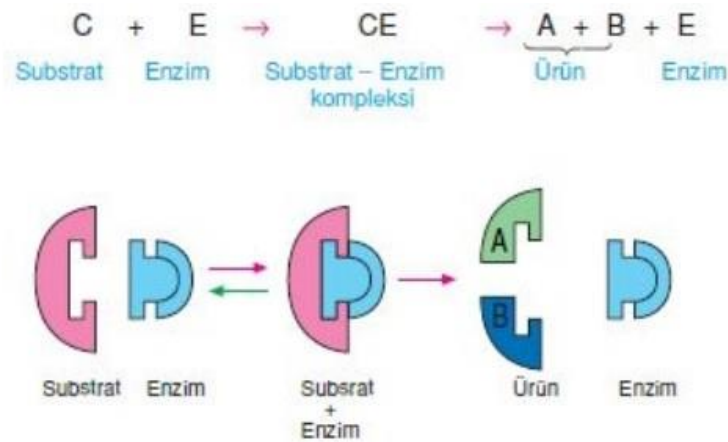
Enzimler, canlıya herhangi bir zarar vermeden hücrelerde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonların hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan protein yapısındaki biyokatalizörlerdir. Metabolik tepkimelerin düzenlenmesinde aktif olarak rol alarak bu tepkimelerin ılımlı bir şekilde gerçekleştirmesini sağlamalarına rağmen yapılarında herhangi bir değişikliğe uğramamaktadırlar.

Reaksiyonları katalizleyen enzimlerin yapısı protein olmasına karşılık bu yapıya protein olmayan daha küçük organik veya inorganik yapılar bağlanarak meydana gelen farklı protein yapısı da bulunmaktadır. Enzimlerin moleküler fonksiyonları, biyokimyasal reaksiyonları katalize etme yetenekleri olarak tanımlanmaktadır (Cuesta vd, 2015). Biyolojik reaksiyonları düzenleyen enzimlerin bazıları katalizleme işlemini gerçekleştirebilmesi için kimyasal yapılara ihtiyaç duyarlarken bir kısım enzimler ise kendi yapılarında olmayan inorganik yapıda bulunan ve enzimlerin aktivitesini sağlayan “kofaktör” isimli yan gruplara ihtiyaç duymaktadırlar. Bunun yanı sıra kofaktörün tersine organik yapıda bulunan yan gruplara ise “koenzim” ismi verilmektedir. Magnezyum, demir, çinko gibi birçok metal iyonu kofaktör olarak görev yapabileceği gibi CoA (Koenzim A), NAD (Nikotinamid adenin dinükleotid), FAD (Flavin adenin dinükleotid) gibi bileşikler de organik yapıdaki koenzim olarak sayılabilmektedir. Reaksiyonlar düzenlenirken enzim üzerinde bulunan ve bu düzenleme işlemine doğrudan müdahil olan bölgeler “aktif bölge” olarak isimlendirilmektedir.



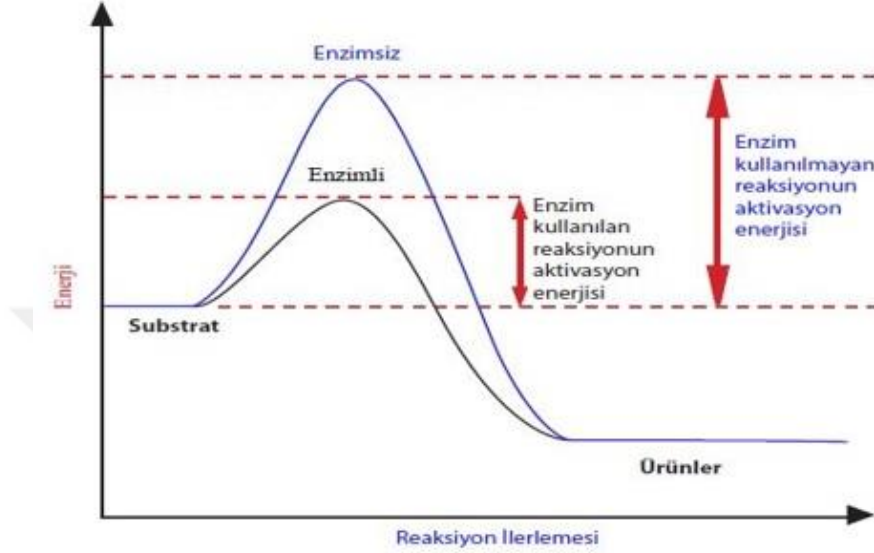
Şekil 1.2. Enzimlerin yapısı ve bölümleri

Enzimlerin biyokimyasal tepkimeleri gerçekleştirebilmeleri için etkileşimde bulunacağı metaboliti tanımaları gerekmektedir. Katalizör olarak bulundukları reaksiyon türüne ve ürüne çevirdikleri substratlara karşı oldukça seçici olan enzimler bu spesifiklikleriyle klasik kimyasal katalizörlere göre daha özgündürler ve bulundurdıkları bu özgünlük seviyesi enzimler arasında farklılık gösterebilmektedir. Bütün enzimlerin belirli substrat ve belirli etki spesifikliği bulunmaktadır. Substratın spesifikliği, bulunan birçok substrat molekülü içerisinde birini seçmesi olarak tanımlanabilmektedir. Etki spesifikliği ise enzimin sahip olduğu birçok reaksiyon seçeneğinden sadece birisine göre substratı ürüne çevirmesidir. Enzimlerin katalizlediği biyokimyasal reaksiyonlar, substratın enzimin aktif bölgesiyle birleşmesi ile başlamaktadır. Bu birleşme sonucunda ise enzim-substrat yapısı oluşmaktadır. Genel olarak enzim sadece bir substratı katalizler ve bu işlem eşit dengeye ulaştığında sonlanmaktadır. Aktif bölge sayısı katalitik aktivite için kovalent ya da nonkovalent bağlar ile bir ya da daha fazla olabilmektedir. Bu bölge substratların bağlanma bölgesini ve substratların katalitik dönüşümlere maruz kaldığı katalitik aktivite bölgesini içermektedir. Biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda enzimlerin etki edip dönüştürdükleri moleküller “substrat” ve tepkimeler sonucu oluşan yeni maddeler ise “ürün” olarak isimlendirilmektedir. Substratların aktif bölgelere bağlanması sırasında kovalent bağlar, hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler önemli rol oynamaktadır. Enzimlerin içerisinde kofaktör içermeyen, aktif olmayan ve sadece protein içeren kısmı “apoenzim” olarak isimlendirilirken, protein içeren kısmı “protez grubu” olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca protez grubu ile apoenzimin birleşimi ise holoenzimi oluşturmaktadır.



Şekil 1.3. Enzim-substrat ilişkisi şematik gösterim

Enzimlerin olmadığı bir reaksiyonla kıyaslandığında enzimler reaksiyonun hızını $10^5 - 10^{17}$ kat arttırmaktadırlar (Radzicka ve Wolfenden, 1995). Reaksiyon hızının bu kadar artmasına etki edecek faktörler; substratın deformasyonu, substrat molekülünün kovalent bağlanması, enzim reaktif bölümünün ortak etkileşmesi şeklinde sıralanabilir.



Şekil 1.4. Enzim ve aktivasyon enerjisi arasındaki ilişki

Katalizledikleri tepkimenin hızı enzimlerin aktivitesini ortaya çıkarmaktadır. Enzim aktivite birimi “Ünite (U)” olarak Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu tarafından 1978 yılında belirlenmiştir. Enzim Ünitesi (EU) birimi, bir mikromol (μmol) substratı standart şartlar altında bir dakikada ürüne dönüşümünü gerçekleştiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Diğer aktivite birimlerinden spesifik aktivite, bir miligram (mg) enzim tarafından bir dakikada dönüşüme uğrayana substratın mikromol miktarı ve bir enzim molekülü tarafından bir dakikada dönüşüme uğratılan substrat moleküllerinin sayısına ise moleküler aktivite (turnover sayısı) denilmektedir.

Enzim içerikli reaksiyonları hızları pH, aktivatör, enzim-substrat konsantrasyonu, sıcaklık, inhibitör ya da iyonik şiddet gibi bazı parametrelerden etkilenebilmektedir. Bu reaksiyonların hızı artan sıcaklığa bağlı olarak reaksiyon içerisinde artan kinetik enerjiye göre maksimum tepkime hızına gelene kadar artalan bir eğri çizmektedir. Artan sıcaklık derecesi bulunan enzimin aktivitesini 2 – 4 kat arttırabilmektedir. Ancak yüksek sıcaklık değerleri protein yapısından bulunan enzimin üç boyutlu yapısını bozarak etkisini kaybetmesine neden olmaktadır.

Enzimatik tepkimelerin hızı kullanılan substrata bağılı olarak öncelikle doğrusal şekilde artış gösterirken sonrasında hiperbolik artış göstermeye başlamaktadır. Substrat miktarının arttırılması ile reaksiyon hızı maksimum seviyeye ulaşmaktadır ancak belirli bir konsantrasyondan sonra substrat miktarının arttırılması reaksiyon hızına etki etmemektedir. Bu durumun nedeni ise enzimin, substrata doymuş hale gelmesidir.

Enzim içeren reaksiyonların hızını arttırmak için kullanılan maddeler “aktivatör” olarak isimlendirilirken reaksiyon hızını azaltmak için kullanılan maddeler “inhibitör” olarak adlandırılmaktadır. İnhibitör maddelerin tepkimede oluşturmuş oldukları etkiye ise “inhibisyon” denir.

Enzimatik tepkimelerde aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemler içerisinde önem derecesi yüksek bir kontrol mekanizmasıdır. Bunun nedeni ise inhibisyonun enzimatik reaksiyonun mekanizması, enzimin spesifikliği, enzim aktif merkezinin kimyasal ve fiziksel yapısı hakkında bize bilgi vermesidir. Ayrıca enzimlerin klinik uygulamalarının, özelliklerinin netleştirilmesi ve teknik açıdan geliştirilmesinde ışık tutabilmektedir. İnhibitörler, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Dönüşümsüz inhibitörler enzimlerde bulunan reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayan aktif merkeze kovalent bir şekilde bağlanırlar ve konformasyonu değiştirerek katalitik aktiviteyi sıfırlamaktadırlar. Dönüşümlü inhibitörler ise yarışmalı, yarışmasız, yarı yarışmalı ve karışık tip olmak üzere dört başlığa ayrılmaktadır. Dönüşümlü inhibitörlerde enzim ile inhibitör madde arasında denge olacak şekilde bağ kurulmaktadır.

Enzimlerin katalizör olarak görev yaptığı reaksiyonların hızı bizlere enzim aktivitesini göstermektedir. Enzim aktivitesinde belirli bir zaman içerisinde meydana gelen ürün miktarı ya da kullanılan substratın zaman içerisindeki azalışı ölçülmektedir. Bu ölçümlerde genel olarak spektrofotometrik yöntem kullanılmakta olup polarimetri, florimetri vb. gibi yöntemlerde bulunmaktadır.

1.2 Enzim Aktivitesine Etki Eden Faktörler

Bir enzimin aktivitesinin belirlenmesi için seçilen koşullar, substrat konsantrasyonunun belirlenmesi için gereken koşullarla aynı değildir. Enzimin aktivite sürecine etki eden temel surumlar mevcuttur. Bunlar substrat

konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH değeri, sıcaklık, inhibitör ya da aktivatör varlığı olarak sıralanabilir (Martinek, 1969).

1.2.1 Substrat Konsantrasyonu

Enzim miktarı sabit tutulup substrat konsantrasyonu yavaşça arttırılırsa, reaksiyon hızı maksimum bir noktaya (V_{max}) ulaşana kadar artacaktır. Bu noktadan sonra substrat konsantrasyonundaki artışlar hızı artırmayacaktır.

1.2.2 Enzim Konsantrasyonu

Aşırı substrat konsantrasyonunun olması durumunda, enzim konsantrasyonu arttıkça enzim katalizli reaksiyonun hızı artmaktadır. Bir süre sonra ise reaksiyonu gerçekleştiren enzim denatürasyona uğrar ve bunun sonucunda ise ortamda bulunan substrat konsantrasyonu arttırıldığında bile enzim aktivasyonunu kaybettiği için dönüşüm gerçekleşmeyecektir (Wilson ve Walker, 2010).

1.2.3 Sıcaklık

Çoğu kimyasal reaksiyonlardaki gibi enzimlerin katalizlemiş olduğu reaksiyonların hızları sıcaklığın yükselmesine bağlı olarak artış göstermektedir. Sıcaklıkta gerçekleşen 10 °C'lik bir artış, en iyi enzimlerin aktivitesini %50 ila %100 oranında arttırmaktadır. Reaksiyon sıcaklığındaki 1 ya da 2 derecelik artışlar ise %10 ila %20 arasında aktivasyon hızına etki edebilmektedir. Enzimatik reaksiyonlarda bu durum, reaksiyon hızının sıcaklık ile maksimum seviyeye yükselmesi ve enzimin yüksek sıcaklıklardan kaçınılmaz olarak etkilenmesinden dolayı sıcaklık artışıyla keskin bir şekilde aktivasyonun azalmasıyla sonlanmaktadır. Hayvanlarda bulunan çoğu enzimin 40 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızlı bir şekilde denatüre olmasından kaynaklı birçok enzimin bu sıcaklık değeri altında bir değerde tayini yapılmaktadır (Kurland ve Pilgis, 1995).

1.2.4 pH Etkisi

Enzimler pH değişikliklerinden kolayca etkilenmektedirler. Her enzimin optimum çalıştığı spesifik bir pH değeri bulunmaktadır. Optimum pH değeri, enzimlerin maksimum aktiviteye sahip olduğu nokta olarak tanımlanmaktadır (Kurland ve Pilgis, 1995).

1.2.5 İnhibitör Etkisi

Enzim inhibitörleri, enzimin katalitik etkisini değiştirerek yavaşlatan veya birkaç durumda katalizi durduran bileşenlerdir. Yarışmalı, yarışmasız ve yarı-yarışmalı olmak üzere üç yaygın enzim inhibisyonu vardır. İnhibisyon mekanizmaları hakkındaki çoğu teori, enzim substrat kompleksi ES'nin varlığına dayanmaktadır (Kurland ve Pilgis, 1995).

1.2.6 Aktivatör Etkisi

İnhibitörlerin tersi olarak enzimlerle birleşerek enzim katalizli reaksiyonların hızını arttıran maddelerdir. Metabolizma kontrolündeki enzimlerin regülasyonunda rol oynamaktadırlar.

1.3 Enzim Tarihi

Enzimlerin kullanılması insanlığın erken zamanlarında başlamıştır. İlk topluluklarda yiyeceklerin ve içeceklerin üretimi, hayvanlardan elde edilen postların bronzaştırılması şeklindeki uygulamalar enzim aktivitelerini içermektedir. Biyokatalizör olarak bilinen enzimler başlangıç olarak nişastanın diastaz katalizörle şekere dönüştürülmesi gerçekleştirilerek keşfedilmiştir (Payen ve Persoz, 1833).

F.W. Kuhne isimli bilim insanı Yunanca'da mayalı anlamına karşılık gelen enzim adını kullanmıştır ve sonrasında ise 1700'lü yıllardan itibaren günümüze kadar biyolojik katalizör olarak tanımlanmıştır. Bu tanımlamada polisakkarit olan nişastanın şekere dönüştürülmesi büyük rol oynamıştır.

1835 yılında kataliz terimini ilk defa Jöns Jacob Berzelius isimli bilim insanı reaksiyonları hızlandıran maddelerin bu hızlandırma özelliklerini tanımlamak için kullanmıştır. Sindirim enzimi olan pepsinin keşfi ise 1936 yılında Theodor Schwann isimli bir fizyolog tarafından gerçekleştirilmiştir.

Üreaz enziminin izole edildiği çalışmasıyla birlikte 1926 yılında Sumner bütün enzimlerin yapısının protein olduğunu bildirmiştir (Nelson ve Cox, 2013). Aynı şekilde Sumner 1937 yılında katalaz enziminin protein yapısında bulunduğunu keşfetmiş ve katalaz ile üreaz'ı kristal yapıda izole etmeyi başarmıştır.

Enzimlerin izole edilmesi ve saflaştırılması için enzimlerin biyokimyasal aktiviteye sahip proteinler olduğunun farkına varılması ve enzimlerin

karakterizasyonunda x-ışını kırınım teknikleri kullanılarak başlıca önemli yöntemler geliştirilmiştir (Mora ve Arioli, 2014).

Dinamik çalışmalar ribonükleaz yapısının doğası ve lizozimin katalitik mekanizmasının çözülme çabaları, ortaya çıkan bir bilimsel disiplin olarak enzimolojiyi ortaya çıkarmıştır (De Simone vd, 2015).

Kimotripsin ve tripsin sindirim enzimleri üzerinde çalışmaları bulunan Stanley ve Northrop isimli bilim insanları saf olarak izole edilen enzimlerin yapısının protein olduğunu kesin olarak belirlemişlerdir.

1.4 Enzimlerin Özellikleri

Enzimlerin düzgün bir şekilde çalışabilmeleri için bulundukları ortamların konsantrasyonu, pH değeri, sıcaklık değeri optimum şartlarda olması gerekmektedir. Aksi durumlarda ise çeşitli tuzlar, çözücüler yardımıyla yapıları denatüre edilebilmektedirler. Büyüklükleri ise 12.000 – 1.000.000 Da arasında veya daha fazla molekül ağırlığına sahip olabilirler (Nelson ve Cox, 2013).

Enzimleri diğer katalizörlerden ayıran temel farklılıklar bulunmaktadır;

1. Enzimli gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlar, diğer katalizörler tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlardan daha hızlı gerçekleşmektedir.
2. Biyokimyasal reaksiyonlarda meydana gelen ve istenmeyen yan ürünler enzimler tarafından katalize edilen reaksiyonlarda daha az oluşmaktadır.
3. İnorganik katalizörler genel olarak yüksek sıcaklık, basınç ve yüksek pH değeri altında gerçekleşirken, enzimatik reaksiyonlar için ortam şartları optimum yeterli olmaktadır.

1.5 Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Enzimlerin isimleri dönüştürdükleri substratın köküne “-az” eki getirilerek oluşturulmaktadır. Lipaz enzimi bu tanıma örnek verilebilir. Lipaz enzimi, lipid trigliseritlerinin hidrolizini gerçekleştirmektedir. Sükrozun glukoz ve fruktoza dönüşmesini katalizleyen enzim ise sükraz olarak isimlendirilmektedir. Proteinlerin hidrolizini gerçekleştiren pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimleri, belirtilen adlandırma sisteminden önce keşfedilmiş ve ortak adlarla isimlendirilmektedir.

Enzimler gerçekleştirdikleri reaksiyon çeşidine göre oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olmak üzere gruplara ayrılmışlardır. Bu gruplandırma sistemi Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) olan kurum tarafından belirlenmiştir.

Oksideretüktazlar içerisinde yaygın olarak bilinen katalaz, oksidaz, redüktaz ve dehidrogenaz enzimleri bulunmaktadır ve oksidasyon-indireme reaksiyonlarını gerçekleştirmektedirler.

Transferazlar polimeraz, DNA ve RNA sentezinin gerçekleştirilmesi için ihtiyaç duyulan enzim grubudur. Fosfat, metil, asetil gibi grupların transferlerinin yapılmasında rol oynamaktadırlar. Polimeraz, protein kinaz, metilaz ve asetil transferaz bu grup içerisinde yaygın olarak bilinen enzimlerdir.

Hidrolazlar golgi Aygıtı'nda sentezlenmekte olup hücrede lizozom içerisinde yoğun şekilde bulunmaktadır. Ayrıca hidroliz reaksiyonlarını su ilavesiyle gerçekleştirmektedirler.

Liyazlar dekarboksilaz ve aldolaz bu grup içerisinde bilinen enzimlerdir. Oksidasyon ve hidroliz haricinde farklı yollarla C-C, C-O, C-S, C-N bağlarının kırılmasını katalize etmektedirler.

İzomerazlar epimeraz, resemaz gibi enzimler örnek verilebilirken bu enzimler molekül içerisindeki atomik düzenlemeleri gerçekleştirmektedirler.

Ligazlar RNA ligaz, DNA ligaz, peptid sentaz enzimleri bu grup içerisinde yer almaktadırlar ve birleştirme reaksiyonlarını gerçekleştirmektedirler.

IUBMB komitesi enzimlere ayrı ayrı enzim komisyonu (E.C.) numarası vererek alt sınıfları ve bu alt sınıfların da alt sınıflarını tanımlamıştır. Her enzim yukarıda belirtilen altı ana enzim grubu içerisinde yer almaktadır. Bu bölümler oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar (sentetazlar) olarak sıralandırılmaktadır. Örneğin bir enzimin EC numarası EC 2.4.5.3 olarak verilmiştir. 2 sayısı reaksiyon çeşidinin transferaz olduğunu diğer basamaklar ise alt sınıfları ve diğer altsınıfları temsil etmektedir.

Çizelge 1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

IEC Enzimlerin Sınıflandırılması		
Grup Adı	Katalizlediği Reaksiyon Türü	Örnekleri
EC 1. Oksideredüktazlar	Yükseltgenme-İndirgenme Reaksiyonları	Glutatyon redüktaz EC: 1.8.1.7
EC 2. Transferazlar	Fonksiyonel grupların Transferi	Glutatyon S-transferaz EC: 2.5.1.18
EC 3. Hidrolazlar	Hidroliz Reaksiyonları	α – amilaz EC: 3.2.1.1
EC 4. Liyazlar	Çift bağ veya tersine ekleme	Karbonik anhidraz EC: 4.2.1.1
EC 5. İzomerazlar	İzomerasyon reaksiyonları	Alenin rasemaz EC: 5.1.1.1
EC 6. Ligazlar	ATP bölünmesiyle bağ oluşumu	Glutamin Sentaz EC: 6.3.1.2

2. STRES FAKTÖRLERİ ve ANTİOKSİDANLAR

Herhangi bir çevresel uyarının bitkiyle etkileşimi, bitki hücrelerindeki birkaç sinyal yolunun aktivasyonu ile sonuçlanabilmektedir. Bu yollar, hücrenin uygun stres tepkisine yol açan biyolojik süreçlerdir (Wrzaczek vd, 2011). Tüm canlı organizmalar gibi, bitkiler de normal büyüme ve gelişmeleri için potansiyel performanslarını ortaya koyan optimum çevresel koşullara ihtiyaç duyarlar. Diğer canlılara nazaran bitkilerin çevresel değişikliklere cevap vermesi ve uyum sağlaması için daha verimli ve karmaşık stratejiler geliştirmeleri gerekmektedir. Bitkileri normal büyüme ve gelişmelerini engelleyen faktörler “stres” olarak tanımlanmaktadır ve bitki verimliliğinde azalmaya neden olurlar. Bu uyarıcılar abiyotik stres faktörleri ve biyotik stres faktörleri olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (Schulze, 2005).

Birçok bilimsel çalışma, bitkilerin abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı biyolojik tepkilerini anlama ve tolerans fenotiplerinden sorumlu belirli genleri, proteinleri veya metabolitleri belirlemeye odaklanmıştır. Moleküler, biyokimyasal ve fizyolojik seviyelerde, aşırı stres durumu üzerine bir dizi mekanizma aktive edilir. Bitkilerdeki stres tepkisi çalışmaları, sinyal tepkileri sırasında sinyalleşme ağları arasındaki karışmaların arttığını göstermektedir (Fraire-Velázquez vd, 2011). Başlangıçta, reaktif oksijen türleri üretiminin aktivasyonuna, absisik asit, jasmonik asit, salisilik asit gibi hormonların birikmesine yol açan bir dizi kinaz reaksiyonu reaksiyonu indüklenir. Böylece, strese duyarlı genler ifade edilir ve bitkinin genel stres yanıtı oluşturulur (Wrzaczek vd, 2011).

Hücrelerin çevresel değişimlerine yanıtları hücre dışında bulunan moleküller ve hücre membranı proteinlerinin etkileşimleri sonucunda gerçekleşmektedir. Plazma membranının üzerinde bulunan reseptörler stres faktörünün algılanmasını sağlamaktadır. Algılanmanın sonucunda oluşan sinyal G proteinin aracılığıyla kalsiyum, inositol fosfat ve reaktif oksijen türleri gibi maddelerin üretimi gerçekleşmektedir. Bitkinin strese karşı direnç göstermesi ve hayatta kalması ise sensör proteinlerin ilgili genleri aktive etmesiyle gerçekleşmektedir (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Bitkinin büyümesi, gelişimi ve verimi kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, soğuk, radyasyon, toksik metaller, bakteriler, mantarlar gibi çeşitli çevresel koşullardan

etkilenmektedir. Yapısal, fizyolojik ve biyokimyasal süreçler ise bu çevresel koşulların optimum noktalarını aştığında etkilenmektedir (Jaleel vd, 2008). Gerçekleşen stres esnasında yüksek enerji içeren elektronlar oksijene transfer edilerek reaktif oksijen türleri oluşturulmaktadır (Mittler, 2002). Oluşan serbest radikaller endojen ve ekzojen kaynaklı olarak ikiye ayrılmaktadır. Endojen kaynaklar serbest radikal kaynakları içerisinde fotosentez reaksiyonları ve mitokondrideki sitrik asit döngüsünde rol oynayan oksidazlar, amino oksidazlar gibi çeşitli enzimlerin etkisiyle gerçekleşmektedir (Van Breusegem ve Dat, 2006). Ekzojen kaynaklar ise kuraklık, tuzluluk, yüksek ve düşük sıcaklık, yüksek ışık değeri, ağır metaller, UV ışık olarak sıralanabilmektedir (Lamb ve Dixon, 1997). Serbest oksijen radikalleri en yaygın olarak bulunan serbest radikaller olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu maddeler reaktif oksijen türleri (ROT) olarak isimlendirilmektedir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2), süperoksit (O_2^-), hidroksil ($OH^\cdot$) gibi moleküller yaygın olarak bulunan reaktif oksijen türleri arasında yer almaktadır (Apel ve Hirt, 2004).

2.1 Biyotik Stres Faktörleri

Biyotik stres terimi, bitkilerin diğer organizmalarla biyolojik etkileşimlerini ifade etmektedir. Bitki enfeksiyonu veya bakteri, virüs, mantar, nematod, parazit, böcek ve yabancı otların neden olduğu bitkinin belirli bir kısmına mekanik hasar vermektedir. Bu stres faktörleri ciddi ölçüde bitki veriminde kayıplara ve dolayısıyla ekonomik sorunlara yol açmaktadır.

2.2 Abiyotik Stres Faktörleri

Abiyotik stres, çevresel değişikliklerin cansız etmenlerden kaynaklı olarak gerçekleştiği stres faktörleridir. Bu faktörlerden bazıları sıcaklık, kuraklık, yüksek tuzluluk oranı, ağır metaller, fotoperiyottaki değişiklikler, ışık yoğunluğu ve kalitesi, besin bolluğu ve açlık, donma, hava ve toprak kirliliği olarak sınıflandırılabilir.

Hükümetler Arası İklim Değişikliği Paneli (IPCC) raporuna göre, yakın gelecekte bu stres faktörleri küresel ısınmanın etkisiyle önemli ölçüde büyümeye devam edecek ve bunun sonucunda bitkinin abiyotik stres koşullarına karşı verdiği tepkinin mekanizmalarını anlamak bitki biliminde acil bir zorluk olacaktır (Wrzaczek

vd, 2011). Abiyotik stres faktörlerinin çeşitliliği nedeniyle, her bir bireysel stres yanıtı için güçlü bir spesifik hücresel elemanın gerekli olduğu varsayılabilir. Bununla birlikte, her türlü abiyotik strese genel cevapta dikkate değer bir ortak unsur yer almaktadır. Esasen, tüm abiyotik stres faktörleri reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini indükler, ancak bunlar farklı formlarda ve farklı hücre altı konumlarında üretilmektedir. Reaktif oksijen türleri metabolizmada dengeli bir rol oynamaktadır. Ancak, oldukça toksik olmaları ekspresyonlarının sıkı kontrol altında tutulması gerektiğini göstermektedir. Bununla beraber, programlanmış hücre ölümüne veya temizleme proteini üretimine yol açan gen ekspresyonu için sinyaller olarak işlev görmektedirler. Bu nedenle, ROT üretimi ve detoksifikasyonu arasındaki denge hücresel fonksiyonları sürdürmek için önemlidir (Genga vd, 2011).

2.2.1 Kuraklık Stresi

Kuraklık, yağışların normal seviyelerdeki değerlerine göre belirgin bir şekilde azalmasıyla ortaya çıkan ve yeryüzü kaynaklarının üretim sistemlerini kötü etkileyen olay olarak tanımlanabilmektedir. Çevresel stres faktörü olarak kuraklık veya su açığının tarımsal üretim üzerinde ciddi etkileri vardır. Kuraklığın, bitkinin hücresel metabolizması üzerinde doğrudan bir etkisi vardır, bu da büyüme indeksinde ve mahsul veriminde önemli bir azalmaya neden olur. Kuraklık stresi üzerine hücrede karmaşık bir ağın varlığı bir dizi çalışma ile vurgulanmaktadır. Protein ekspresyonundaki değişiklikler bu karmaşık ağda büyük rol oynar. Mahsul verimini artırmak için ana strateji, kuraklık stresi altında verimi sürdürmek ve potansiyel mahsul verimi üzerinde zararlı bir etkisi olmaksızın elit genotiplerde en güçlü genleri ve proteinleri biriktirmek için gerekli olan tüm özellikleri birleştirmektir. Bu yaklaşım, kararlı ve kuraklık koşullarında yüksek verim potansiyeli sergileyen yeni bitki çeşitlerinin iyileştirilmesini sağlayacaktır. Kuraklık yanıtı transkripsiyonda yeniden programlama ile başlar ve birçok fizyolojik değişikliklerle devam eder. Bu fizyolojik değişiklikler arasında stomaların kapatılması, ozmolitlerin ve antioksidanların sentezi, istenmeyen reaksiyon ürünlerinin ortadan kaldırılması yer almaktadır (Ding vd, 2013).

Bitki gelişiminin en fazla etkilendiği stres koşulu kuraklıktır. Yaşanan kuraklık stresinin süresi bitki gelişiminde etkisini göstermektedir. Kuraklık stresinin meydana gelmiş olduğu birinci periyotta, gövde gelişimini durdurduktan sonra kök

gelişimine önem veren bitki daha fazla suya ulaşmayı amaçlamaktadır. Kuraklık stresinin ilerleyen evrelerinde gövde ve kök gelişimini durduran bitkinin yaprak sayısının azalması ve yaprak alanında küçülme olmasıyla birlikte sararan yapraklar dökülmektedir.

Turgor basıncının ortadan kalmasıyla birlikte hücrelerin büyüme işlevlerini olumsuz yönden etkilenmesiyle hücrelerin küçük kalmasına neden olmaktadır. Büyüme yetisini kaybeden hücrelerden dolayı yaprak boyutlarının küçülmesiyle sonuçlanmaktadır. Büyüme parametresindeki bu azalma olayına bağlı olarak hücre duvarı sentezi işleminde de azalma meydana gelmektedir. Strese bağlı olarak proteinlerin ve klorofil sentezinin etkilenmesiyle birlikte bitkinin fotosentez ve solunum yetenekleri hasar görmektedir. Küçülen yaprak boyutundan dolayı elde edilen fotosentez ürünlerinde azalma meydana gelmektedir. Kuraklık stresine bağlı olarak meydana gelen kloroplastların yapılarındaki değişimlerin sonucunda bitkide klorofil miktarının azalmasına ve fotosentez reaksiyonlarının gerçekleşmemesine neden olmaktadır.

Kuraklık stresinin varlığında bitkilerde meydana gelen en önemli biyokimyasal değişiklik, stomaların kapanmasından kaynaklı olarak fotosentez hızının düşmesi ve hücre içerisinde singlet oksijen, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin oluşmasıdır (Bhargava ve Sawant, 2013). Stres koşulları altında bitkide birikmeye başlayan reaktif oksijen türleri aslında sinyal iletim mekanizmasında görev yapan metabolizmanın doğal ürünü olmaları dikkat çekmektedir (Cabello vd, 2014). Fazla birikmeleri sonucunda ise lipid peroksidasyonu, DNA parçalanması, protein indirgenmesi gibi olayların indüklenmesine neden olarak hücre ölümüne yol açabilmektedirler. Reaktif oksijen türlerinin birikimi ile oluşan oksidatif stres ile mücadelede bitkiler enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan mekanizmaları kullanmaktadırlar. Fotosentetik olmayan membranları korumakla görevli olan enzimatik olmayan antioksidan moleküllerin yanı sıra enzimatik antioksidan moleküller, reaktif oksijen birikimlerinin indirgenmesiyle birikmelerine engel olmayı sağlamaktadır (Osakabe vd, 2014).

2.2.2 Tuz Stresi

Tuz stresi bitkinin gelişimini ve biyokimyasal reaksiyonlarını etkilemekte olan önemli abiyotik stres şartıdır. Bu stres koşulu genel olarak degradasyon olayının

gerçekleşmesine ve ek olarak bitki büyüme düzenleyecilerinin oluşmasının engellenmesinde etkili rol oynamaktadır.

Yetersiz yağış alınmasından kaynaklı olarak toprakta bulunan tuzlar alt seviyelere taşınmamaktadır. Tuz stresinin oluşmasındaki en büyük nedenlerden birisi evaporasyon kriterinin yüksek olmasıdır. Evaporasyon nedeniyle suyun buharlaşmasına bağlı olarak beraberinde taşıdıkları tuz toprak yüzeyinde kalmaktadır. Tuzluluk stresinde sıklıkla görülmekte ve diğerlerine göre en zararlı etkileri gösteren sodyum klorür (NaCl) formudur.

Tuz stresi bitkilerde ozmotik ve iyon stresleri oluşturduktan sonra bitkilerin fizyolojik ve kimyasal yapılarının bozulmasına neden olmaktadır. Ortaya çıkan ozmotik stresten dolayı bitki içerisindeki su miktarında azalma meydana gelmektedir. Bu olay fizyolojik kuraklık olarak adlandırılmaktadır. Bitkide gerçekleşen bu fizyolojik kuraklık durumundan dolayı hücre genişlemesinde azalma meydana gelmektedir. Ozmotik stresin ardından gelmekte olan iyon stresinde ise ortamda konsantrasyonu artan sodyum (Na) ve Cl (klor) iyonlarının K^+ ve Ca^{+2} gibi besin maddeleri ile rekabet eder ve bitkide besin eksikliğine neden olmaktadır (Hu ve Schmidhalter, 2005).

NaCl tuzunun bitkide doğrudan göstermiş olduğu etkiler bodur büyüme, kök büyümesinin durması, toprak üstü gelişimin gerilemesi, yaprakların küçük kalması, hücre ölümünden kaynaklı olarak yapraklarda nekrozların meydana gelmesi olarak sıralanabilmektedir. Stresin biyokimyasal etkilerinde ise reaktif oksijen türlerinin sentezlenmesine neden olmasından dolayı klorofil miktarını azalmasına bağlı olarak fotosentez inhibisyonu ve K^+ alımının inhibisyonu ve hücre ölümü olarak belirtilmektedir (Hong vd, 2009).

2.3 Serbest Radikaller

Serbest radikaller yüksek enerjili olup dışarıda bulunan orbitallerinde eşlenmemiş elektron taşıyan ve yüksek reaktivite özelliğine sahip atom ya da moleküllerdir (Nawar, 1996). Yörüngelerinde bulundurdıkları eşlenmemiş elektronlar sayesinde çevresinde bulunan diğer maddelerle rahatlıkla etkileşim içerisine girebilirler.

Hücre için gerekli olan enerjinin sağlanmasında gerçekleşen birçok reaksiyon tarafından kullanılan oksijen serbest radikal türlerinin üretilmesine neden

olabilmektedir. Ayrıca mitokondri organeli vücudun normal oksijen kullanımı esnasında devamlı serbest radikal üretmektedir. Üretim yolları ise kovalent bağlı molekülün homolitik bölünmesi, molekülün elektron kaybetmesi ve moleküle sadece bir adet elektronun eklenmesi olarak üç ana yola ayrılmaktadır (Kılınç, 2002).

Oluşan bu serbest radikaller lipid, protein, nükleik asit gibi önemli moleküllerin yapısında değişikliğe neden olabilmektedirler (Shinde vd, 2012). Ayrıca mitokondri haricinde çok sayıda endojen ya da eksojen kaynaklardan da serbest radikal üretimi gerçekleşebilmektedir. Üretilen bu serbest radikaller nitrojen ve oksijen kaynaklı olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Oksijen kaynaklı olan radikaller reaktif oksijen türleri (ROT), nitrojen kaynaklı olanlar ise reaktif nitrojen türleri olarak adlandırılmıştır (Valko vd, 2007).

Alkolsil (RO), süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH), peroksil (ROO), lipid peroksil (LOO) gibi radikaller reaktif oksijen türleri arasında yer alırken, nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO_2) radikaller ise reaktif nitrojen türlerini oluşturmaktadır. Hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik asit (HNO_3), ozon (O_3), lipid peroksit (LOOH) gibi oksidanlar olarak adlandırılan maddeler serbest radikaller sınıfında gösterilmezler.

Çizelge 2.1. Reaktif oksijen türlerinin sınıflandırılması

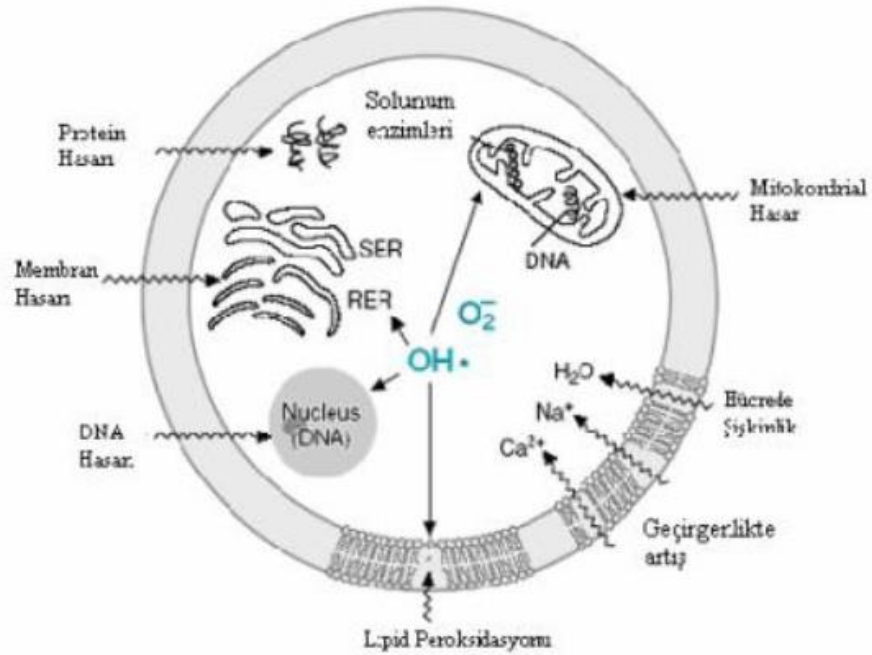
Reaktif Oksijen Türleri			
Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit	O_2^-	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	OH^-	Hipokloröz asit	HOCl
Peroksil	ROO	Hipobromöz asit	HOBr
Alkolsil	RO	Singlet oksijen	1O_2
Hidroperoksil	HO_2	Ozon	O_3
Lipid Peroksil	LOO		

Oksijenin kısıtlı bir miktarı metabolik olaylar sırasında öncelikle mitokondride olmak üzere indirgenme tepkimesine girerek reaktif oksijene

dönüşmektedir. Bilinen başlıca türleri arasında ise hidroksil, süperoksit ve hidrojen peroksit bulunmaktadır. Süperoksit (O_2^-) ve hidroksil ($OH^\cdot$) radikali serbest radikal grubunda bulunurken hidrojen peroksit (H_2O_2) prooksidan içerisinde yer almaktadır (Navarro ve Boveris, 2004).

Serbest radikallerin genel olarak zararlı olduğu bilinse de düşük konsantrasyonlardaki serbest radikallerin yararlı etkileri bulunmaktadır. Örneğin, ksenebiyotiklerin detoksifikasyonu, kanserli hücrelerin öldürülmesi gibi savunma mekanizmalarında ve hücresel sinyallerin aktivasyonunda rol oynamaktadırlar.

Başlıca zararları arasında ise serbest radikal hasarına aşırı derecede hassas olan lipidler gelmektedir. Lipidlerle reaksiyona giren serbest radikaller hücre zarının yapısını ve geçirgenliğini bozarak hücreye zarar vererek lipid peroksidasyonunu gerçekleştirmektedir. Lipid peroksidasyonu ise zehirli yan ürünlerin çok fazla üretilmesine neden olmaktadır.



Şekil 2.1. Serbest radikallerin neden oldukları hasarlar

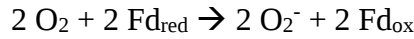
Reaktif oksijen türleri tüm hücresel moleküllere zarar verebilmek için mitokondriyal DNA ve membran lipidleriyle reaksiyona girmektedir. Nükleer DNA ile kıyaslandığında mitokondriyal DNA'nın kromatin organizasyonu ile DNA onarım reaksiyonlarının olmaması serbest radikallere karşı daha hassas olmasına neden olmaktadır (Yakes ve Van Houten, 1997). Stres durumunda serbest radikallerin

konsantrasyonu kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda yükselerek bitkiye zarar verecek değerlere yükselmektedir. Reaktif oksijen türlerinin artmasıyla meydana gelen lipid peroksidasyonu membran yapısının bozulmasında rol oynamaktadır (McCord, 2000). Bitki zarında bulunan başlıca yağ asitleri olan çoklu doymamış yağ asitleri singlet oksijen ve hidroksil gibi serbest radikallere oldukça duyarlıdır. Gerçekleşen lipid peroksidasyonu sonucunda bu yağ asitlerinin yapısı bozularak membranın akışkanlığı ortadan kalkmakta ve hücrede sızıntı artmaktadır. Ayrıca membran proteinlerinde hasar oluşmaktadır (Halliwell, 2006).

2.3.1 Reaktif Oksijen Türleri

2.3.1.1 Süperoksit Anyonu (O_2^-)

Hem yükseltgen hem de indirgen olarak görev yapabilen süperoksit, elektron taşıma sisteminde (ETS) bulunan moleküler oksijenin (O_2) ferrodoksin ile indirgenmesi sonucunda meydana gelmektedir.



Bir elektronunu kaybedip oksijene yükseltgenerek, indirgen görevini gerçekleştirmiş olmaktadır. Elektron alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştüğünde ise yükseltgenmiş olmaktadır. Serbest radikal olmasına rağmen tek başına fazla etkili olmayan süperoksit, peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgenmesinin gerçekleştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bunun sonucunda ise hidroksil radikalının yapım reaksiyonlarını hızlandırmaktadır (Harbinson ve Hedley, 1993).

2.3.1.2 Singlet Oksijen (1O_2)

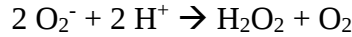
Ortaklanmamış elektron bulundurmadığından dolayı radikal olmayan ve O_2 molekülünün fazla enerji almasından kaynaklı olarak dönüş yönünün tam tersine dönen bir yörüngeye geçmesiyle, moleküler oksijenin (O_2) nitrik oksit ile tepkimesiyle ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) hipoklorit (ClO^-) ile tepkimesiyle meydana gelen serbest radikaldır.

Öncelikli hedefi C-C (karbon-karbon) çift bağları olmakla birlikte sistein, tirptofan, histidin gibi aminoasit yapılarında olan çift bağlardan kaynaklı olarak

meydana gelen elektron yokluğu sonucunda singlet oksijen ile reaksiyona girme ihtimalleri oldukça yüksektir.

2.3.1.3 Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

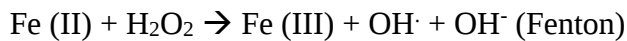
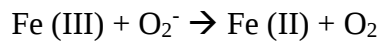
Oksijen molekülünün enzimatik reaksiyonlar sonucunda indirgenmesi ya da yüksek bir katalitik aktiviteye sahip olan süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlemesi sonucunda meydana gelmektedir.



Paylaşılmamış elektron içeriğinin olmamasından dolayı radikal olmayan hidrojen peroksit reaktif değildir. Bazı metal iyonlarının (Fe, Cu) ortamda bulunmasıyla birlikte hidroksilin öncülü olarak davranması oksitleyici tür olarak bilinmesini sağlamaktadır. Proteinlerde bulunan demir ile tepkimeye giren hidrojen peroksit, güçlü oksitleyici özellik içermekte olan reaktif demir yapılarını oluşturmaktadır. Oluşan bu reaktif demir yapıları lipid peroksidasyonu gibi tehlikeli reaksiyonların başlamasına neden olabilmektedir. Ayrıca karbondioksitin (CO₂) indirgenme reaksiyonunda görev yapmakta olan çoğu enzimin hidrojen peroksit karşı aşırı hassas olmasından dolayı fiksasyonun zarara uğramaması için ortamdan hemen uzaklaştırılması gerekmektedir.

2.3.1.4 Hidroksil Radikali (OH[•])

Hücre içerisindeki en reaktif oksidant olan hidroksil (OH[•]) çok kararsız bir moleküldür ve oksidasyon sonucunda enzimler ile lipitlere zarar vermektedir. Hücrelerin ve özellikle bitki hücrelerinin hidroksili eleyebilecekleri bir enzim sistemleri bulunmadığı için çok kolay bir şekilde sistemdeki bütün moleküller ile tepkimeye girebilmektedirler. Ayrıca fazla üretilmeleri halinde hücrelerin ölümü gerçekleşmektedir.



2.4 Oksidatif Stres

Oksidatif stres esas olarak metabolik olaylar sırasında konsantrasyonu artan serbest radikallere karşı süpürücü etkisi olan antioksidanların yoğunluğunun yetersiz kalması sonucunda aralarındaki dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır.

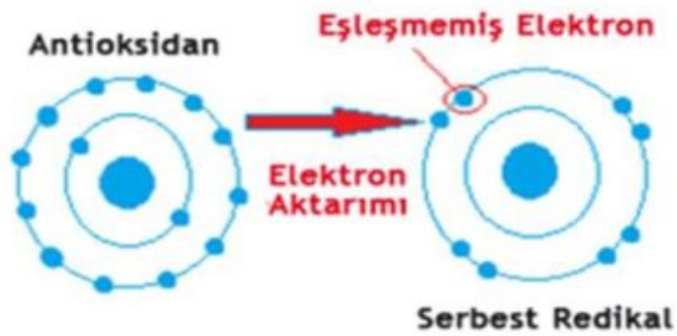
Oksidatif stresin artması sonucunda meydana gelen reaktif oksijen türleri lipid ve proteinlerin çift bağ bulunduran gruplarına ve ayrıca DNA'da bulunan bazların içerdikleri çift bağlara saldırarak bir hidrojen atomu koparıp oksidasyon reaksiyonlarını oluşturmaktadırlar. Bu reaksiyonların sonucunda ise lipid, protein, DNA gibi önemli makromoleküllerin yapıları bozularak hücre ölümü ya da zedelenmesi gerçekleşmektedir. Proteinlerde meydana gelen oksidatif stres sonucunda peroksit ve protein karbonilleri oluşmaktadır. Amino asit içeriği bir proteinin serbest radikal hasarından etkilenme derecesini gösterebilmektedir. Histidin, metiyonin, sistein, triptofan, tirozin gibi amino asitleri içerisinde bulunduran proteinler serbest radikallere karşı daha savunmasız haldedirler. Ayrıca içeriğinde fazla sayıda disülfid bağı ihtiva eden proteinlerin yapısında kükürt merkezli serbest radikaller oluşmaktadır ve bu yüzden üç boyutlu yapısı bulunan protein denatüre olarak fonksiyonlarını yerine getiremez. Hidroksil radikalının amino asitlerin karbon atomlarından hidrojen koparması ile merkezi karbon olan serbest radikaller oluşmaktadır. Serbest radikalın metilen gruplarından hidrojen atomu koparmasıyla birlikte yağ asitlerinin oksidasyon reaksiyonu başlamaktadır. Lipid peroksidasyonu reaktif oksijen türlerinin membranlarda bulunan yağ asitlerinde oksidasyona neden olmasıyla birlikte başlamaktadır (Gupta vd, 2014). Lipid hidroperoksitleri radikal oluşumu ve oksikejenin bağlanmasıyla birlikte meydana gelmektedir. Bu süreç lipid peroksidasyonunun ilk aşamasını içermektedir. Hidroperoksitlerin yıkımının gerçekleşmesi ile malondialdehit (MDA) gibi biyoaktif aldehytler oluşmaktadır. Diffüze olarak ya da metabolize edilerek ise hücrelerde hasar meydana getirmektedirler.

Nörolojik ve kalp hastalıkları, diyabet en önemlisi ise kanser olmak üzere birçok hastalığın oluşumunda oksidatif stres rol oynamaktadır (Berlett ve Stadtman, 1997). ROT konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak oluşan hücre hasarlarını engellemek için enzimler ya da antioksidanlar endojen antioksidan savunma mekanizması oluşturmaktadırlar (Sorescu ve Griendling, 2002).

2.5 Antioksidanlar

Çeşitli reaksiyonlar sonucunda meydana gelen serbest radikallerin oluşmasını ve yapılara vereceği hasarı engelleyebilmek için vücut içerisinde antioksidanlar olarak isimlendirilen savunma mekanizmaları bulunmaktadır.

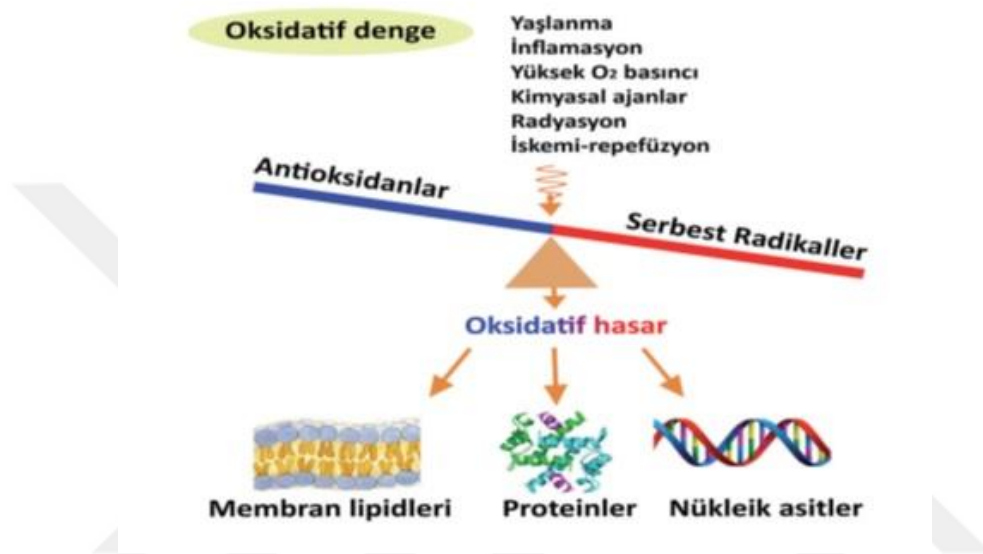
Bu savunma mekanizmaları oluşan radikallerle çok hızlı şekilde reaksiyon oluşturarak oksidasyonu ve peroksidasyonu önlemektedir (Dündar, 1999). Antioksidanlar elektron hedefi oluşturup serbest radikallerin bu elektrona bağlanmasını sağlayarak etki etmektedir (Aydemir ve SARI, 2009). Antioksidanların başlıca görevleri oluşan serbest radikallerin fazlasını detoksifiye etmek ve radikallerin zehirli etkisine karşı hücreleri korumak ayrıca oluşabilecek çeşitli hastalıkların önlenmesine katkı sağlamaktır (Pham-Huy vd, 2008). Hücrelerin fonksiyonlarını eksiksiz bir şekilde gerçekleştirmesinde ve bütünlüklerinin korunmasında rol oynamaktadırlar. Serbest radikallerle antioksidanlar arasındaki denge korunduğu süre boyunca organizma serbest radikallerin toksik etkisinden etkilenmemektedir. Metabolizma içerisinde işlenen oksijen farklı etmenlerle aktif oksijenlerin oluşması için katkı sağlamaktadır. Bu aktif oksijenler lipid, karbonhidrat ve proteinlerin yapısında bozulmalara yol açmaktadır (Önenç ve Açıkgöz, 2005). Eğer oksidatif hasarın oluşumundan sonra onarım gerçekleşmezse kanser başta olmak üzere kalp hastalıkları, diyabet, alzheimer gibi önemli hastalıkların meydana gelmesine neden olur (Halliwell ve Gutteridge, 1986).



Şekil 2.2. Serbest radikallerin antioksidanlar tarafından nötralize edilmesi (Büyük vd, 2012)

Antioksidanlar serbest radikalleri etkisiz hale getirebilmek için dört farklı yol kullanmaktadır. Bu yollardan ilk olanı toplayıcı etkidir. Toplayıcı etki oksijen

radikallerini etkileyip onları tutar ya da olduklarından daha zayıf yeni bir moleküle çevirerek etkilerini ortadan kaldıran mekanizmadır. Bastırıcı etki ise radikallere bir hidrojen vererek onların aktivitesini durdurma ya da azaltma sistemidir. Bu sisteme örnek olarak vitaminler ve flavanoidler verilebilir. Üçüncü etki ise serbest oksijen radikallerini bağlayarak onların zincirlerini kırıp aktivitelerini durduran zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin ve mineraller bu etkiye sahip maddelerdir. Son olarak ise oluşan hasarın onarıldığı onarıcı etkidir.



Şekil 2.3. Oksidatif denge ve oksidatif hasarın hücre içeriklerine etkisi (Özcan vd, 2015)

Vücudu korumak için serbest radikalleri etkisizleştirmek, oksidan/antioksidan dengesini korumak için görev yapan antioksidanlar endojen ve ekzojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır (Gupta vd, 2014). Ayrıca, endojen antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere iki gruba, ekzojen antioksidanlar ise vitamin ekzojen, ilaç olarak kullanılan ekzojen ve gıdalarda bulunan ekzojen antioksidanlar olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır.

Nonenzimatik antioksidanlar serbest oksijen radikalini yakalayan ve serbest radikal zincir tepkimelerini kıran bileşiklerdir (Ou vd, 2002). Örnek olarak ise mannitol, sistein, hidrokinin, melatonin, koenzim Q10, selenyum, çinko, A, C ve E vitaminleri, flavanoidler, tokoferoller, askorbik asit enzimatik olmayan antioksidanlar grubunda yer almaktadır (Jung, 2004). Enzimatik antioksidanlar; var olan serbest radikallerle tepkimeye girerek bu radikallerin daha zararlı hallere dönüşmelerini ve yeni serbest radikallerin oluşmasını önleyen maddelerdir.

Antioksidan enzimler genel olarak serbest radikallerin proteinler, lipidler ve DNA gibi hücrel yapılar zarar vermesini engellemenin yanında bir hücrel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilirler (Diplock, 1998). Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APx), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), gualikol peroksidaz (GPx), glutatyon s-transferaz (GST), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve katalaz (CAT) olarak bilinmektedir (34).

2.5.1 Enzimatik Antioksidanlar

2.5.1.1 Askorbat Peroksidaz (APx: EC 1.11.1.11)

Askorbat peroksidaz enzimi hidrojen peroksitin (H_2O_2) suya indirgenme tepkimesini gerçekleştiren enzimdir. Ayrıca bu tepkimedeki en önemli substrat olan askorbata büyük afinite ve özgüllük göstermektedir (Asada, 1992). Genellikle organik substratların hidrojen peroksit bağımlı oksidasyonlarını gerçekleştiren heme içeren peroksidaz grubunun bir üyesidir.

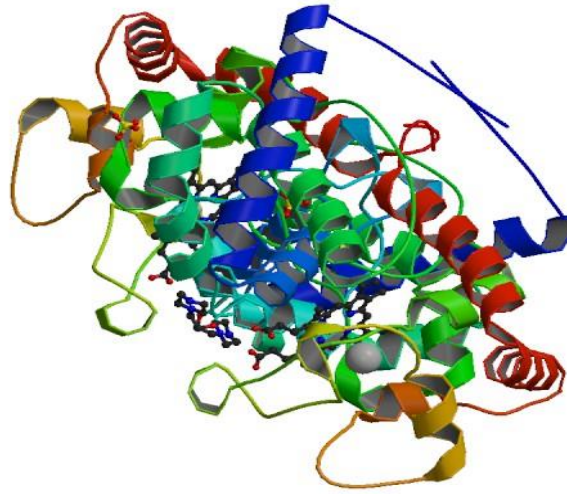
Askorbat peroksidaz zincir kırıcı rolünü üstlenip süperoksit anyonu başta olmak üzere singlet oksijen ve hidrojen peroksit örnekleri gibi geniş bir reaktif oksijen türünü detoksifiye edebilmektedir. Ek olarak metal iyonuna sahip enzimlerin fonksiyonlarını korumasında ve fotosentezin düzenlenmesine ek olarak ışığa karşı korunmada önemli roller üstlenmektedir (Karacif, 2012).

1979 yılında ilk olarak askorbat bağımlı peroksidaz aktivitesi (Kelly, 1979), peroksidaz aktivitesinin yaban turpu bitkisi üzerindeki ilk gözleminden yaklaşık olarak 150 yıl sonra bulunmuştur. En önemli antioksidanlardan biri olan askorbat süperoksit, hidroksil radikalleriyle direkt olarak tepkimeye girebilmektedir (Shigeoka vd, 2002). Askorbat peroksidaz enzimi ise hidrojen peroksiti iki molekül askorbat kullanarak suya parçaladıktan sonra monodehidroaskorbat (MDHA) meydana getirmektedir (Kumar vd, 2011).



Askorbat peroksidaz enzimi hücre içerisinde dört farklı şekilde gözlenmektedir. Bunlar kloroplast stromasında (sAPx), tilakoyide bağlı olarak (tAPx), sitosolik (cAPx) ve son olarak glioksizom membranında (gmAPx) olmak üzere ayrılmaktadır (Noctor ve Foyer, 1998). Sitosolik askorbat peroksidaz enzimi

sitozolde ve apoplastta meydana gelen veya organellerden difüzyon gerçekleştiren hidrojen peroksiti giderirken, organellerde bulunan askorbat peroksidaz ise organellerin içerisinde oluşan hidrojen peroksiti ortadan kaldırmaktadır (Mittler ve Zilinskas, 1992). Askorbat peroksidaz enzimi glutatyon redüktaz, monodehidroaskorbat redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz ile birlikte antioksidan metabolitler olan glutatyon, askorbat ve NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat) kullanarak askorbat-glutatyon döngüsünü oluşturmaktadır. Oluşan bu döngü hidrojen peroksitin hücresel seviyede regülasyonu ve detoksifikasyonu için önemlidir (Noctor ve Foyer, 1998). Bu enzim birçok yüksek bitkide tanımlanmış olup sitozol, kloroplast, peroksisom ve mitokondri dahil hücre bölmelerine dağılmış ve farklı özelliklere sahip izoenzimler ailesini içermektedir (Shigeoka vd, 2002). Yüksek yapılı bitkilerde APx, bitki gelişimi esnasında ve farklı çevresel stresler altında hidrojen peroksitin düzenlenmesi mekanizmasında önemli bir unsurdur. Bunlara ek olarak ise APx ökaryotik alglerde de bulunmaktadır.



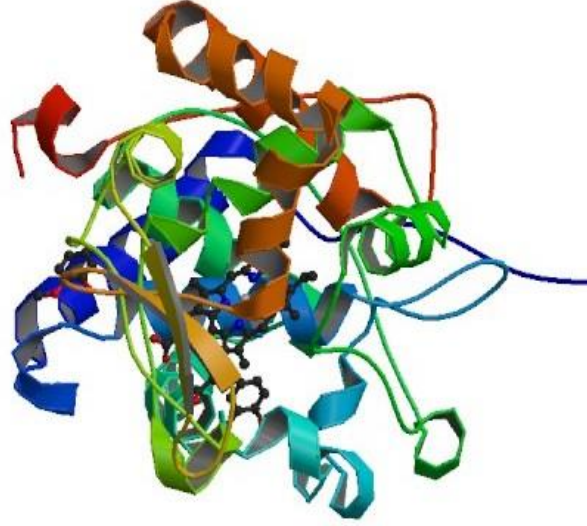
Şekil 2.4. Askorbat peroksidaz enziminin üç boyutlu yapısı (Guimero vd, 2013)

Nitrok oksit (NO) türevli moleküllerin aracılık ettiği post translasyonel modifikasyonlar hedef proteinlerin işlevlerini değiştirip düzenleyebildikleri için yeni bir araştırma alanı haline gelmiştir. Elde edilen proteomik veriler, askorbat peroksidazın post translasyonel modifikasyonların potansiyel hedeflerinden biri olduğunu göstermiştir (Shigeoka vd, 2002).

2.5.1.2 Gualikol Peroksidaz (GPx: EC 1.11.1.17)

Gualikol peroksidaz enzimi hem metabolik olaylar sırasında hem de stres koşulları altında elektron vericiler kullanarak hidrojen peroksiti ya da organik peroksitlerin suya veya alkollere dönüşme reaksiyonlarını gerçekleştiren (Herbette vd, 2007), başlıca hücre duvarında ve sitoplazmada bulunan enzimdir (Demiral, 2003).

Farklı reaksiyonlar sonucu organizmalarda oluşan hidrojen peroksitin oksitleyici özelliği bulunduğu için ortamdan hızlıca uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu işlemin gerçekleştirilmesi görevi ise katalaz ve peroksidaz enzimleri gibi antioksidan enzimler tarafından yapılmaktadır (Halliwell, 1984). Hücre içerisinde katalazlar tarafından düzenlenen hidrojen peroksit konsantrasyonu, peroksidazlar tarafından hücrenin farklı yerlerinde gerçekleştirilmektedir (Scandalios vd, 1994). Gualikol, pyragallol, katekin, katekol gibi bileşikler elektron donörü olarak kullanarak peroksitlerin oksidasyon reaksiyonunu kontrol etmektedirler (Onsa vd, 2004). Gualikol peroksidazlar hidrojen peroksitlerin, lipid hidroperoksitlerin konsantrasyonlarını azaltmada ve oksidatif stres durumunda bitkilerin korunmasında görevli farklı izozimleri bulunan geniş bir aileye sahiptir. Gualikol peroksidaz sitozol ve vakuolde aktif olarak bulunmasından dolayı hidrojen peroksitin çıkartılması işleminde anahtar enzim olarak tanımlanmaktadır. 1809 yılında at turpundan karakterize edilen enzim için yapılan renk reaksiyonunda gualikol ilk defa substrat olarak kullanılmıştır. İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda ise peroksidazların reaksiyonları katalizleme şekilleri ortaya çıkartılmıştır. Hidrojen peroksitin indirgenip, peroksidaz enziminin substrat olarak kullanmış olduğu guaiakolün yükseltgenme yapısı 3,3-dimetoksi-4,4 bifenokinon olarak bulunmuştur (Doerge vd, 1997).



Şekil 2.5. Gualikol peroksidaz enziminin üç boyutlu yapısı (Murphy vd, 2012)

Gualikol peroksidazın aktivitesinin tayin edilebilmesi için guaiakol tetraguaiakol oluşumunu izlemek yeterli olabilmektedir (van Doorn ve Ketsa, 2014). Bu durum gualikol peroksidazın çevresel strese karşı tepki olarak önemli rol alması ve kolorimetrik yöntemle kolayca belirlenebilir olması nedeniyle, bitkinin çevresel strese tepkisinin değerlendirilmesinde yeni ve iyi bir parametre olabilir (Gallie, 2013). Ayrıca, gualikol peroksidazın kahve (Queiroz vd, 1998), salatalık (Lee ve Lee, 2000), mısır ve pirinç gibi bitkilerin çevresel koşullarındaki değişikliklere duyarlı olduğu gözlenen diğer çalışmalar tarafından da doğrulanmıştır (Kang ve Saltveit, 2002). Bunlara ek olarak guaiakol peroksidazın stres altında bulunan *Capsicum annuum* L. (biber), *Pisum sativum* (bezelye) gibi birçok bitkide savunma rolünü üstlendiği bildirilmiştir (Aydin vd, 2012).

Bitkilerde hücre duvar proteinlerinin bağlanması (Fry, 1986), indol asetik asitin (IAA) ayarlanması (Agostini vd, 1997), savunma mekanizmaları (Bartonek-Roxå vd, 1991), çimlenme (Morohashi, 2002), lignin sentezi (Duarte-Vázquez vd, 2000), oksidatif stres (Hiraga vd, 2001) gibi birçok önemli fonksiyonlarda peroksidaz enzimleri görev almaktadır.

2.5.1.3 Glutasyon S-transferaz (GST: EC 2.5.1.18)

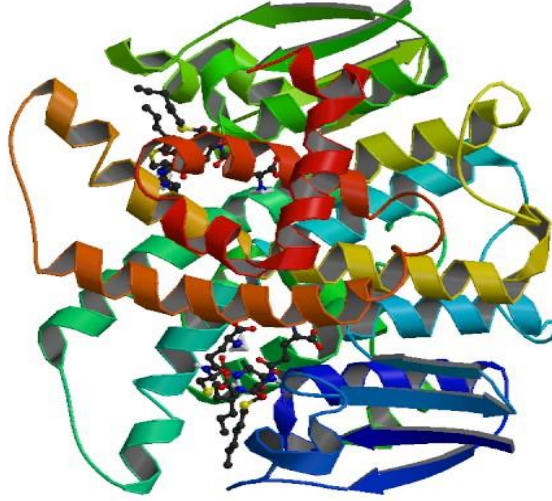
Doğada her yerde izoenzimi bulunmakta olan ve hem prokaryot hem de ökaryotik organizmalarda tespit edilen glutasyon S-transferaz enzimi yaklaşık olarak 223 aminoasitten oluşmakta ve fazla sayıda gen tarafından kodlanmaktadır. GST enzimi,

a / β yapısında ve proteinin N-terminal bölgesinde yer alan GSH bağlanma bölgesi (G bölgesi), birçok hidrofobik yapının bağlandığı alan II (H bölgesi) olmak üzere iki alanı bağlayan kısa amino asit rezidülerinden oluşmaktadır (Bucciarelli vd, 1999). Ayrıca böceklerde, bitkilerde, memelilerde de varlığı gözlemlenmiştir (Sherratt ve Hayes, 2002). İlk defa sıçan karaciğerinden Boyland ve arkadaşları tarafından saflaştırılmıştır ve molekül ağırlığı 20.000-25.000 dalton değerinde bulunmaktadır (Hayes vd, 2005). İndirgenmiş glutatyon sülfür atomu ile substrat arasında tioester bağı yaparak glutatyonun elektrofilik merkez içeren ksenobiyotiklere dönüşmesini katalizleyebilmenin yanı sıra (Mannervik, 1985) diğer kimyasalların detoksifikasyonunda yer alarak önemli bir rol üstlenmektedir (Singh vd, 1987). Bu reaksiyonların birikiminde bir takım GST izoenzimleri, hidroperoksitlerin azaltılması (Ketterer vd, 1990) ve doymamış bileşiklerin izomerleştirilmesi olmak üzere glutatyonla bağlı çeşitli katalitik aktiviteleri ortaya çıkarmaktadır (Benson vd, 1977).

GSH konjugasyonunu katalizlemek için aktivasyon enerjisini düşüren GST, baz katalizör fonksiyonu olarak tirozin ile GSH'nin GS'ye dönüştürülmesi için hızı arttırmaktadır. Detoksifikasyon mekanizmasındaki son ürün merkapturik asit yolunun ilk adımı olarak ksenobiyotiklerin ortadan kaldırılmasına bağlı glutatyon konjugasyon reaksiyonudur. Glutatyon S-transferaz enzimi bu basamağı katalizleyerek homeostasiyi oluşturan bir enzimdir. GST'ler amino asit içeriğinin benzerliğine, substrat spesifikliğine bağlı olarak sitozolik, mikrozomal ve mitokondriyal aile olmak üzere üç ayrı üyeye ayrılmaktadır. Bunların içerisinde bulunan beş sınıf sitozoliktir ve α , μ , π , θ ve κ olarak adlandırılmaktadır. Diğer iki sınıf ise mikrozomaldır. Sitozolik ailede bulunan GST'ler insan popülasyonlarında anlamlı genetik polimorfizmlere bağlıdır (Townsend ve Tew, 2003). Endojen bileşiklere ek olarak ksenobiyotiklerin transformasyonunda etkili bir rol oynamaktadırlar (Wilce ve Parker, 1994). Sitozolik GST'lerin tümünde homodimer ve heterodimer birimleri 24-28 kDa büyüklüğünde moleküler ağırlığa sahip olmakla birlikte, X-ışını kristalografi sonuçlarına göre α , μ , π , β , θ monomerleri fizyolojik olarak birbirine benzemektedir. Alfa (α), mü (μ), pi (π) monomerleri ilaç metabolizmasında görev alırken teta (θ) formu bitkilerde ve hayvanlarda, pi (π) ise sadece bitkilerde yer almaktadır (Jowsey vd, 2001).

Mikrozomal GST'ler integral membran proteinler olup peroksizom organlinde bulunmaktadır. Araşidonik asit (ARA, $C_{20}H_{32}O_2$) metabolizmasında

glutatyona bağımlı olarak izomeraz ve transferaz tepkimelerini düzenlemektedir. Üç boyutlu yapıları sitozolik GST enzimleri ile yapısal farklılıklar göstermelerinden dolayı mitokondriyal GST yapıları ve primer yapıları farklıdır. Mikrozomal GST'lerin izoenzimlerinin amino asit dizilimleriyle birlikte izoelektrik noktaları birbirinden farklılıklar göstermektedir.



Şekil 2.6. Glutasyon S-transferaz enziminin üç boyutlu yapısı (Reinemer vd, 1996)

Glutasyon S-transferaz enzimleri ayrıca hücre içinde hidrofobik ligandların taşınması, zehirlerin detoksifikasyonu, sinyal iletim yollarının değişikliğe uğratılması gibi katalitik olmayan birçok fonksiyonları içerisinde barındırmaktadır (Takahashi vd, 1993). GST katalitik aktivitelerinin temeli olarak ise bu enzimlerin GSH'nin aktif bölgeye bağlanırken glutasyon sülfhidril grubunun pKa'sını 9'dan 6-6,5 değerlerine düşürme yeteneğine sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Armstrong, 1994). Ayrıca GSH molekülüne substrat tanımında olmayan ligandların bağlanarak taşınmasını gerçekleştirmektedir. GST'lerin en önemli görevi arasında α , β -doymamış aldehitler, alkil halojenürleri içeren endojen/ekzojen kaynaklı alkilleme ajanların detoksifikasyonunu sağlamaktır (Huang vd, 2008). Ayrıca, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonuna ek olarak dokuların oksidatif stres karşısında kötü etkilenmelerinden korunması için önemli rol oynamaktadır.

Ksenobiyotikler vücutta biriktiği zaman DNA hasarı başta olmak üzere doku hasarı, mutasyon, kanser gibi tehlikeli metabolik sorunları doğurmaktadır. Detoksifikasyon reaksiyonları genel olarak enzim ya da çeşitli moleküller yardımıyla ksenobiyotiklerin etkilerinin durdurulup zararsız hale getirilerek vücut dışına atılması

mekanizmasıdır. Bu mekanizma faz I, faz II, faz III reaksiyonları olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Hayes vd, 2005). Faz I reaksiyonları lipofilik değişimleri içeren oksidasyon, hidroliz ve redüksiyon olaylarını içerisinde barındırmaktadır. Faz I reaksiyonlarında karsinojenlerin reaktivlikleri bozularak zararsız ürünlere dönüştürülür ve vücuttan atılmaktadırlar. GST enzimi faz II reaksiyonlarında görev yapmaktadır ve birinci aşamada oluşturulan maddeler bu adımda hidrofilik maddelere çevrilerek vücut dışına atılmaktadırlar (Yu, 2004). GST'ler, bileşikleri suda daha çözünür hale getirmek için GSH'nin bir sülfhidril grubu (-SH) tarafından çok çeşitli substratlar üzerinde elektrofilik merkezlere konjugasyonunu katalize etmektedirler (Gülçin vd, 2016). Gerçekleşen bu reaksiyon sonrasında suda çözünebilir duruma gelen zararlı maddeler safra ve böbrek yollarıyla kolay bir şekilde vücuttan atılmaktadır. Faz III'te ise suda daha fazla çözünebilen ve polar olmayan ksenobiyotikler vücut dışına atılmaktadır.

Ek olarak GST'nin indirgeyici gücü membran bileşenlerini peroksidasyon etkisinden korumaktadır. Aldehit yapısında bulunan lipid peroksidasyon ürünlerinden olan 4-hidroksi alkenalleri GSH ile konjüge edilerek etkisizleştirilmektedir. Ayrıca sitoplazma içerisinde tirozin parçalanmasında ve flavanoidlerin bağlanmasında rol oynamaktadır (Dixon vd, 2002).

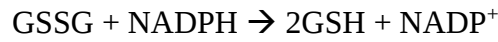
2.5.1.4 Glutasyon Redüktaz (GR: EC 1.8.1.7)

Glutasyon molekülü protein yapısında olmayan, glutamat (Glu), sistein (Cys), glisin (Gly) olmak üzere üç adet aminoasitten oluşan ve sitoplazmada sentezi gerçekleşen hücrede en fazla bulunan tiyoldür (Appenzeller-Herzog, 2011). Sitoplazma içerisinde GSH/GSSG oranı 100:1 değerinde olacak şekilde sentezlenmektedir. Protein yapısında bulunmamasının nedeni ise glutasyon molekülünün aminoasitler kullanılarak sentezlenmesi esnasında glutamik asitin ($C_5H_9NO_4$), sistein aminoasidine farklı taraftan peptit bağıyla bağlanmasından kaynaklanmaktadır (Kuchel ve Ralston, 1988). Suda çözünebilme özelliği bulunan glutasyon hücre düzeyinde birden fazla görevi yerine getirmektedir (Lushchak, 2012). 1888 yılında ilk olarak Ray-Pailhade isimli bilim insanları tarafından mayalarda tespit edilen glutasyonun 1935 yılında kimyasal yapısı bulunmuştur.

Glutamatın γ -karboksil grubuna peptit bağı gerçekleştirerek sisteinin amino grubu bağlanmıştır. Bu bağı sayesinde GSH'nin hücre içi peptidazların etkisinden

korunduğu tahmin edilmektedir (Wu vd, 2004). Yapısında bulundurmuş olduğu -SH (sülfhidril) grubundan dolayı GSH isimlendirmesi yapılabilmektedir. Bu grubun varlığı sayesinde hücreleri oksitleyicilerin zararlarından koruyabilmektedir. Ek olarak içermiş olduğu bu ayrıcalıklar sayesinde glutatyonun hücre içerisindeki kararlılığı artmaktadır (Meister, 1988).

Glutatyon redüktaz, prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunan, bitki hücrelerini reaktif oksijen türlerinin oluşmasıyla indüklenen oksidatif hasardan korumak için okside edilmiş glutatyonu (GSSG), redükte glutatyon (GSH) katalizleyebilen önemli bir NADPH bağımlı flavoprotein oksidoredüktazdır.

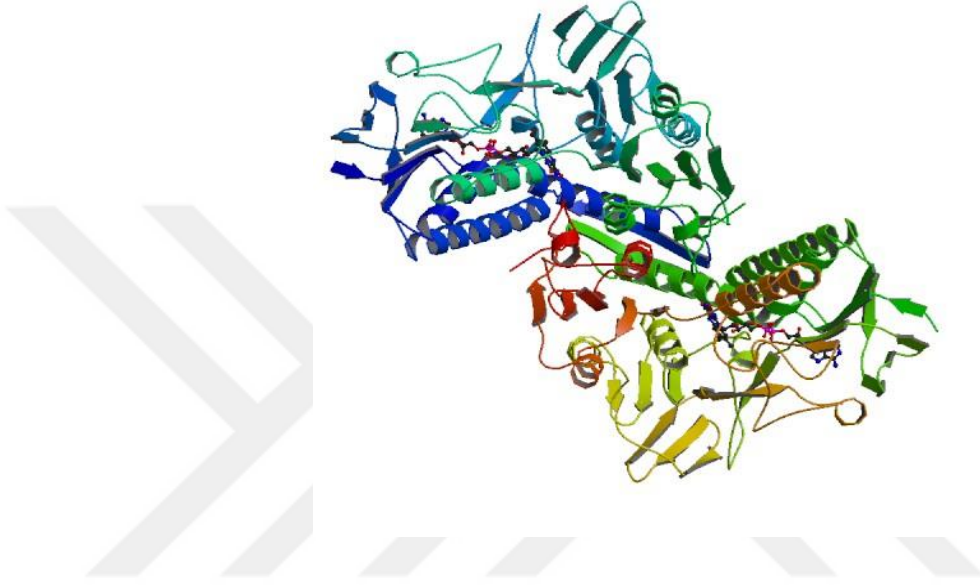


Mol kütlesi ise 70.000-140.000 dalton arasında farklılık göstermektedir. 1931 yılında farklı hayvanlardan alınan karaciğer dokusu üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda okside glutatyonu indirgeme yeteneğine sahip sistemin varlığı bulunmuştur (Hopkins ve Elliott, 1931). Hemen sonrasında 1932 yılında ise glukoz dehidrogenaz (G6PD) enziminin glukoz varlığında GSSG'yi indirgediği gözlemlenmiştir (Mann, 1932). 1935 yılında ise bulunan bu indirgeyici sistemin enzim-koenzim yapısı olduğu maya ile çalışılarak anlaşılmıştır (Meldrum ve Tarr, 1935). 1951 yılında ise bezelye ve buğday tohumlarında glutatyon redüktazın, okside glutatyonun indirgenme tepkimesini gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Mapson ve Goddard, 1951). Çimlenmiş bezelyeler üzerinde 1963 yılında yapılan çalışmada ise ilk olarak enzimin biyolojik ve fizyolojik özellikleri belirlenmiştir (Mapson ve Isherwood, 1963).

Glutatyon redüktazın optimum pH'si organizmalara göre farklılık göstermekle birlikte fizyolojik pH değeri 7.5 olarak bulunmuştur (Alkaladi vd, 2013). Enzimin aktivitesi ise farklı tampon sistemlerinde 5.0-10.0 pH aralığında gerçekleştiği bildirilmiştir (Tandoğan ve Ulusu, 2007).

Elektriksel alanda molekülün hareket etmediği, pozitif ve negatif yükünün sıfır olduğu pH derecesi izoelektrik nokta (pI) olarak tanımlanmaktadır. Glutatyon redüktaz enziminin izoelektrik noktası hayvansal dokularda daha yüksek olduğunun bildirilmesiyle birlikte bezelyede 5.4, fare karaciğerinde 6.4, insanda ise 6.7 değerinde bulunmuştur (Romero-Puertas vd, 2006).

Sıcaklığa bağı olarak glutatyon redüktaz enziminin aktivitesi değişmektedir. Enzimin verimli olarak çalıştığı sıcaklık değerinin tepe noktası 60 °C olduğu ve sıcaklık değerinin yükselmesiyle birlikte enzimin aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir (Ulus vd, 2005). Bitkilerde GR enziminin aktivitesi 20 ile 55 derece arasında gerçekleşirken, enzim bitki sistemlerinde ekstrem sıcaklık şartlarına oldukça dirençlilik göstermektedir (de Lamotte vd, 2000).



Şekil 2.7. Glutatyon redüktaz enziminin üç boyutlu yapısı

Pentoz fosfat yolunda üretilen ve indirgeyici özelliğe sahip NADPH, reaksiyonun gerçekleşmesi için gereklidir. NADPH, okside glutatyon gibi glutatyon redüktazın substratıdır. Reaksiyon sonucunda ise GSH ve NADP⁺ ürünleri oluşmaktadır. GR enzimi hücrel redoks dengesinde kritik rol oynayan bir enzim olmakla birlikte GSH/GSSG oranını ayarlayarak bitki hücrelerini oksidatif stresin hasarından korumaktadır (Gill vd, 2013). Glutatyon redüktazın en önemli görevi hücredeki GSH/GSSG (100:1) dengesinin stabil kalmasını sağlamaktır. Bu orandaki artan ya da azalan denge miktarı sonucunda hücre içerisinde oksidatif stres oluşmaktadır.

Glutatyon (GSH) biyosentezi ve okside glutatyonun (GSSG) glutatyon indirgenmesi olmak üzere temel iki adet biyokimyasal reaksiyonla korunmakta olan ve oksidatif stres koşullarında azalan GSH/GSSG oranı hücre içi redoks durumlarının göstergesi olarak kabul edilmektedir. Pentoz fosfat yolundan elde edilen NADPH, biyokimyasal reaksiyonların başlaması için gereklidir. Bu aşamada

glutasyon redüktaz ile G6PD (glukoz-6-fosfat dehidrogenaz) arasında ilişki meydana gelmektedir. Eğer burada G6PD enzimi çalışmazsa NADPH üretimi gerçekleşmez. Bunun sonucunda ise GR enziminin aktivitesinin düşmesinden dolayı GSH oluşumunun artmasıyla sonuçlanmaktadır (CIFTCI vd, 2000). Bu reaksiyon zincirinin kusursuz bir şekilde çalışması gen regülasyonu, ROS ve serbest radikallerin detoksifikasyonu, DNA biyosentezinin gerçekleşebilmesi için gereklidir (Tunç vd, 2015).

Reaktif oksijen süpürücü olarak anahtar enzim olan glutasyon redüktaz (GR), GSSG'yi indirgeyip GSH'ye katalizlerken, glutasyonun disülfür bağına NADPH'den alınan elektronlar direkt olarak bağlanmamaktadırlar. Öncelikle FAD'a (Flavin adenine dinucleotide) bağlanan elektronlar sonrasında ise disülfür köprüsüne gönderilerek okside glutatona bağlanması gerçekleşmektedir. Glutasyon redüktaz enzimi FAD bağlayıcı, NADPH bağlayıcı ve ara yüz olmak üzere başlıca üç bölüm içermektedir. Yapısal olarak FAD ve NADP⁺ alanları hem birbirlerine hem de dehidrogenazlardaki nükleotid bağlayıcı alanlara benzerlikler göstermektedir (Iribarne vd, 2000).

Glutasyon redüktaz ve glutasyon eksikliğinin sonucunda hücrede oksidatif stres oluşması kaynaklı kistik fibroz, orak hücreli anemi, HIV, Parkinson, Alzheimer, şizofreni, epilepsi, kanser gibi birçok ciddi hastalığın oluşumu gerçekleşmektedir (Townsend vd, 2003). Hemolitik anemi, sarılık hastalıkları glutasyon redüktaz eksikliğinin en önemli belirteçleri olarak bilinmektedir (Kamerbeek vd, 2007).

3. DEFNE BİTKİSİ (*Laurus nobilis* L.) ve ÖZELLİKLERİ

Ülkemiz, aromatik ve tıbbi bitkiler açısından dünyanın en zengin ülkeleri arasındadır. Ülkemizde endemik olarak bulunan birçok bitki türü aromatik ve tıbbi açıdan yüksek değere sahiptir (Baydar, 2009).

Akdeniz bitki örtüsünün görüldüğü bölgelerdeki bitkiler arasından gelir bakımından en yüksek değere sahip bitki olması dikkat çekmektedir. Bitkinin meyvelerinden ve yapraklarından faydalanılması diğer bitkilerden farklı olmasında etkilidir. Akdeniz bölgesinden diğer bitkilerin sadece meyvesinden gelir edilebilmektedir. Defne bitkisi orman yan ürünü kategorisine girmektedir ve bu bitkiden elde edilmekte olan defne sabunu, defne yağı ve defne yaprağı önemli ihracat kaynağı olmakla birlikte dünya ihracatında ülkemizin %95’lik payı bulunmaktadır (129).

Çizelge 3.1. Defne bitkisinin taksonomik sınıflandırması

Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Lurales
Familiya	Lauraceae
Cins	Laurus

Dünyanın önde gelen tüketici ülkeleri olan Amerika Birleşik Devletleri, Almanya, Polonya, Japonya, İngiltere, Fransa, Kanada gibi ülkelere defne ihracatını Türkiye karşılamaktadır. Defne bitkisinin öneminin anlaşılması üzerine artan defne yaprağı talebi üzerine ülkemizin ihracat toplamı 2005 yılından 2020 yılına kadar yaklaşık olarak 3-4 kat artmıştır. 2005 yılında defne yaprağı ihracatından elde edilen gelir 10 milyon dolar seviyesindeyken günümüzde bu değer 40 – 50 milyon dolar bandına yükselmiştir. Ayrıca defne bitkisinden elde edilen yan ürünler ihracat gelirlerine eklendiği zaman ülkemizin defne bitkisinden elde ettiği yıllık gelir 100 milyon doların üzerine çıkmaktadır.



Şekil 3.1. Defne değer zinciri kalkınma raporu (Anonim, 2018)

3.1 Botanik ve Biyokimyasal Özellikleri

Akdeniz Defnesi, Defnegiller (Lauraceae) familyasında bulunan 40 farklı cins arasında en önemlisi olan Laurus cinsine ait olup tropik ve subtropik bölgelerde yetişme göstermektedir. Yapısal olarak genellikle 10 metre yüksekliğe kadar uzama gösterebilen Akdeniz defnesinin tepe kısmı yuvarlak ve sık dallı bir ağaçtır. Gövde rengi siyaha yakın koyu gri olan bu bitkinin kabuk formu düzgün yapıdadır. Yaprak yüzeyi tüysüz olan bu bitkinin genç sürgünleri ilk başlarda yeşil renkte olup sonrasında kırmızı siyah renklerde görülmektedir. Yaprak boyları 5 ila 10 cm arasında değişiklik gösterebilirken şekil olarak eliptik yapıdadır. Yaprakların sap bölgeleri kalın olup kısa ve sağlamdır. Genç yapraklar öncesinde açık kırmızımsı renk gösterirken zamanla koyulaşarak yeşil renge dönmektedirler. Yapraklarında aromatik bir koku bulunduran defne bitkisinin yapraklarının alt kısımlarında küçük demetler halinde çiçekler bulunmaktadır.

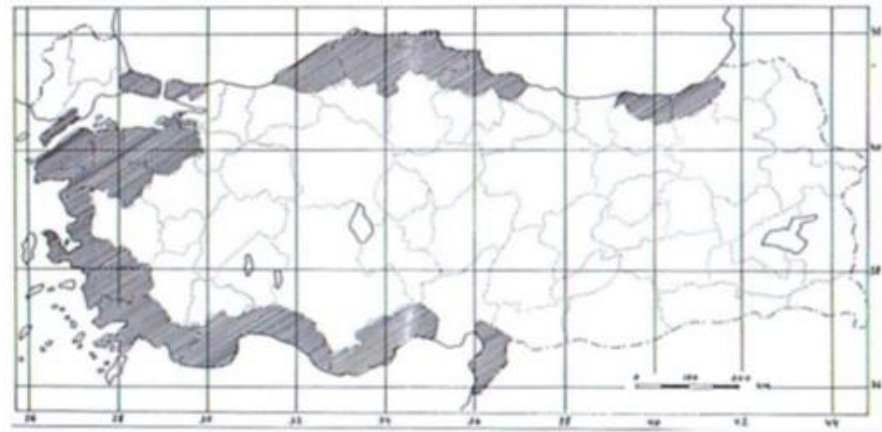
Yapraklarından elde edilen ekstratlarla yapılmış olan fitokimyasal analizlerin sonucunda yapısında uçucu yağlar, flavonoidler, tanenler, alkaloidler, vitaminler ve minerallerin bulunduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen uçucu yağların içeriğinde ise 1-8 sineol, ögenol, linalool ve pinenlerin varlığına rastlanmıştır. Bu uçucu bileşiklerin ise antimikrobiyal, antikanser, ve antifungal etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca yaprağında %0,5 - %4,7 oranında eterik yağ bulunmaktadır ve bulunan bu yağın kalitesi bitkinin yetişmiş olduğu bölgeye göre farklılık gösterebilmektedir.

Yapraklarının yanısıra defne meyveleri de oldukça yüksek değerlerde yağ içermektedir. Meyvelerinden elde edilen yağın içerisinde başlıca %54 oranında lauruik asit, linoleik asit (%17), oleik asit (%15) ve palmitik asit (%5) olmak üzere yağ asitleri bulunmaktadır. Defne meyveleri içerisinde yaklaşık olarak % 0,4 oranında esansiyel yağ içermektedir. Esansiyel yağ içeriğinde ise başlıca 1-8 sineol, β - okimen, bisiklojermakren maddeleri bulunmaktadır.

3.2 Doğal Yayılışı

Defne bitkisi geniş bir alana yayılmış olsa bile esas olarak anavatanı Anadolu'dur. Antik devir olmak üzere geçmiş dönemlerde Anadolu'dan yayılarak Akdeniz'in tüm kıyılarına ulaşmıştır. Günümüzde ise Akdeniz ikliminin göstergesi olarak sayılabilen bir bitki türü olarak karşımıza çıkmaktadır. İspanya, Fransa, Kuzey Afrika başta ve yerli olarak bulunması üzerine Portekiz, Yunanistan Libya gibi ülkelerde de varlığını göstermektedir.

Ülkemizde ise geniş bir yayılım alanına sahip olan defne bitkisi, başta Karadeniz kıyıları olmak üzere Antalya, Mersin, Hatay, İzmir, Muğla ve Bursa'da karşımıza çıkmaktadır. Ülkemiz için defnenin toplam yayılış alanı 131,862 hektar olarak belirlenmiş olup tahmini verim değeri ise 12,201,326 kg/yıl olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Defne bitkisinin Türkiye'de yayılım alanları (Davis, 1970)

3.3 Kullanım Alanları ve Literatür Özeti

Defne bitkisinden elde edilen en önemli ürün yağı ve esansı olmakla birlikte vücut parazitlerini öldürücü ve romatizmal ağrıların dindirilmesi amacıyla merhem haline

getirilerek kullanılmaktadır. Yapraklarının ve meyvelerinin sulu ekstratları bitkisel ilaçların içerisinde ve nörolojik, ürolojik, dermatolojik hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapraklarının bozulmayı önleyici etkisinin olmasından kaynaklı olarak ise gıda sanayisinde koruyucu madde olarak ve çeşitli baklagillerin kurtlanması engellenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Meyvelerden elde edilen yağ şeker hastalığında tedavi amaçlı kullanılmasına karşılık prina yağı ile karıştırılarak defne sabunu elde edilmektedir (Düzenli ve Karaömerlioğlu, 2012).

Defne yapraklarının kurutulmuş hali gıda endüstrisinde başta balık ve et konservelerinde tatlandırıcı ve baharat olarak kullanılmak üzere zeytin depolanmasında, kurutulmuş meyverlerin bozulmasının engellenmesi ve tazeliklerinin korunması amacıyla uygulanmaktadır. Yapraklarından elde edilen esansiyel yağlar temizlik ve parfümeri sektöründe kendisine geniş bir alan bulmuştur.

İçerisinde bulunan esansiyel yağların gram (+) ve gram (-) olmak üzere çeşitli ve geniş mikroorganizma varlığını inhibe etmesi ve antimikrobiyal, antifungal, antiinflamatuvar antioksidan özellik taşıması bilim insanlarının dikkatini çekmiş ve bitki üzerine çalışmaları arttırmıştır. Defne yağının içerisinde bulunan 1,8-sineol ve terpineol bileşikler Quarum Sensing mekanizmasının inhibitörü olarak görev yaparak başta bakteriler olmak üzere çoğu mikroorganizmanın yayılmasını engelleyerek virülens faktör salgılamalarını önlemektedir (TOPUZ ve MADANLAR, 2006).

Conforti ve arkadaşları defne bitkisinin yapraklarından elde edilen esansiyel yağın antioksidan kapasitesini incelemek için 2009 yılında sığır beyrinde çalışma yapmışlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda sığır beyrinde yüksek miktarda antioksidan aktivite belirlenmiştir ve defneden elde edilen esansiyel yağda yüksek antioksidan kapasite belirlenmiştir (Conforti vd, 2006).

2009 yılında El Malti ve H. Amarouch isimli bilim insanlarının yapmış olduğu çalışmada defne bitkisinin yaprağından elde edilen esansiyel yağın oksidatif stres üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan Swiss albinos türü farelerin karaciğerlerine oksidatif stres ile hasar verildikten sonra esansiyel yağ uygulaması gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda ise defne yağının toksik etkiyi azalttığı ve hasarlı olan karaciğerlerin onarıldığı gözlemlenmiştir (El Malti ve Amarouch, 2009).

2019 yılında Duletic-Lausevic ve arkadaşları defne ve fesleğen bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesini incelemek üzere çalışma yapmışlardır. Aktivitenin belirlenebilmesi için yapılan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), toplam indirgeme gücü (TRP) inhibisyon deneyleri sonucunda defne bitkisi ekstraktı yüksek antioksidan aktivite sergilemiştir (Duletić-Laušević vd, 2019).

Defne bitkisinden elde edilen esansiyel yağın antibakteriyel özelliğini araştırmak amacıyla Hussein ve arkadaşlarının hastane enfeksiyonlarında çok etkili rol oynayan bir bakteri türü olan *Staphylococcus aureus* ile *Escherichia coli* üzerinde 2019 yılında bir çalışma yapmıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler ışığında kullanılan esansiyel yağın iki bakteri türünü de inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Hussein vd, 2019).

İnsan metabolizmasında vücudun oksijen kullanımındaki bazı reaksiyonlar sonucunda aktif oksijen formları oluşmaktadır. İnsan sağlığı bakımından antioksidan fonksiyonları ile ön plana çıkan maddeler E ve C vitaminleri, karotenoidler ve fenolik maddelerdir. Defne bitkisi, fenolik maddelerce çok zengin içeriğe sahip bir bitki türüdür.

Günümüzün en büyük sorunlarından olan değişen iklim koşullarına bağlı olarak gerçekleşen kuraklık ve beraberinde getirdiği topraktaki tuzluluk oranının artması bitkilerin yaşam koşullarını etkilemektedir.

Bu çalışmada, sera koşulları altında tuzluluk ve kuraklık stresine maruz bırakılarak yetiştirilen defne bitkilerinde, glutatyon redüktaz (GR), glutatyon s-transferaz (GST), gualikol peroksidaz (GPx), askorbat peroksidaz (APx) antioksidan enzimlerinde meydana gelen aktivite değişiminin belirlenmesi aracılığıyla, bitkilerin stres koşullarına verdiği tepkinin incelenmesi ve olası kuraklık durumunda defne bitkisinin verimi üzerinde etkilerinin anlaşılması hedeflenmektedir.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyal

Bu çalışma stres koşullarının defne bitkisindeki (*Laurus nobilis* L.) enzim aktivite değerlerindeki değişimleri belirlemek amacıyla kontrollü ortamda yürütülmüştür.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan defne bitkileri ve yaprakları

4.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Potasyum fosfat (KH_2PO_4), trihidroksimetilaminometan (TRIS), sodyum klorür (NaCl), etanol, sıvı azot, coomassie brilliant blue G-250, okside glutatyon (GSSG), redükte glutatyon (GSH), Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), hidrojen peroksit (H_2O_2), L-askorbik asit (ASA), gualikol, sodyum hidroksit (NaOH), hidrojen klorür (HCl), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), polivinil prolidin (PVP), sığır serum albumin (BSA) bu tez çalışmasında kullanılmış olan kimyasal maddelerdir.

4.1.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıda yazılan alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Hassas Terazî	: Ohaus-Pioneer
Mini Santrifüj	: Tomos micro santrifüj
Soğutmalı Santrifüj	: Eppendorf Centrifuge 5804R, Thermo SL 16R
pH metre	: Thermo Scientific Orion Star A211
Saf su Cihazı	: Nüve Water Disteller ND12

Spektrofotometre	: Shimadzu UV – 1800
Karıştırıcı (Vorteks)	: Velp Scientific Orion Star A211
Otomatik Pipet	: Gilson, Transferpipette, ISOLAB, Thermo, Eppendorf
Manyetik Karıştırıcı	: Ika Topolino S1
Buzdolabı (+4°C)	: Bosch KSU40623NE
Derin Dondurucu (-20°C)	: Bosch GSV33vW30
Buz Makinası	: Scotsman AF80
EC Metre	: JENWAY 4520
Porometre	: Delta-T AP4
Klorofilmetre	: SPAD-502 Plus

4.1.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Çözeltilerin hazırlanmasında yararlanılan su, deiyonize saf sudur.

4.1.3.1 Tuzluluk Stresinde Kullanılan Çözeltiler

1. 136 mM (10 dS/m) sodyum klorür çözeltisi: 8 g NaCl tartıldıktan sonra 900 ml saf su içerisinde çözöldü. EC metre yardımıyla tuzluluk oranı 10 dS/m değerine ayarlandı ve son hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

4.1.3.2 Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. 1 M 100 ml Tris (pH: 7) tampon çözeltisi: 12.11 g Tris tartıldıktan sonra 90 ml saf suda çözöldü. HCl ile pH'sı 7'ye ayarlandı ve daha sonra saf su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M 100 ml KH₂PO₄ (pH: 7) tampon çözeltisi: 13.60 g KH₂PO₄ tartıldıktan sonra 80 ml saf suda çözöldü. HCl ile pH'sı 7'e ayarlandı ve daha sonra saf su ile son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

3. 100 mM KH₂PO₄, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM PVP (pH: 7.7) 250 ml ezme tampon çözeltisi: 34,02 g KH₂PO₄ tartıldıktan sonra 200 ml su içerisinde çözöldü. NaOH ile pH değeri 7.7'e ayarlandı. 0,0186 g EDTA ve 2,5 g PVP tartılarak KH₂PO₄ çözeltisi içerisinde çözöldü ve pH değeri tekrar 7.7'e ayarlandıktan sonra son hacim 250 ml'ye tamamlandı.

4. 20 mM 10 ml GSH çözeltisi: 0,061 g redükte glutatyon (GSH) alınarak saf suda çözüldü ve son hacim 10 ml'ye tamamlandı.
5. 25 mM 10 ml CDNB çözeltisi: 0,050 g 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) tartılarak bir miktar %95 etanol içerisinde çözüldükten sonra son hacim 10 ml'ye tamamlandı.
6. 50 mM H₂O₂ çözeltisi: 40 µl %35'lik H₂O₂ alınarak saf su ile son hacmi 10 ml'ye tamamlandı.
7. 20 mM H₂O₂ çözeltisi: 10 µl %35'lik H₂O₂ alınarak son hacmi saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.
8. 2 mM 10 ml GSSG çözeltisi: 0,012 g okside glutatyon (GSSG) alınarak saf su içerisinde çözüldü. Son hacim 10 ml'ye tamamlandı.
9. 2 mM 10 ml NADPH çözeltisi: 0,016 g nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) tartılarak saf suda çözüldü ve son hacim 10 ml'ye tamamlandı.
10. 2.5 mM 10 ml ASA çözeltisi: 0,044 g L-askorbik asit tartıldıktan sonra bir miktar saf su içerisinde çözüldü ve son hacim 10 ml'ye tamamlandı.
11. 1 mM 10 ml EDTA çözeltisi: 0,0029 g etilendiamintetraasetikasit (EDTA) tartıldıktan sonra saf suda çözülerek hacmi 10 ml'ye tamamlandı.
12. 100 mM 10 ml Gualikol çözeltisi: 126 µl gualikol alınıp saf suda çözüldü ve son hacim 10 ml'ye tamamlandı.

4.2 Yöntem

4.2.1 Bitki Yetiştirme Yöntemi

Benzer fiziksel özelliklere sahip ve sağlıklı olan defne (*Laurus nobilis* L.) fideleri temin edilerek stres koşullarının uygulanabilmesi için sera ortamında yetiştirilmeye başlanmıştır. Sera şartları 12-15 °C derecenin altına düşmeyecek şekilde ve bağıl nemi %70 - %80 olarak ayarlanmıştır. Stres uygulama işlemine başlamadan önce kuraklık ve tuz stresi uygulanacak olan bitkilerin bulundukları saksıların tarla kapasitesi değerleri belirlenmiştir. Tarla kapasitesi belirlenen saksılar konularına göre haftada iki kere sulanmıştır. Denemede uygulanan konular aşağıda verilmiştir.

1. Kontrol bitkisi (NaCl içermeyen sulama suyu, her sulamada 0,5 litre sulama suyu verilmiştir).
2. Tuz stresi uygulanan bitki (her sulamada 136 mM NaCl çözeltisi içeren sulama suyu verilmiştir).
3. Kuraklık stresi uygulanan bitki (İlk sulamadan sonra sulama yapılmamıştır).

Dört haftalık uygulamanın ardından biyokimyasal analiz için kullanılmak üzere bitkilerden alınan yaprak örnekleri -20 °C içerisinde muhafaza edilmiştir.

4.2.2 Aktivite Tayini için *Laurus nobilis* L.'den Enzimlerin Kısmi Saflaştırılması yöntemi

4.2.2.1 Homojenat Hazırlanması

Çalışmada kullanılan defne bitkisi piyasadan temin edilmiştir. Bitkilerden alınan yaprak numuneleri hassas terazide tartılarak toplam ağırlığı yaklaşık olarak 1 g olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen bu numuneler el yardımıyla küçük parçalara ayrılarak havan içerisinde yerleştirilip üzerine sıvı azot dökülerek yapraklara mekanik parçalama işlemi uygulanmıştır. Mekanik parçalama işlemi numuneler toz haline gelene kadar devam etmiştir. Toz haline gelen örnekler 50 ml'lik tüpe alınıp üzerine 5 ml 0,5 mM EDTA, 0,1 mM PVP, 100 mM KH₂PO₄ (pH 7.7) tamponu ilave edilmiştir. 15.000 G ve +4 °C'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda pastör pipet ve filtre kâğıdı yardımıyla süpernatant kısmı süzülüp başka bir tüpe alınarak homojenat hazırlanmıştır.

4.2.3 Analizler

4.2.3.1 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

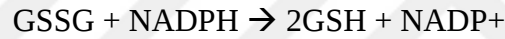
Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki proteinlere bağlanarak değişik renk şiddetinde mavi renkli çözelti oluşturmaya dayanmaktadır. Mavi rengin oluşmasında önemli olan konu proteinin amino asit bileşimidir. G-250 boyasının özellikle arjinin gibi bazik aminoasitlere daha fazla bağlanma eğilimi olduğu görülmüştür. Yöntemde temel olarak alınan olgu normal şartlarda G-250 boyasının 465 nm değerinde maksimum absorbanis değeri verirken protein ile bağlanmasından sonra 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanis vermesidir.

Bu yöntemin kullanılarak protein tayini yapılabilmesi için standart grafik oluşturulması gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda 1ml'sinde 1 mg protein içermekte olan sığır serum albümin (BSA) çözeltisinden 1, 2, 4, 6, 10, 16 µl alınarak tüplere aktarılmıştır. Saf su ile bütün tüplerin hacimleri 100 µl' ye tamamlandıktan sonra üzerlerine 900 µl 1x Bradford çözeltisi eklenerek son hacimleri 1 ml' ye tamamlanmıştır. Vorteks kullanılarak karıştırılan tüpler inkübasyonun gerçekleşmesi için 10 dakika bekletilmiştir. Süre dolduktan sonra ise 595 nm'de anlık ölçümler yapılarak elde edilen sonuçlardan standart grafik haline getirilmiştir.

Numunelerin protein tayini işlemlerinde ise şu prosedür takip edilmiştir:

96 µl saf su, 900 µl Coomassie Brilliant Blue G-250 ve 4 µl homojenat sonucunda elde edilen süpernatant numunelerinden küvete konularak 595 nm'de değerleri anlık olarak okunmuştur. Her numuneden elde edilen değerlere göre standart grafikten yararlanarak protein miktarı belirlenmiştir.

4.2.3.2 Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesinin Tayini



Glutasyon redüktaz enziminin aktivite tayini için iki temel esas bulunmaktadır. İlk olarak reaksiyona giren NADPH maksimum absorbensini 340 nm'de vermektedir. GR enzimi ise reaksiyona girerek NADPH'nin tükenmesine sebep olmaktadır. Bu tükenip azalma olayı spektrofotometrik olarak 340 nm'de gözlemlenebilmektedir (Carlberg ve Mannervik, 1985).

Diğer esas ise ürün olarak ortaya çıkmış olan GSH, 2-nitrobenzoik asit (DTNB) reaksiyona girerek bileşik oluşturmaktadır. Bu reaksiyonun verdiği absorbens değeri ise 412 nm'de takip edilmektedir (Goudsmit vd, 1988).

Glutasyon redüktaz enziminin aktivite tayini Shimadzu UV-1800 spektrofotometre kullanılarak NADPH'nin oksitletmesine bağlı olarak absorbens düşüşü 340 nm'de gözlemlendi. Spektrofotometrik yöntemler, Kinatics rate ayarında 340 nm'de ve 2 dakika boyunca yapıldı. Glutasyon redüktaz enziminin aktivite ölçümü için kontrol ve numune içerikleri Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. GR enzimi aktivite ölçümü için kontrol ve numune küveti içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	100	-
200 mM TRIS Tamponu (pH:7)	500	200 mM	500	200 mM
Homojenat	-	-	200	-
Substrat (GSSG)	100	2 mM	100	2 mM
Substrat (NADPH)	100	2 mM	100	2 mM
Toplam	1000		1000	

4.2.3.2.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

TRIS ve potasyum fosfat (KH_2PO_4) tamponları 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 600 mM ve 800 mM olmak üzere farklı derişiklikleri hazırlanıp spektrofotometrede aktivite ölçümleri yapılmıştır. Tampon optimizasyonu için kullanılan kontrol ve numune küvetleri Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Potasyum fosfat tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	100	-
KH_2PO_4 Tamponu (pH:7)	500	50 mM	500	Değişken
Homojenat	-	-	200	-
Substrat (GSSG)	100	2 mM	100	2 mM
Substrat (NADPH)	100	2 mM	100	2 mM
Toplam	1000		1000	

Çizelge 4.3. TRIS tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	100	-
Tris Tamponu (pH:7)	500	50 mM	500	Değişken
Homojenat	-	-	200	-
Substrat (GSSG)	100	2 mM	100	2 mM
Substrat (NADPH)	100	2 mM	100	2 mM
Toplam	1000		1000	

4.2.3.2.2 Optimum pH değerinin Değerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

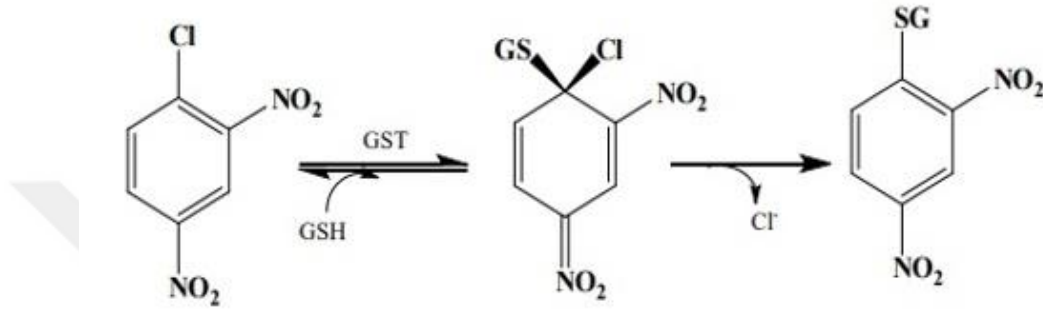
Tampon optimizasyonu sonucunda elde edilen en yüksek aktiviteye sahip tampon konsantrasyonu pH optimizasyonu için kullanılmıştır. TRIS tamponu 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 pH değerlerinde hazırlandı ve aktivite değerleri ölçülmüştür. pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri Çizelge 4.4. gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. TRIS tamponu pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	100	-
Tris (pH değişken)	500	200 mM	500	200 mM
Homojenat	-	-	200	-
Substrat (GSSG)	100	2 mM	100	2 mM
Substrat (NADPH)	100	2 mM	100	2 mM
Toplam	1000		1000	

4.2.3.3 Glutasyon S-transferaz Enzim Aktivitesi Tayini

Glutasyon S-transferaz enzimi glutasyon molekülü ile elektronlara tutunan reaktif olan moleküllerin tepkimelerini katalizlemektedir. Bir elektrofil olan 1-kloro2,4-dinitrobenzen (CDNB) reaksiyona girerek dinitrobenzen 5-glutasyon (DNB-SG) oluşmaktadır. Bu ürün 340 nm’de maksimum absorbansını vermektedir. Bu dalga boyundaki gerçekleşen absorbans artışı GST enziminin aktivitesinin belirlenmesini sağlamaktadır.



Şekil 4.2. Spektrofotometrik olarak GST enziminin aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ürünün oluşum mekanizması (Habdous vd, 2002)

Glutasyon S-transferaz enziminin aktivite tayini Shimadzu UV-1800 spektrofotometre kullanılarak CDNB dönüşümüne bağlı olarak absorbans artışı 340 nm’de gözlemlenmiştir. Spektrofotometrik yöntemler, Kinatics rate ayarında 340 nm’de ve 2 dakika boyunca yapıldı. Glutasyon S-transferaz enziminin aktivite ölçümü için kontrol ve numune içerikleri çizelge de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. GST enzimi aktivite ölçümü için kontrol ve numune küveti içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	100	-
20 mM TRIS Tamponu (pH:7.5)	500	20 mM	650	20 mM
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (GSH)	100	20 mM	100	20 mM
Substrat (CDNB)	100	25 mM	100	25 mM
Toplam	1000		1000	

4.2.3.3.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

TRIS ve potasyum fosfat (KH_2PO_4) tamponları 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 600 mM ve 800 mM olmak üzere farklı derişiklikleri hazırlanıp spektrofotometrede aktivite ölçümleri yapılmıştır. Tampon optimizasyonu için kullanılan kontrol ve numune küvetleri Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Potasyum fosfat tamponu optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	100	-
KH_2PO_4 Tamponu (pH:7)	500	50 mM	650	Değişken
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (GSH)	100	20 mM	100	20 mM
Substrat (CDNB)	100	25 mM	100	25 mM
Toplam	1000		1000	

Çizelge 4.7. TRIS tamponu optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	100	-
Tris Tamponu (pH:7)	500	50 mM	650	Değişken
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (GSH)	100	20 mM	100	20 mM
Substrat (CDNB)	100	25 mM	100	25 mM
Toplam	1000		1000	

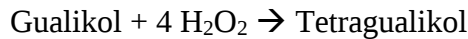
4.2.3.3.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Tampon optimizasyonu sonucunda elde edilen en yüksek aktiviteye sahip tampon konsantrasyonu pH optimizasyonu için kullanılmıştır. TRIS tamponu 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 pH değerlerinde hazırlandı ve aktivite değerleri ölçülmüştür. pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. TRIS tamponu pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Saf Su	300	-	100	-
Tris (pH değişken)	500	20 mM	650	20 mM
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (GSH)	100	20 mM	100	20 mM
Substrat (CDNB)	100	25 mM	100	25 mM
Toplam	1000		1000	

4.2.3.4 Gualikol Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini



Gualikol peroksidaz enziminin aktivitesinin tayini için tetragualikol oluşumu izlenmektedir. 1 mol tetragualikolün oluşması için peroksidaz enzimi 1 mol gualikol ve 4 mol hidrojen peroksit reaksiyonunu gerçekleştirir. Bu tepkime sonucu oluşum olayı 470 nm’ de spektrofotometrik olarak gözlemlenmektedir.

Gualikol peroksidaz enziminin aktivite tayini Shimadzu UV-1800 spektrofotometre kullanılarak gualikol dönüşümüne bağlı olarak absorbans artışı 470 nm’de gözlemlenmiştir. Spektrofotometrik yöntemler, Kinatics rate ayarında 470 nm’de ve 2 dakika boyunca yapılmıştır. Gualikol peroksidaz enziminin aktivite ölçümü için kontrol ve numune içerikleri Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. GPx enzimi aktivite ölçümü için kontrol ve numune küvet içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
200 mM Fosfat Tamponu (pH:6)	600	200 mM	550	200 mM
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (H ₂ O ₂)	200	50 mM	200	50 mM
Substrat (Gualikol)	200	100 mM	200	100 mM
Toplam	1000		1000	

4.2.3.4.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Potasyum fosfat (KH₂PO₄) ve TRIS tamponları 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 600 mM ve 800 mM olmak üzere farklı derişiklikleri hazırlanıp spektrofotometrede aktivite ölçümleri yapılmıştır. Tampon optimizasyonu için kullanılan kontrol ve numune küvetleri Çizelge 4.10. ve 4.11.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Potasyum fosfat tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Potasyum Fosfat Tamponu (pH:7)	600	50 mM	550	Değişken
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (H ₂ O ₂)	200	50 mM	200	50 mM
Substrat (Gualikol)	200	100 mM	200	100 mM
Toplam	1000		1000	

Çizelge 4.11. TRIS tamponu optimizasyonu için kontrol ve küvet içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
TRIS Tamponu (pH:7)	600	50 mM	550	Değişken
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (H ₂ O ₂)	200	50 mM	200	50 mM
Substrat (Gualikol)	200	100 mM	200	100 mM
Toplam	1000		1000	

4.2.3.4.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Tampon optimizasyonu sonucunda elde edilen en yüksek aktiviteye sahip tampon konsantrasyonu pH optimizasyonu için kullanılmıştır. TRIS tamponu 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 pH değerlerinde hazırlandı ve aktivite değerleri ölçülmüştür. pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri Çizelge 4.12.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. Potasyum fosfat tamponu pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
KH ₂ PO ₄ (pH:Değişken)	600	200 mM	550	200 mM
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (H ₂ O ₂)	200	50 mM	200	50 mM
Substrat (Gualikol)	200	100 mM	200	100 mM
Toplam	1000		1000	

4.2.3.5 Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini



Askorbat peroksidaz aktivitesi, askorbat bağımlı hidrojen peroksitin oksidasyonu tepkimesiyle vermiş olduğu absorbans değerinin 290 nm’de ölçülmesiyle tayin edilmektedir. Spektrofotometrik yöntemler, Kinatics rate ayarında 290 nm’de ve 2 dakika boyunca yapılmıştır. Askorbat peroksidaz enziminin aktivite ölçümü için kontrol ve numune içerikleri Çizelge 4.13’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. APx enzimi aktivite ölçümü için kontrol ve numune küvet içeriği

Kontrol Küveti			Numune Küveti	
Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
20 mM TRIS (pH:6)	750	20 mM	700	20 mM
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (H ₂ O ₂)	100	20 mM	100	20 mM
Substrat (ASA)	50	2,5 mM	50	2,5 mM
Substrat (EDTA)	100	1 mM	100	1 mM
Toplam	1000		1000	

4.2.3.5.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

KH₂PO₄ ve TRIS tamponları 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 600 mM ve 800 mM olmak üzere farklı derişiklikleri hazırlanıp spektrofotometrede aktivite ölçümleri yapılmıştır. Tampon optimizasyonu için kullanılan kontrol ve numune küvetleri Çizelge 4.14. ve 4.15.’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. Potasyum fosfat tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Potasyum Fosfat Tamponu (pH:7)	800	50 mM	700	Değişken
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (H ₂ O ₂)	100	20 mM	100	20 mM
Substrat (ASA)	50	2,5 mM	50	2,5 mM
Substrat (EDTA)	100	1 mM	100	1 mM
Toplam	1000		1000	

Çizelge 4.15. TRIS tampon optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
TRIS Tamponu (pH:7)	800	50 mM	700	Değişken
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (H ₂ O ₂)	100	20 mM	100	20 mM
Substrat (ASA)	50	2,5 mM	50	2,5 mM
Substrat (EDTA)	100	1 mM	100	1 mM
Toplam	1000		1000	

4.2.3.5.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

Yapılmış olan tampon optimizasyonu sonucunda elde edilen en yüksek aktiviteye sahip tampon konsantrasyonu pH optimizasyonu için kullanılmıştır. TRIS tamponu 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 pH değerlerinde hazırlandı ve aktivite değerleri

ölçülmüştür. pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içerikleri Çizelge 4.15’te gösterilmiştir.

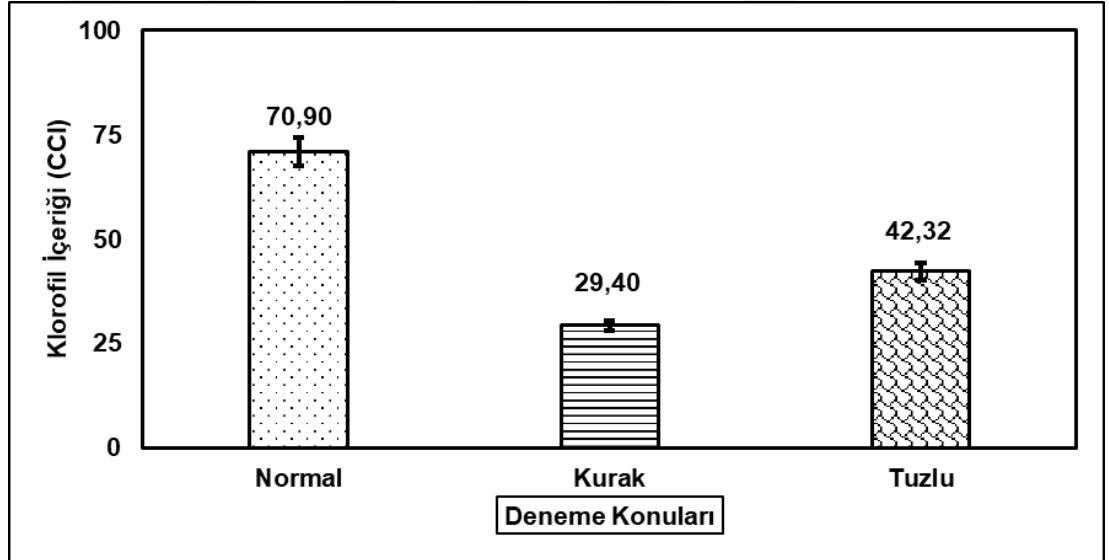
Çizelge 4.16. TRIS tamponu pH optimizasyonu için kontrol ve numune küvet içeriği

Stok aktivite ölçüm çözeltileri	Kontrol Küveti		Numune Küveti	
	Hacim (µl)	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Konsantrasyon
TRIS Tamponu (pH:Değişken)	800	20 mM	700	20 mM
Homojenat	-	-	50	-
Substrat (H ₂ O ₂)	100	20 mM	100	20 mM
Substrat (ASA)	50	2,5 mM	50	2,5 mM
Substrat (EDTA)	100	1 mM	100	1 mM
Toplam	1000		1000	

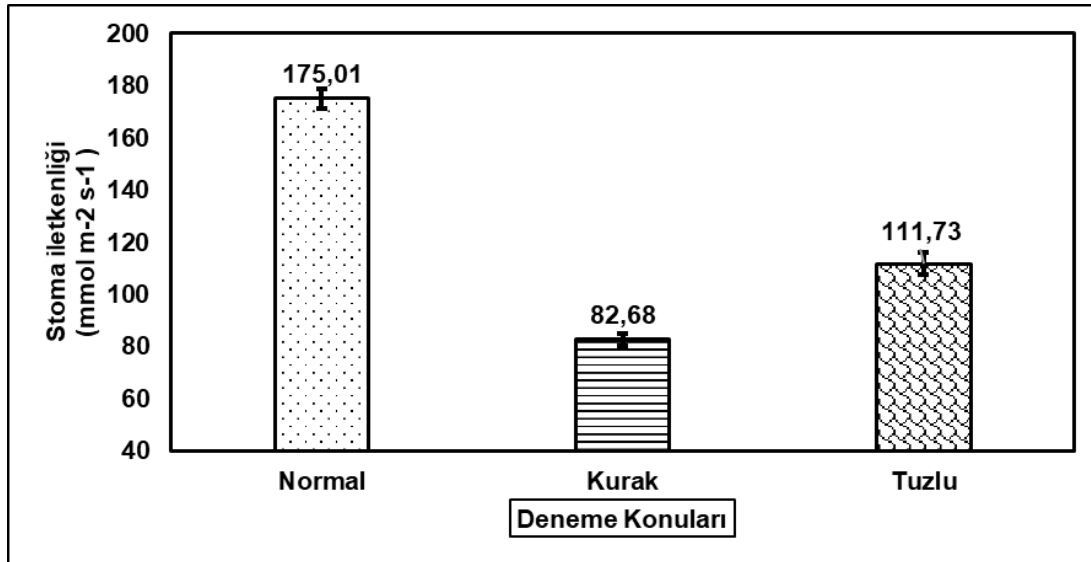
5. BULGULAR

5.1 Tuz ve Kuraklık Stresi Uygulamalarının Klorofil ve Stoma İçeriği Üzerine Etkisi

Stres şartlarının uygulanmasının başlanmasından yaklaşık 1 ay sonra yapılan ölçümler sonucunda kuraklık ve 136 mM tuz (NaCl) uygulamalarının defne bitkisindeki klorofil ve stoma içeriğinin önemli derecede etkilendiği gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında stres uygulanan bitkilerde klorofil ve stoma miktarı arasında önemli fark olduğu gözlemlenmiştir. Stres uygulanan bitkililer kendi içerisinde karşılaştırıldığında ise kuraklık stresi uygulanan bitkide bulunan klorofil ve stoma iletkenliği tuz stresi uygulanan bitkiye göre önemli derecede azaldığı görülmüştür.



Şekil 5.1. Tuz stresi (136 mM NaCl) ve kuraklık stresi uygulamalarının defne bitkisinin yapraklarındaki klorofil içeriğine etkisi.



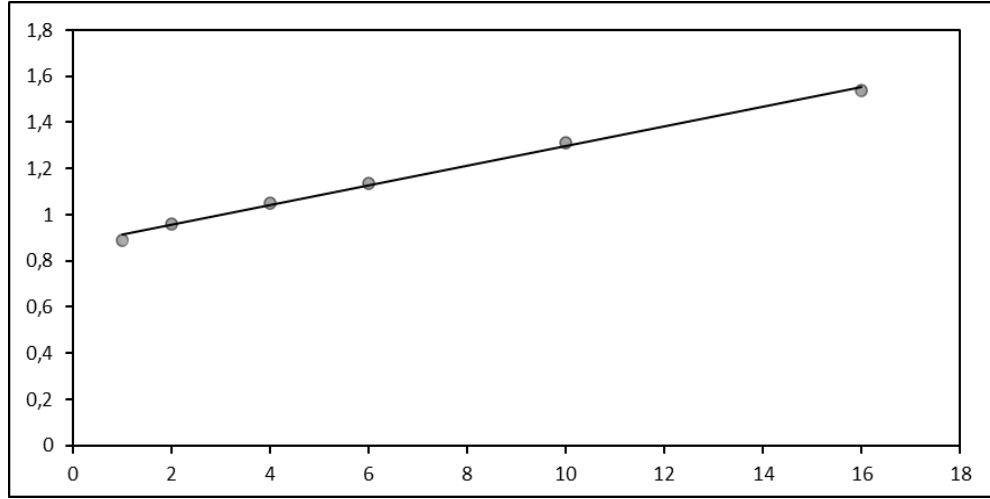
Şekil 5.2. Tuz stresi (136 mM NaCl) ve kuraklık stresi uygulamalarının defne bitkisinin yapraklarındaki stoma içeriğine etkisi.

5.2 Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde edilen süpernatantlardaki kantitatif protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Standart grafik bölüm 4.2.3.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Homojenat sonucu elde edilmiş olan enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulunmuştur. Standart çözeltilerin μg proteine denk gelen absorbans miktarları şekilde gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Bradford analizi sonucunda elde edilen veriler

$\mu\text{g BSA}$	1	2	4	6	10	16
OD595	0,888	0,960	1,052	1,138	1,314	1,538



Şekil 5.3. Proteinlerin kantitatif tayinlerinde kullanılan standart grafik

5.3 Defne Bitkisi Yaprığından Elde Edilen GR Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

5.3.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Defne bitkisi yaprağından GR enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla optimizasyon yapılan TRIS ve KH_2PO_4 tamponlarının değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 4.2.3.2.1.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı TRIS ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler Çizelge 5.2. ve 5.3.'te gösterildi. Yapılan çalışmalar sonucu defne yaprağı GR enzimi için en uygun iyonik şiddetin 200 mM TRIS tamponu olarak tespit edildi.

Çizelge 5.2. Defne bitkisi yaprağında glutatyon redüktaz enziminin optimum iyonik şiddeti için TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	20	40	50	100	200	300	400
%Aktivite	63,33	60,66	64,66	74	100	63,33	61,33

Çizelge 5.3. Defne bitkisi yaprağında glutatyon redüktaz enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	20	40	50	100	200	300	400
%Aktivite	85,71	85,71	100	97,12	87,5	91,07	74,10

5.3.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Defne bitkisi yaprağında glutatyon redüktaz enziminin optimum pH'sı Bölüm 4.2.3.2.2.'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 5.5 – 8.5 aralığında 200 mM Tris tampon çözeltisi kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Elde edilen değerler Çizelge 5.4.'te gösterilmiştir. Defne bitkisi yaprağında glutatyon redüktaz enzimi için optimum pH değeri 200 mM TRIS pH=7 tamponu olarak belirlenmiştir.

Çizelge 5.4. Defne bitkisi yaprağında glutatyon redüktaz enziminin optimum pH değeri için 200 mM TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5
%Aktivite	77,5	78,75	87,5	100	97,5	78,75	88

5.4 Defne Bitkisinin Yaprığından Elde Edilen GST Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

5.4.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Defne bitkisi yaprağında GST enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla optimizasyon yapılan TRIS ve KH_2PO_4 tamponlarının değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 4.2.3.3.1.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı TRIS ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler Çizelge 5.5. ve 5.6.'da gösterildi. Yapılan çalışmalar sonucu defne yaprağı GST enzimi için en uygun iyonik şiddetin 20 mM TRIS tamponu olarak tespit edildi.

Çizelge 5.5. Defne bitkisi yaprağında glutatyon S-transferaz enziminin optimum iyonik şiddeti için TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	20	40	50	100	200	300	400
%Aktivite	100	93,42	97,18	85,68	80,25	78,30	85,25

Çizelge 5.6. Defne bitkisi yaprağında glutatyon S-transferaz enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	20	40	50	100	200	300	400
%Aktivite	76,92	89,63	100	91,63	96,98	99,33	94,64

5.4.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Defne bitkisi yaprağında glutatyon S-transferaz enziminin optimum pH'sı Bölüm 4.2.3.3.2.'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 5.5 – 8.5 aralığında 20 mM TRIS tampon çözeltisi kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Elde edilen değerler Çizelge 5.7.'de gösterilmiştir. Defne bitkisi yaprağında glutatyon S-transferaz enzimi için optimum pH değeri 20 mM TRIS pH=7.5 tamponu olarak belirlenmiştir.

Çizelge 5.7. Defne bitkisi yaprağında glutatyon S-transferaz enziminin optimum pH değeri için 20 mM TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5
%Aktivite	59,61	97,11	69,23	95,19	100	88,30	85,25

5.5 Defne Bitkisi Yaprığından Elde Edilen GPx Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

5.5.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Defne bitkisi yaprağında GPX enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla optimizasyon yapılan TRIS ve KH_2PO_4 tamponlarının değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 4.2.3.4.1.'de anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı TRIS ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler Çizelge 5.8. ve 5.9.'da gösterildi. Yapılan çalışmalar sonucu defne yaprağı GPx enzimi için en uygun iyonik şiddetin 200 mM KH_2PO_4 tamponu olarak tespit edildi.

Çizelge 5.8. Defne bitkisi yaprağında gualikol peroksidaz enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	20	40	50	100	200	300	400
%Aktivite	89,96	92,03	94,90	99,68	100	97,57	93,59

Çizelge 5.9. Defne bitkisi yaprağında gualikol peroksidaz enziminin optimum iyonik şiddeti için TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	20	40	50	100	200	300	400
%Aktivite	95,62	100	97,03	90,31	90,46	88,12	82,18

5.5.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Defne bitkisinin yaprağında gualikol peroksidaz enziminin optimum pH'sı Bölüm 4.2.3.4.2.'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 5.5 – 8.5 aralığında 200 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Elde edilen değerler Çizelge 5.10.'da gösterilmiştir. Defne bitkisinin yaprağında gualikol peroksidaz enzimi için optimum pH değeri 200 mM KH_2PO_4 pH=6 tamponu olarak belirlenmiştir.

Çizelge 5.10. Defne bitkisi yaprağında gualikol peroksidaz enziminin optimum pH değeri için 200 mM KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5
%Aktivite	96,131	100	82,93	63,50	42,42	23,44	13,77

5.6 Defne Bitkisi Yaprağından Elde Edilen APx Enziminin Optimum Şartlarının Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

5.6.1 Optimum İyonik Şiddetin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Defne bitkisinin yaprağında APx enzim aktivitesi için en uygun iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla önceki çalışmalarla optimizasyon yapılan TRIS ve KH_2PO_4 tamponlarının değişik konsantrasyonlardaki çözeltileri Bölüm 4.2.3.5.1.'de

anlatıldığı gibi hazırlandı. Farklı TRIS ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler Çizelge 5.11. ve 5.12.'de gösterildi. Yapılan çalışmalar sonucu defne yaprağı APx enzimi için en uygun iyonik şiddetin 20 mM TRIS tamponu olarak tespit edildi.

Çizelge 5.11. Defne bitkisinin yaprağında askorbat peroksidaz enziminin optimum iyonik şiddeti için KH_2PO_4 tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	20	40	50	100	200	300	400
%Aktivite	100	97,87	97,87	92,55	84,04	87,23	22,34

Çizelge 5.12. Defne bitkisinin yaprağında askorbat peroksidaz enziminin optimum iyonik şiddeti için TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

[mM]	20	40	50	100	200	300	400
%Aktivite	100	82,14	87,5	90,17	83,03	79,46	59,82

5.6.2 Optimum pH Değerinin Belirlenmesine Yönelik Sonuçlar

Defne bitkisinin yaprağında askorbat peroksidaz enziminin optimum pH'sı Bölüm 4.2.3.5.2.'de anlatıldığı şekilde; pH'sı 5.5 – 8.5 aralığında 20 mM TRIS tampon çözeltisi kullanılarak enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Elde edilen değerler Çizelge 5.13.'te gösterilmiştir. Defne bitkisinin yaprağında askorbat peroksidaz enzimi için optimum pH değeri 20 mM TRIS pH=6 tamponu olarak belirlenmiştir.

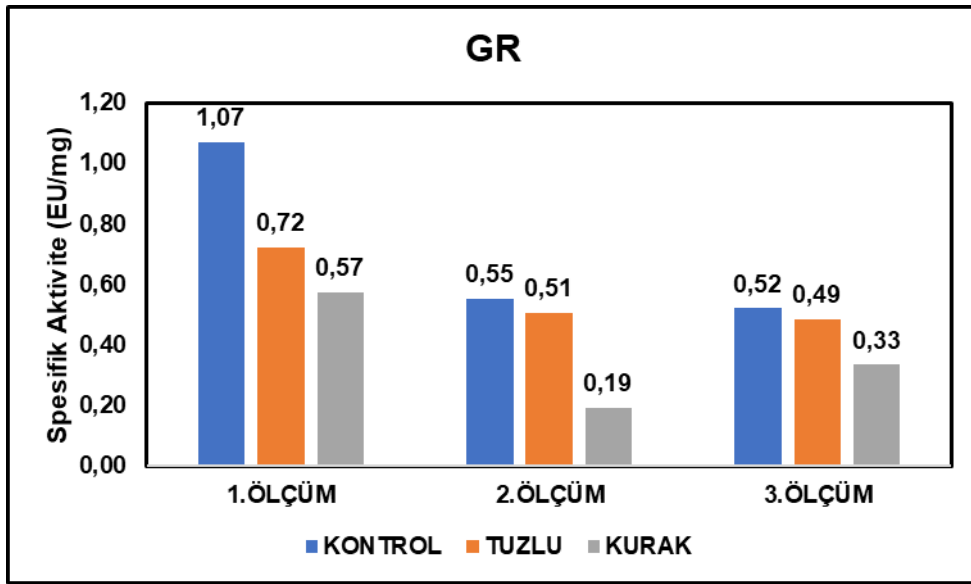
Çizelge 5.13. Defne bitkisi yaprağında askorbat peroksidaz enziminin optimum pH değeri için 20 mM TRIS tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5
%Aktivite	97	100	92,07	84,15	87,12	79,20	53,46

5.7 Tuz ve Kuraklık Stresi Uygulamalarının Defne Bitkisi Yaprığında GR, GST, APx ve GPx Enzimlerinin Aktivitesine Etkilerinin Sonuçları

5.7.1 GR Enzimi Aktivitesine Etkisinin Çalışma Sonuçları

Defne bitkisinin yaprağından elde edilen homojenat ile yapılan çalışmada tuz ve kuraklık stresinin yaprakta bulunan GR enzim aktivitesin üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma şartları bölümünde belirtilen konsantrasyon değerlerinde kinetics rate ayarında 2 dakika süreyle ölçüm olarak şekilde hazırlanmıştır. Araştırma sonucunda elde edilen aktivite değerleri çizelgede gösterilmiştir.



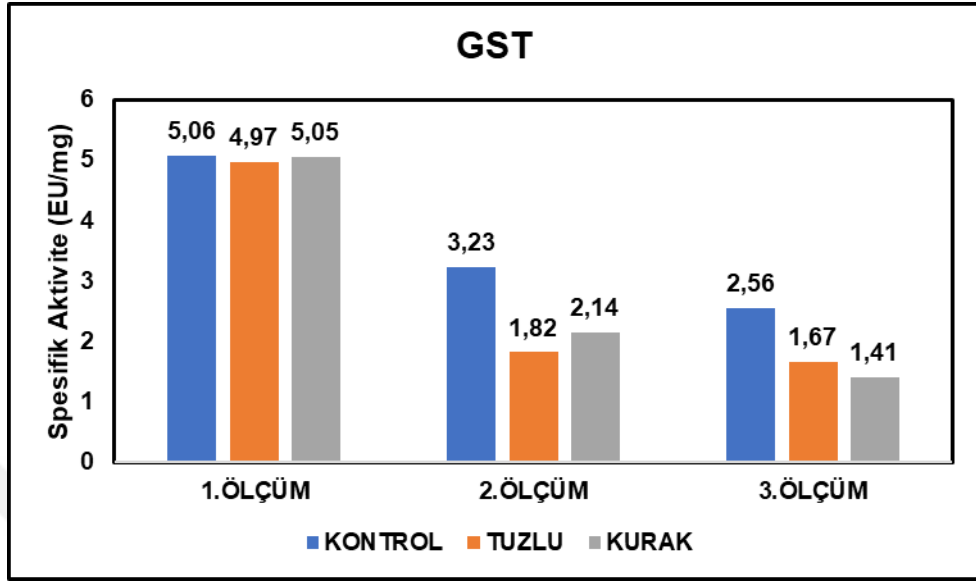
Şekil 5.4. Stres faktörlerinin GR enziminin aktivitesi üzerine etkisi

Elde edilen verilere göre uygulanan stres koşullarının inhibe edici özellikleri GR enzim aktiviteleri arasında her iki uygulamada da farklılıklara neden olduğu görülmüştür. Gösterilen grafikte spesifik aktivite değerlerinden yararlanılmıştır. Elde edilen veriler ışığında kontrol grubuyla farklılık gösteren enzim aktiviteleri stres faktörleri kendi aralarında karşılaştırma yapıldığında da farklılıkların varlığı gözlemlenmiştir. GR aktivitesinin en fazla etkilendiği bitki grubu ise kuraklık stresinin uygulandığı grup olduğu yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuştur.

5.7.2 GST Enzimi Aktivitesine Etkisinin Çalışma Sonuçları

Defne bitkisinin yaprağında stres şartlarının GST enziminin aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği bu çalışma doğrultusunda elde edilen veriler enzim aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. Stres şartlarının kendini göstermeye

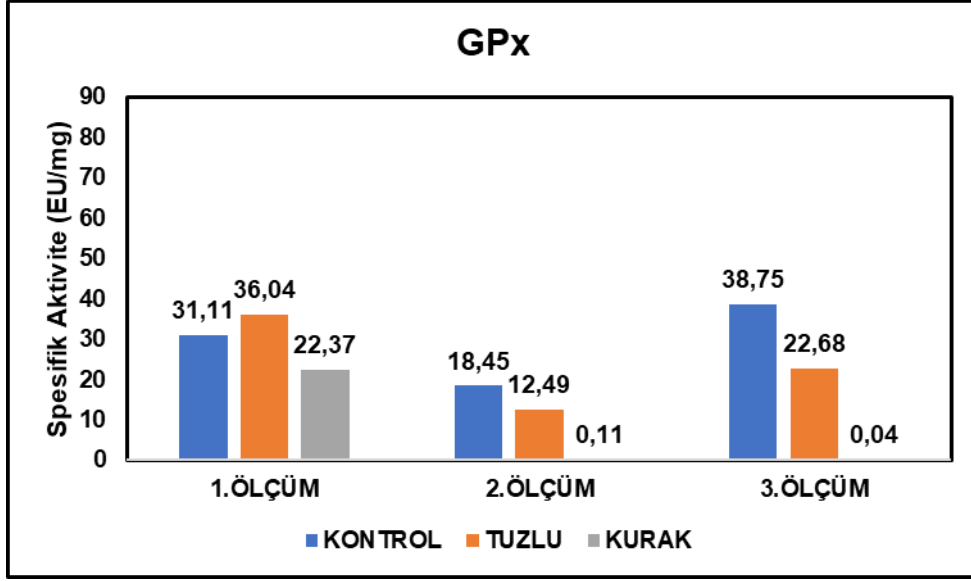
başlamasıyla birlikte bitkinin bu şartlara direnç sağlaması için enzim aktivitesindeki artış ilk ölçümde görülmüştür. Enzim aktivitesinin etkilendiği stres faktörü kuraklık stresi olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 5.5. Stres faktörlerinin GST enziminin aktivitesi üzerine etkisi

5.7.3 GPx Enzimi Aktivitesine Etkisinin Çalışma Sonuçları

Tuz ve kuraklık stresinin GPx enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla stres koşullarına maruz bırakılan bitkilerin yapraklarından numune alınıp bu numunelerden homojenat elde edilmiştir. Elde edilen bu homojenatlardan stresin aktivite üzerine etkisi araştırılmıştır. Yapılan aktivite tayinleri sonucunda elde edilen veriler grafikte detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

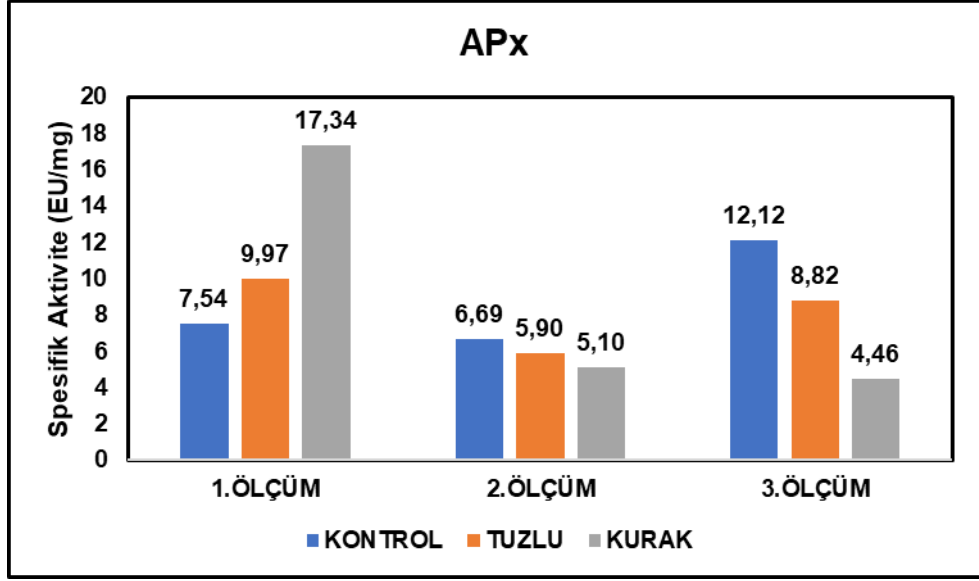


Şekil 5.6. Stres faktörlerinin GPx enziminin aktivitesi üzerine etkisi

Yapılan çalışma sonucunda kuraklık stresinin GPx enzim aktivitesi üzerine büyük etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda tuz stresi uygulanan bitkiden alınan numedeki aktivitede kuraklık stresine oranla daha az olsa bile azalma yaşandığı görülmüştür.

5.7.4 APx Enzimi Aktivitesine Etkisinin Çalışma Sonuçları

Stres uygulanan iki grup ve kontrol grubu olan bitkilerden alınan yaprak numunelerinden elde edilen homojenatlarla yapılan bu çalışmada stres koşullarının etkisi APx enziminin aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda elde edilen veriler grafikte gösterilmiştir.



Şekil 5.7. Stres faktörlerinin APx enziminin aktivitesi üzerine etkisi

Grafikte verilen bilgiler doğrultusunda APx enzim aktivitesi, kuraklık stres koşulunun bitkide kendini göstermesiyle birlikte bitkinin savunma mekanizmasını çalıştırmasına bağlı olarak artış gösterdiği gözlemlenmiştir. İlerleyen haftalarda ise bitkinin daha fazla strese girdiği ve enzimin artık kuraklığı tolere edememesine bağlı olarak aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Tuz stresinde ise aktivitenin belirgin bir şekilde azaldığı bulunmuştur.

6. TARTIŞMA

Defne bitkisi başlıca ekonomik anlamda olmak üzere tıbbi ve aromatik açıdan ülkemiz için önemli bir yer kaplamaktadır. Yaprakları kurutularak ihraç edilen defne bitkisinin koruyucu ve bozulmayı önleyici olması gıda sanayisinde kendisine yer bulmuştur. Ayrıca yapraklarından elde edilen Oleum Lauri esansı parfümeri sektöründe kullanılmaktadır.

Çeşitli stres koşullarının bitki üzerinde stres yaratması sonucunda oluşan serbest radikaller başta lipid peroksidasyonu olmak üzere karbonhidratların ve proteinlerin yapısını bozarak hasar oluşturmaktadır. Ayrıca oluşan serbest radikaller insan sağlığı üzerinde de önemli derecede etkilidirler. Nörolojik rahatsızlıklar olmak üzere, kalp hastalıkları ve kanser oluşumuna neden olmaktadır. Antioksidan sistemler ise serbest radikal oluşumunu ve bu oluşuma bağlı oksidatif stresi ortadan kaldırarak sistemin dengesini korumaktadır.

Literatürde farklı çalışmalarda defne bitkisinden elde edilen yağ ve ekstraktların antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri karşılaştırılmıştır. Ramos vd (2012)'ne ait çalışmada defne bitkisinden elde edilen esansiyel yağ (EO), etanolik ekstrakt (EE) ve sıcak/soğuk sulu ekstrakt (AE) maddelerini karakterize ederek aralarındaki antibakteriyel ve antioksidan aktivitelerinin farklılıklarını araştırmışlardır. Yapraklarından elde edilen esansiyel yağın içerisindeki ana bileşenler okaliptol (%27,2), terpinil asetat (%10,2), linalool (%8,4), metilöjenol (%5,4), sabinen (%4), karvakrol (%3,2) olarak tespit edilmiştir. Bütün gıda kaynaklı bozulmalara ve patojenik bakterilere karşı test edilen ekstraktlar arasında esansiyel yağ en yüksek antibakteriyel aktiviteyi göstermiştir. Ancak etanolik ve sulu ekstraktlara göre esansiyel yağ düşük antioksidan aktivite gösterirken, en yüksek aktiviteyi sıcak sulu ekstrakt göstermiştir. Çalışma sonucunda ise gıdaların korunmasında ve raf ömürlerinin arttırılmasında sentetik gıda koruyucularına alternatif olarak esansiyel yağ ve ekstraktların potansiyel sahibi olduğu bulunmuştur (Ramos vd, 2012).

Başka bir literatür çalışmasında ise defne yapraklarından süperkritik karbondioksit kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilerek elde edilen maddelerin antibakteriyel özellikleri ve antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Santoyo vd (2006)'ne ait olan çalışmada defneden elde edilen iki farklı ekstraktın (F1

ve F2) antioksidan kapasitesi β -karoten ağartama ve DPPH yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca antibakteriyel özellikleri ise *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* mikroorganizmalarında incelenmiştir. Elde edilen veriler ışığında fraksiyonların en fazla etki ettiği bakteri türü *Staphylococcus aureus* olarak bulunmuştur. Antimikobiyal özellik gösteren bileşiğin tanımlanması için etki gösteren fraksiyon GC-MS yöntemi kullanılarak karakterize edilmiştir. Ve sonuç olarak bu bileşiğin daha önce defne bitkisinde tarif edilen seskiterpen olan 6-epi-desasetililürenobiolit isimli bileşik olduğu bulunmuştur (Santoyo vd, 2006).



7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Enzimler, tuz ve kuraklık gibi çeşitli stres faktörleri sonucunda metabolizmada meydana gelen canlının yaşamsal faaliyetlerine etki eden ve metabolik reaksiyonlarını engelleyerek enzim aktivitelerini düşürmekte olan toksik ve yıkıcı etkiye sahip bileşiklerin etkisiz forma dönüştürülmesinde ve canlıları bu stres şartlarına karşı toleranslı konuma getirmekte rol oynamaktadırlar. Canlılarda bu stres faktörlerine karşı savunma mekanizması bulunmaktadır. Bu mekanizma antioksidan sistem olarak isimlendirilmektedir. Sistem içerisinde glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APx), gualikol peroksidaz (GPx) gibi antioksidan özelliğe sahip enzimler bulunmaktadır. Stres faktörlerinin neden olduğu serbest radikal üretimi ve oksidatif stres etkilerini ortadan kaldırarak metabolizmayı denge içerisinde tutmaktadırlar.

Defne bitkisi ise stres koşullarına dayanıklılıyla bilinmekte olup içermiş olduğu antioksidan enzim aktivitesi yüksek bir bitki olarak karşımıza çıkmaktadır. Defne bitkisinin önemli olmasının nedenleri arasında başlıca ülkemizin ekonomisindeki yerinde büyük paya sahip olması gelmektedir. Ayrıca içermiş olduğu bileşiklerin antimikrobiyal, antioksidan özellikleri sağlık ve ilaç sektöründe geniş yer almasında etkilidir.

Bu tez çalışmasında defne bitkisine kuraklık ve tuz stres faktörleri uygulanmıştır. Uygulanan bu stres koşullarının bitki verim parametrelerine (klorofil ve stoma içeriği) etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler ile klorofil ve stoma içeriğini göstermekte olan grafikler oluşturulmuştur. Stres faktörlerinin antioksidan enzim sisteminde bulunan GR, GST, APx, GPx enzimlerinin aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması için bitkilerden alınan yaprak numunelerinde karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları içerisinde optimum iyonik şiddet ve optimum pH değeri belirlenmiştir ve sonrasında aktivite ölçümleri yapılarak tablo halinde eklenmiştir.

Sonuç olarak tez çalışmasında defne bitkisi üzerinde uygulanan farklı stres koşullarının defne bitkisinin verimi üzerine olumsuz etkisi olduğu ve antioksidan sisteminde yer almakta olan GR, GST, GPx ve APx enzimlerinin bu stres koşullarına bitkiyi bir süre tolere edebildikten sonra aktivitelerinde azalma meydana geldiği

bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçların stres faktörlerinin antioksidan enzim sistemindeki bazı enzimlerin ve verim parametrelerinin defne bitkisindeki işlevinin aydınlatılmasına katkıda bulunacağını umuyoruz. Çalışmamızın bundan sonra yapılacak olan defne bitkisi, stres faktörleri ve antioksidan enzimler ile ilgili çalışmalara yardımcı olacağı düşüncesindeyiz.



KAYNAKLAR

- Anonim, 2018. Birleşmiş Milletler Kalkınma Programı Defne Değer Zinciri Araştırma Raporu.
https://www.tr.undp.org/content/turkey/tr/home/library/environment_energy/odun-d_orman-ueruenleri--defne-deer-zinciri-analizi.html (Erişim Tarihi: 11.12.2019)
- Agostini, E., Medina, M. I., Milrad de Forchetti, S. R. and Tigier, H. 1997. Properties of two anionic peroxidase isoenzymes from turnip (*Brassica napus* L.) roots. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45:3, 596-598.
- Alkaladi, A., Afifi, M., Mosleh, Y. Y. and Elbeshehy, E. 2013. Levels of Reduced Glutathione in Erythrocyte of different Arabian camel (*Camelus dromedaries*) Breeds. *Life Science Journal*, 10:4.
- Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Appenzeller-Herzog, C. 2011. Glutathione-and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science*, 124:6, 847-855.
- Armstrong, R. N. 1994. Glutathione S-transferases: structure and mechanism of an archetypical detoxication enzyme. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 69, 1-44.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85:2, 235-241.
- Aydemir, B. and SARI, E. K. 2009. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2:2, 56-60.
- Aydin, S. S., Gökçe, E., Büyük, İ. and Aras, S. 2012. Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 746:1, 49-55.
- Bartonek-Roxå, E., Eriksson, H. and Mattiasson, B. 1991. The cDNA sequence of a neutral horseradish peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1088:2, 245-250.
- Baydar, H. 2009. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi (Genişletilmiş 3. Baskı). *SDÜ Yayınları*:51, 194-212.
- Benson, A. M., Talalay, P., Keen, J. H. and Jakoby, W. B. 1977. Relationship between the soluble glutathione-dependent delta 5-3-ketosteroid isomerase and the glutathione S-transferases of the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74:1, 158-162.

- Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272:33, 20313-20316.
- Bhargava, S. and Sawant, K. 2013. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, 132:1, 21-32.
- Bucciarelli, T., Sacchetta, P., Pennelli, A., Cornelio, L., Romagnoli, R., Melino, S., Petruzzelli, R. and Di Ilio, C. 1999. Characterization of toad liver glutathione transferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1431:1, 189-198.
- Bushnell, D. A., Westover, K. D., Davis, R. E. and Kornberg, R. D. 2004. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocystal at 4.5 Angstroms. *Science*, 303:5660, 983-988.
- Büyük, İ., SOYDAM-AYDIN, S. and Aras, S. 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69:2.
- Cabello, J. V., Lodeyro, A. F. and Zurbriggen, M. D. 2014. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 62-70.
- Carlberg, I. and Mannervik, B. 1985. *Methods in enzymology*. Elsevier, 484-490.
- CIFTCI, M., KÜFREVİOĞLU, Ö. I., GÜNDOĞDU, M. and ÖZMEN, I. 2000. Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological research*, 41:1, 107-111.
- Conforti, F., Statti, G., Uzunov, D. and Menichini, F. 2006. Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) coutinho seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29:10, 2056-2064.
- Cuesta, S. M., Rahman, S. A., Furnham, N. and Thornton, J. M. 2015. The classification and evolution of enzyme function. *Biophysical journal*, 109:6, 1082-1086.
- Davis, P. H. 1970. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3*.
- de Lamotte, F., Vianey-Liaud, N., Duviau, M.-P. and Kobrehel, K. 2000. Glutathione reductase in wheat grain. 1. Isolation and characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48:10, 4978-4983.
- De Simone, A., Aprile, F. A., Dhulesia, A., Dobson, C. M. and Vendruscolo, M. 2015. Structure of a low-population intermediate state in the release of an enzyme product. *Elife*, 4, e02777.
- Demiral, T. 2003. Genç pirinç fidelerine dışarıdan glisinbetain uygulanmasıyla tuza (NaCl) toleransının artırılmasında antioksidan enzim aktivitesinin rolünün

araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 72s

Ding, Y., Tao, Y. and Zhu, C. 2013. Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. *Journal of experimental botany*, 64:11, 3077-3086.

Diplock, A. 1998. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*, 59.

Dixon, D. P., Laphorn, A. and Edwards, R. 2002. Plant glutathione transferases. *Genome biology*, 3:3, reviews3004. 3001.

Doerge, D. R., Divi, R. L. and Churchwell, M. I. 1997. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Analytical biochemistry*, 250:1, 10-17.

Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B., Regalado, C. and Whitaker, J. R. 2000. Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* DC) Peroxidases. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48:5, 1574-1579.

Duletić-Laušević, S., Oalđe, M. and Aradski, A. A. 2019. In vitro evaluation of antioxidant, antineurodegenerative and antidiabetic activities of *Ocimum basilicum* L., *Laurus nobilis* L. leaves and *Citrus reticulata* Blanco peel extracts. *Lekovite Sirovine*, 39, 60-68.

Dündar, Y. 1999. Aslan R. *Hücre moleküler statüsünün araştırılması ve fizyolojik önem açısından radikaller-antioksidanlar*. *Cer Tıp Bil Derg*, 134-142.

Düzenli, A. and Karaömerlioğlu, D. 2012. *Türkiyede Defne ve Defnecilik Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü* ISBN: 978-605-4610-10-5: Ankara.

El Malti, J. and Amarouch, H. 2009. Antibacterial effect, histological impact and oxidative stress studies from *Laurus nobilis* extract. *Journal of food quality*, 32:2, 190-208.

Fraire-Velázquez, S., Rodríguez-Guerra, R. and Sánchez-Calderón, L. 2011. Abiotic and biotic stress response crosstalk in plants. *Abiotic Stress Response in Plants—Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*, 3-26.

Fry, S. C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual review of plant physiology*, 37:1, 165-186.

Gallie, D. R. 2013. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of experimental botany*, 64:2, 433-443.

Genga, A., Mattana, M., Coraggio, I., Locatelli, F., Piffanelli, P. and Consonni, R. 2011. Plant Metabolomics: A characterisation of plant responses to abiotic

stresses. *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations. Rijeka: InTech*, 309-350.

- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., Pereira, E. and Tuteja, N. 2013. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 204-212.
- Goudsmit, J., Debouck, C., Meloen, R. H., Smit, L., Bakker, M., Asher, D. M., Wolff, A. V., Gibbs, C. J. and Gajdusek, D. C. 1988. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85:12, 4478-4482.
- Guimero, A., Badyal, S. K., Leeks, T., Moody, P. C. and Raven, E. L. 2013. Probing the conformational mobility of the active site of a heme peroxidase. *Dalton Transactions*, 42:9, 3170-3175.
- Gupta, R. K., Patel, A. K., Shah, N., Choudhary, A. K., Jha, U. K., Yadav, U. C., Gupta, P. K. and Pakuwal, U. 2014. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15:11, 4405-4409.
- Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Koksall, Z., Turkan, F., Çetinkaya, S., Bingöl, Z., Huyut, Z. and Alwasel, S. H. 2016. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31:6, 1698-1702.
- Habdous, M., Vincent-Viry, M., Visvikis, S., & Siest, G. (2002). Rapid spectrophotometric method for serum glutathione S-transferases activity. *Clinica Chimica Acta*, 326(1-2), 131-142.
- Halliwell, B. 1984. Oxygen radicals: a commonsense look at their nature and medical importance. *Medical biology*, 62:2, 71.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141:2, 312-322.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 246:2, 501-514.
- Harbinson, J. and Hedley, C. L. 1993. Changes in P-700 oxidation during the early stages of the induction of photosynthesis. *Plant physiology*, 103:2, 649-660.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R. 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88.

- Herbette, S., Roeckel-Drevet, P. and Drevet, J. R. 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases: More than simple antioxidant scavengers. *The FEBS journal*, 274:9, 2163-2180.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. and Matsui, H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42:5, 462-468.
- Hong, C.-Y., Chao, Y.-Y., Yang, M.-Y., Cheng, S.-Y., Cho, S.-C. and Kao, C. H. 2009. NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid. *Plant and soil*, 320:1-2, 103-115.
- Hopkins, F. G. and Elliott, K. A. C. 1931. The relation of glutathione to cell respiration with special reference to hepatic tissue. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 109:760, 58-88.
- Hu, Y. and Schmidhalter, U. 2005. Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168:4, 541-549.
- Huang, Q., Liang, L., Wei, T., Zhang, D. and Zeng, Q.-Y. 2008. Purification and partial characterization of glutathione transferase from the teleost *Monopterus albus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147:1, 96-100.
- Hussein, N. N., Marzoog, T. R. and Al-Niaame, A. E. 2019. The Antibacterial, Antiheamolytic, and Antioxidant Activities of *Laurus nobilis* and *Alhagi maurorum* Native to Iraq. *Baghdad Science Journal*, 16:3 Supplement, 707-712.
- Iribarne, F., Paulino, M. and Tapia, O. 2000. Hydride-transfer transition structure as a possible unifying redox step for describing the branched mechanism of glutathione reductase. Molecular-electronic antecedents. *Theoretical Chemistry Accounts*, 103:6, 451-462.
- Jaleel, C. A., Gopi, R., Manivannan, P., Gomathinayagam, M., Murali, P. and Panneerselvam, R. 2008. Soil applied propiconazole alleviates the impact of salinity on *Catharanthus roseus* by improving antioxidant status. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90:2, 135-139.
- Jowsey, I. R., Thomson, A. M., Flanagan, J. U., Murdock, P. R., Moore, G. B., Meyer, D. J., Murphy, G. J., Smith, S. A. and Hayes, J. D. 2001. Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D2 synthases. *Biochemical Journal*, 359:3, 507-516.
- Jung, S. 2004. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. *Plant Science*, 166:2, 459-466.
- Kamerbeek, N. M., van Zwieten, R., de Boer, M., Morren, G., Vuil, H., Bannink, N., Lincke, C., Dolman, K. M., Becker, K. and Heiner Schirmer, R. 2007.

- Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood*, 109:8, 3560-3566.
- Kang, H. M. and Saltveit, M. E. 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia Plantarum*, 115:4, 571-576.
- Karacif, E. 2012. Erwinia amylovora enfeksiyonundan sonra elma ve armut çeşitlerindeki bazı antioksidatif enzim seviyelerinin belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Kelly, G. 1979. Soluble ascorbate peroxidase. Detection in plants and use in vitamin C estimation.
- Ketterer, B., Meyer, D., Taylor, J., Pemble, S., Coles, B. and Fraser, G. 1990. GSTs and protection against oxidative stress. *Glutathione S-transferase and drug resistance*. London: Taylor and Frances, 109.
- Kılınç, K. 2002. Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33:2, 110-118.
- Kuchel, P. and Ralston, G. 1988. Theory and Problems of Biochemistry. Schaum's Outline: McGraw-Hill New York:.
- Kumar, R., Goswami, S., Kumar, N., Pandey, S., Pandey, V., Sharma, S., Pathak, H. and Rai, R. 2011. Expression of novel ascorbate peroxidase isoenzymes of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to heat stress. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3:11, 188-194.
- Kurland, I. J. and Pilgis, S. J. 1995. Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme. *Protein Science*, 4:6, 1023-1037.
- Lamb, C. and Dixon, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology*, 48:1, 251-275.
- Lee, D. H. and Lee, C. B. 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science*, 159:1, 75-85.
- Lushchak, V. I. 2012. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of amino acids*, 2012.
- Mann, P. J. G. 1932. The reduction of glutathione by a liver system. *Biochemical Journal*, 26:3, 785.
- Mannervik, B. 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 57, 357-417.
- Mapson, L. and Goddard, D. 1951. The reduction of glutathione by plant tissues. *Biochemical Journal*, 49:5, 592.

- Mapson, L. and Isherwood, F. 1963. Glutathione reductase from germinated peas. *Biochemical Journal*, 86:1, 173.
- Martinek, R. 1969. Practical clinical enzymology. *J. Am. Med. Tech*, 31:162, 2005-2007.
- McCord, J. M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 108:8, 652-659.
- Meister, A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*, 263:33, 17205-17208.
- Meldrum, N. U. and Tarr, H. L. A. 1935. The reduction of glutathione by the Warburg-Christian system. *Biochemical Journal*, 29:1, 108.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7:9, 405-410.
- Mittler, R. and Zilinskas, B. 1992. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 267:30, 21802-21807.
- Mora, D. and Arioli, S. 2014. Microbial urease in health and disease. *PLoS pathogens*, 10:12.
- Morohashi, Y. 2002. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of experimental botany*, 53:374, 1643-1650.
- Murphy, E. J., Metcalfe, C. L., Nnamchi, C., Moody, P. C. and Raven, E. L. 2012. Crystal structure of guaiacol and phenol bound to a heme peroxidase. *The FEBS journal*, 279:9, 1632-1639.
- Navarro, A. and Boveris, A. 2004. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287:5, R1244-R1249.
- Nawar, W. 1996. Lipids in food chemistry. *Food chemistry*, 3, 308-310.
- Nelson, D. and Cox, M. 2013. Amino acid oxidation and the production of urea (pathways of amino acid degradation). *Lehninger Principles of Biochemistry*: New York: WH Freeman and Company.
- Noctor, G. and Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49:1, 249-279.
- Onsa, G. H., bin Saari, N., Selamat, J. and Bakar, J. 2004. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food chemistry*, 85:3, 365-376.

- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K. and Tran, L.-S. P. 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*, 5, 86.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A. and Deemer, E. K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50:11, 3122-3128.
- Önenç, S. S. and Açıkgöz, Z. 2005. Aromatik bitkilerin hayvansal ürünlerde antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 46:1.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. and Yönden, Z. 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6:3, 331-336.
- Payen, A. and Persoz, J. F. 1833. Memoir on diastase, the principal products of its reactions, and their applications to the industrial arts. *Ann. Chim. Phys*, 53, 73-92.
- Pham-Huy, L. A., He, H. and Pham-Huy, C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4:2, 89.
- Queiroz, C., Alonso, A., Mares-Guia, M. and Magalhaes, A. 1998. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biologia Plantarum*, 41:3, 403-413.
- Radzicka, A. and Wolfenden, R. 1995. A proficient enzyme. *Science*, 267:5194, 90-93.
- Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N., Nogueira, J., Nunes, M. and Marques, A. 2012. Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural product research*, 26:6, 518-529.
- Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., Neufeind, T., Huber, R., Zettl, R., Palme, K., Schell, J., Koelln, I. and Bartunik, H. D. 1996. Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *Journal of molecular biology*, 255:2, 289-309.
- Romero-Puertas, M. C., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Leterrier, M., Rodríguez-Serrano, M., Del Río, L. A. and Palma, J. M. 2006. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New phytologist*, 170:1, 43-52.
- Santoyo, S., Lloria, R., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. and Reglero, G. 2006. Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization. *European Food Research and Technology*, 222:5-6, 565.

- Scandalios, J. G., Foyer, C. and Mullineaux, P. 1994. Regulation and properties of plant catalases. *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, 275-315.
- Schulze, E. 2005. Stress Physiology In: Schulze ED, Beck E, Müller-Hohenstein K, editors. *Plant Ecology*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 5-250.
- Seah, T. C. M. and Kaplan, J. G. 1973. Purification and properties of the catalase of bakers' yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 248:8, 2889-2893.
- Sherratt, P. J. and Hayes, J. D. 2002. Glutathione S-transferases. *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*, 319-352.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. and Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of experimental botany*, 53:372, 1305-1319.
- Shinde, A., Ganu, J. and Naik, P. 2012. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. *Journal of Dental and Allied Sciences*, 1:2, 63.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany*, 58:2, 221-227.
- Singh, S. V., Leal, T., Ansari, G. and Awasthi, Y. C. 1987. Purification and characterization of glutathione S-transferases of human kidney. *Biochemical Journal*, 246:1, 179-186.
- Sorescu, D. and Griendling, K. K. 2002. Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD (P) H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congestive Heart Failure*, 8:3, 132-140.
- Takahashi, Y., Campbell, E., Hirata, Y., Takayama, T. and Listowsky, I. 1993. A basis for differentiating among the multiple human Mu-glutathione S-transferases and molecular cloning of brain GSTM5. *Journal of Biological Chemistry*, 268:12, 8893-8898.
- Tandoğan, B. and Ulus, N. N. 2007. The inhibition kinetics of yeast glutathione reductase by some metal ions. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 22:4, 489-495.
- TOPUZ, E. and MADANLAR, N. 2006. BİTKİSEL KÖKENLİ ETERİK YAĞLAR VE ZARARLILARA KARŞI KULLANIM OLANAKLARI. *Derim*, 23:2, 54-66.
- Townsend, D. M. and Tew, K. D. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22:47, 7369-7375.
- Townsend, D. M., Tew, K. D. and Tapiero, H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57:3-4, 145-155.

- Tunç, T., Koç, Y., Açıık, L., Karacan, M. S. and Karacan, N. 2015. DNA cleavage, antimicrobial studies and a DFT-based QSAR study of new antimony (III) complexes as glutathione reductase inhibitor. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 1418-1427.
- Ulus, G., Erat, M., ÇİFTÇİ, M., ŞAKİROĞLU, H. and Bakan, E. 2005. Purification and characterization of glutathione reductase from sheep liver. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29:5, 1109-1117.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39:1, 44-84.
- Van Breusegem, F. and Dat, J. F. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant physiology*, 141:2, 384-390.
- van Doorn, W. G. and Ketsa, S. 2014. Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. *Postharvest biology and technology*, 95, 64-69.
- Wilce, M. C. and Parker, M. W. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1205:1, 1-18.
- Wilson, K. and Walker, J. 2010. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge university press,
- Wrzaczek, M., Vainonen, J. P., Gauthier, A., Overmyer, K. and Kangasjärvi, J. 2011. Reactive oxygen in abiotic stress perception-from genes to proteins. *Abiotic Stress Response in Plants*, eds A. Shanker and B. Venkateswarlu (Rijeka: InTech), 27-55.
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R. and Turner, N. D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, 134:3, 489-492.
- Yakes, F. M. and Van Houten, B. 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94:2, 514-519.
- Yu, S. 2004. Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80:2, 113-122.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mutlu YALÇIN

Doğum Yeri : KONAK

Doğum Tarihi : 16.06.1992

Yabancı Dili : İngilizce

E-Posta : mutluyalcin.26@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Turgut Reis Anadolu Teknik Lisesi / 2010 / ESKİŞEHİR

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 2018

Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 2020

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Mutlu YALÇIN, Deniz EKİNCİ *Effect of Drought Stress on Glutathione S-Transferase Activity of Watermelon Juice*, II. International Green Biotechnology Congress, 9-11,2019 , İstanbul