

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Eremurus spectabilis* Bieb., *Silene chlorifolia* Sm. ve *Plumbago europaea* L.' nin ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burak BİRCAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sevda KIRBAĞ

ELAZIĞ – 2011

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eremurus spectabilis Bieb., *Silene chlorifolia* Sm. ve *Plumbago europaea*
L.' nin ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burak BİRCAN

(091110102)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 13 Haziran 2011

Tezin Savunulduğu Tarih : 29 Haziran 2011

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevda KIRBAĞ (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ (F.Ü)

Doç. Dr. Mustafa KARATEPE (F.Ü)

HAZİRAN-2011

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana destek olan ve tez çalışmamı yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Sevda KIRBAĞ' a, arazi çalışmaları ve sistematik tanımlama sırasında yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Şemsettin CİVELEK' e çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ ile diğer Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine, tez çalışmalarım sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Yavuz ERDEN' e yüksek lisans çalışmamın 2119 no' lu proje ile mali desteğini sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi' ne (FÜBAP) ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Burak BİRCAN
ELAZIĞ – 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar LİSTESİ	IX
SEMBOLLER LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller	1
1.1.1. Süperoksit Radikali.....	2
1.1.2. Hidrojen Peroksit	2
1.1.3. Hidroksil Radikali.....	4
1.1.4. Singlet Oksijen.....	4
1.1.5. Nitrik Oksit	5
1.2. Oksidatif Stres	5
1.3. Antioksidanlar.....	7
1.4. Antimikrobiyal Aktivite.....	9
1.5. Literatür Özeti.....	10
2. MATERYAL ve METOT	13
2.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler	13
2.2. Kullanılan Cihazlar	13
2.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri	13
2.4. Çalışmalarda Kullanılan Test Mikroorganizmaları	14
2.5. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	14
2.6. Resveratrol ve Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi	14
2.7. Şeker Analizi	15
2.8. Bitki Örneklerinin ADEK Vitaminleri ve Fitosterol Miktarının HPLC Cihazı ile Analizi	15
2.9. Serbest Radikal (DPPH) Giderme Aktivitesi	15

2.10.	<i>In vitro</i> Ortamda Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi.....	16
2.10.1	<i>In vitro</i> Ortamda Lipid Peroksidasyon (LPO) Ölçümü	17
2.10.2	<i>In vitro</i> Ortamda Yağ Asidi Miktarının Belirlenmesi.....	17
2.11.	Antimikrobiyal Aktivite.....	18
2.11.1.	Ekstrelerin Hazırlanışı	18
2.11.2.	Mikroorganizma Kùltürlerinin Hazırlanması ve Aşılama	18
2.11.3.	Oyuk Agar Metodu	18
2.12.	Mayaların Gelişme Ortamında Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi.....	19
2.12.1.	Maya Hücrelerinde Glutasyon Miktarının Ölçülmesi.....	19
2.12.2.	Glutasyon Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	20
2.12.3.	Maya Hücrelerinde Total Protein Miktarının Ölçülmesi.....	21
2.12.4.	Protein Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması.....	21
2.12.5.	Maya Kùltürü Lipid peroksidasyon Miktarının Ölçülmesi	22
2.12.6.	Maya Kùltürü Lipidlerin Ekstraksiyonu	22
2.12.7.	Maya Kùltürü Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması.....	22
2.12.8.	Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz kromatografik Analizi.....	23
2.13.	SDS-PAGE Analizleri	23
2.14.	İstatistik Analizi.....	25
3.	BULGULAR.....	26
3.1.	Bitki Örneklerinin Resveratrol ve Flavonoid İçeriğı	26
3.2.	Bitki Örneklerinin Şeker İçerikleri	26
3.3.	Bitki Örneklerinin Fitosterol ve Adek Vitaminleri İçeriğı	27
3.4.	Bitki Örneklerinin DPPH Radikalini Giderme Aktivitesi	28
3.5.	Bitki Örneklerinin <i>In vitro</i> Ortamda ki Antioksidan Etkileri	29
3.6.	Bitki Ekstraktlarının <i>In vitro</i> Ortamda ki Yağ Asidi Metil Esterleri Üzerine Etkileri.....	29
3.7.	Bitki Ekstraktlarının <i>S. cerevisiae</i> ' da ki Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri.....	30
3.8.	Bitki Ekstraktlarının <i>S. cerevisiae</i> ' nın Yağ Asidi İçeriğı Üzerine Etkisi.....	31

3.9.	Bitki Ekstraktlarının <i>S. cerevisiae</i> ' nin Glutasyon Miktarı Üzerine Etkisi	33
3.10.	Bitki Ekstraktlarının <i>S. cerevisiae</i> ' da ki Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi	33
3.11.	<i>S. cerevisiae</i> ' nin SDS-Page Analizi	35
3.12.	Bitki Ekstraktlarının <i>K. lactis</i> ' in Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri	35
3.13.	Bitki Ekstraktlarının <i>K. lactis</i> ' in Yağ Asidi İçeriği Üzerine Etkisi	36
3.14.	Bitki Ekstraktlarının <i>K. lactis</i> ' in Glutasyon Miktarı Üzerine Etkisi.....	38
3.15.	Bitki Ekstraktlarının <i>K. lactis</i> ' in Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi	39
3.17.	Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi	41
4.	TARTIŞMA	42
5.	KAYNAKLAR	50
	ÖZGEÇMİŞ	62

ÖZET

Bu çalışmada, Elazığ ili ve çevresinden toplanan *Eremurus spectabilis* Bieb., *Silene chlorifolia* Sm. ve *Plumbago europaea* L. bitki ekstraktlarının *in vitro* antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, *Saccharomyces cerevisiae* ile *Kluyveromyces lactis* bulunan kültür ortamında ise sadece antioksidan etkileri araştırıldı. Çalışmada DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi, flavonoid, resveretrol ve şeker içerikleri, lipit peroksidasyon (LPO), yağ asidi düzeyi, lipofilik vitamin değerleri, protein ve glutatyon miktarları ölçüldü. Bu amaçla Kontrol, Fenton reaktifi (FR) ve bitki ekstraktlarını içeren gruplar ile bunların kombinasyonları kullanıldı. Antimikrobiyal aktivite çalışmaları *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Epidermophyton sp.*, *Candida albicans* üzerinde belirlendi.

Sonuçlara göre, *in vitro* ortamda FR grubunda LPO düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek miktarlarda arttığı ($p<0.0001$), bitki ekstası ve FR içeren gruplarda ki LPO seviyelerinin belirli oranlarda azaldığı görüldü. Bitki ekstraktlarının LPO seviyesini düşürücü etkisinin içeriğindeki flavonoid gibi fitokimyasallardan ileri geldiği belirlendi.

S. cerevisiae ve *K. lactis* üzerindeki çalışmalarda, protein, glutatyon ve yağ asidi düzeylerinin ekstrakt ve FR ilavesinden etkilendiği belirlendi. *S. cerevisiae* ve *K. lactis*' in yağ asit bileşimi içinde FR ve bitki ekstraktlarının etkisiyle palmitik, palmitoleik, stearik, oleik linolenik ve linoleik asitlerin miktarlarında kontrol grubuna göre farklı oranlarda artış olduğu saptandı ($p<0.0001$, $p>0.005$). Ayrıca bitki ekstası ilavesinin *S. cerevisiae*' de glutatyon miktarını azalttığı, *K. lactis*' de ise belirgin miktarda arttırdığı tespit edildi ($p<0.0001$, $p<0.001$).

Bitki ekstraktlarının değişen oranlarda antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: *Eremurus spectabilis*, *Silene chlorifolia*, *Plumbago europaea*, Lipit peroksidasyonu, antioksidan, antimikrobiyal, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *in vitro*, yağ asidi, vitamin, şeker, flavonoid

SUMMARY

Determination of Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Eremurus spectabilis* Bieb., *Silene chlorifolia* Sm. and *Plumbago europaea* L.

In this study, the effects of *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of plant extracts *Eremurus spectabilis* Bieb., *Silene chlorifolia* Sm. and *Plumbago europaea* L. which were collected in Elazığ and its vicinity, and only antioxidant effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* in cultural medium are investigated. In the study, the free radical scavenging activity, flavonoid, resveretrol and sugar contents, lipid peroxidation (LPO), levels of fatty acid, lipophilic vitamin values, protein and glutathione amounts were measured. The antimicrobial activity studies, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Epidermophyton sp.*, *Candida albicans* were determined. For this purpose, control, fenton reactive (FR), the groups that contain plant extracts and their combinations were used.

According to results of the experiment, *in vitro* medium, it is determined that in FR group, LPO amounts increases in a large ration with respect to the control group ($p<0.0001$), and LPO levels in groups which includes plant extracts and FR, decreases in certain amounts. The LPO lowering effect of plant extracts were determined to arising from phytochemicals such as flavonoid.

In the studies on *S. cerevisiae* and *K. lactis*, it was examined that protein, fatty acid levels were effected by extract and FR addition. It was detected that in fatty acid composition of *S. cerevisiae* and *K. lactis* which were in the effect of FR and plant extracts, there was a different rate of increment in the levels of palmitoleik, stearic, oleic, linolenic and linoleic acids according to the control group ($p<0.0001$, $p>0.005$). Furthermore, it was determined that adding plant extracts decrease the level of glutatyon in *S. cerevisiae* but it increases this level in a significant amount in *K. lactis*' ($p<0.0001$, $p<0.001$).

Antimicrobial activity of plant extracts were found in different rations.

Key Words: *Eremurus spectabilis*, *Silene chlorifolia*, *Plumbago europaea*, lipid peroxidation, antioxidan, antimicrobial, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *in vitro*, fatty acid, vitamin, sugar, flavonoid

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. DPPH radikalının giderilmesi	16
Şekil 2. Glutasyon kalibrasyon eğrisi	20
Şekil 3. Protein kalibrasyon eğrisi.....	22
Şekil 4. Bitki ekstraktlarının şeker içeriği (µg/g)	27
Şekil 5. Bitki ekstraktlarının DPPH radikalının temizleme etkisi (%).....	28
Şekil 6. Bitki ekstraktlarının <i>in vitro</i> ortamda lipid peroksidasyonu üzerine antioksidan etkileri (nmol/ml)	29
Şekil 7. Bitki ekstraktlarının <i>in vitro</i> ortamda metil esterleri üzerine etkisi (µmol/ml)	30
Şekil 8. Bitki ekstraktlarının <i>S. cerevisiae</i> ' nın MDA-TBA seviyesi (nmol/ml)	31
Şekil 9. Bitki ekstraktlarının <i>S. cerevisiae</i> ' da ki glutasyon miktarı üzerine etkisi (mg/g)	33
Şekil 10. Bitki ekstraktlarının <i>S. cerevisiae</i> ' nın total protein miktarı üzerine etkisi (mg/g)	34
Şekil 11. <i>S. cerevisiae</i> ' nin SDS-Page analizi	35
Şekil 12. Bitki ekstraktlarının <i>K. lactis</i> ' in MDA-TBA seviyesi (nmol/ml)	36
Şekil 13. Bitki ekstraktlarının <i>K. lactis</i> ' in glutasyon miktarı üzerine etkisi (mg/g).....	39
Şekil 14. Bitki ekstraktlarının <i>K. lactis</i> ' in total protein miktarı üzerine etkisi (mg/g)	40
Şekil 15. <i>K. lactis</i> ' in SDS-Page analizi.....	40

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bitki ekstraktlarının flavonoid ve resveratrol içeriği (µg/g).....	26
Tablo 2. Bitki ekstraktlarının lipofilik vitaminler ile fitosterol içerikleri (µg/g).....	28
Tablo 3. Bitki ekstraktlarının <i>S. cerevisiae</i> 'nın yağ asidi içeriği üzerine etkisi (mg/g).....	32
Tablo 4. Bitki ekstraktlarının <i>K. lactis</i> 'in yağ asidi profili üzerine etkisi (mg/g).....	38
Tablo 5. Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi.....	41

SEMBOLLER LİSTESİ

SOD	: Süperoksit dismütaz
CAT	: Katalaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
MDA	: Malondialdehit
MEB	: Malt ekstrakt buyyon
BHT	: Butilhidroksitoluen
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DMSO	: Dimetil sülfoksid
TBA	: 2- tiobarbiturik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
GSH	: Glutasyon
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi
TEA	: Tris-EDTA-Asetikasit tamponu
TCA	: Trikloroasetik asit
DTNB	: 5,5'ditiyobis 2-nitrobenzoik asit
MPA	: Metafosforik asit
LNA	: Linolenik asit
LA	: Linoleik asit
LPO	: Lipid Peroksidasyon
APS	: Amonyum persülfat çözeltisi
TEMED	: N, N, N', N-tetrametil-ethylendiamin
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
nmol	: Nanomol
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
g	: Gram
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
mm	: Milimetre
pH	: Hidrojenin Gücü (Power of Hydrogen)
μmol	: Mikromol
K	: Kontrol

FR	: $\text{FeCl}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
ERA	: <i>Eremurus spectabilis</i> Bieb.+ FR
SLN	: <i>Silene chlorifolia</i> Sm.+ FR
PLM	: <i>Plumbago europaea</i> L.+ FR
P.ERA	:MEB+ <i>Eremurus spectabilis</i>
P.SLN	: MEB+ <i>Silene chlorifolia</i>
P.PLM	: MEB+ <i>Plumbago europaea</i>

1. GİRİŞ

Bitkiler günlük hayatta yiyecek, baharat, parfüm ve ilaç olarak kullanılmalarının yanı sıra sahip oldukları kompleks kimyasal yapılarından dolayı geleneksel tedavinin temelini oluşturmuşlardır.

Halk arasında çok eski devirlerden beri tedavi amacıyla kullanılan bitkiler, bugün yapılan çalışmalarla aydınlığa kavuşturulmuş, tat ve koku endüstrisinde, kozmetik ve gıda sanayinde bunların yanı sıra tedavide ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadırlar [1].

Bitkilerin iyileştirici etkisi doğal yapılarında yer alan ve sekonder metabolit olarak adlandırılan kimyasallar ve bu kimyasalların farklı kombinasyonlarından kaynaklanır. Boyadan gıda endüstrisine kadar çeşitli alanlarda kullanılan bu aktif doğal ürünlerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesiyle ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Özellikle antimikrobiyal ve antioksidan aktivite çalışmalarından elde edilen olumlu sonuçlar, yeni antimikrobiyal ajan ve doğal antioksidan madde geliştirme çalışmaları için bitkilerin yeni ve zengin birer araştırma kaynağı olarak görülmelerine neden olmaktadır [2]. Antioksidan aktivitenin temelinde oksidatif stresi meydana getiren serbest radikaller yer almaktadır.

1.1. Serbest Radikaller

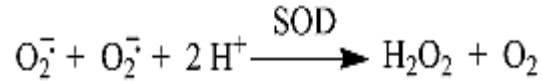
Serbest radikaller yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş “elektron” bulunduran basit bir molekül, atom veya iyonlardır. Bu yapılar, negatif yüklü elektron sayısının, pozitif yüklü proton sayısına eşit olmadığı moleküllerdir.

Serbest radikaller bu ortaklaşmamış elektronlarından dolayı çevrelerindeki atom ve moleküllere karşı oldukça reaktiflerdir. Çok kısa ömürlü olmalarına karşın, radikal olmayan moleküllerle reaksiyona girip onları da radikal yapmaları ve bir dizi zincir reaksiyonu başlatıp, birçok radikal oluşturmalarından dolayı oldukça tehlikelidirler.

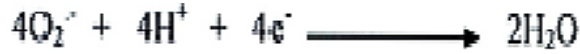
Biyomoleküllerin çoğu atomları birbirlerine kovalent bağlı ve nonradikal yapılardır. Atomlar arası kovalent bağlar, elektron çiftlerinin paylaşılmasıyla oluştuğundan serbest radikallere de yarım kalmış bağ gibi bakılabilir. Bu özellik onları kimyasal olarak reaktif yapar [3-6].

1.1.1. Süperoksit Radikali

Tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir [7]. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından önemlidir [8]. Süperoksit radikali, sülfidril gruplarının disülfidlere yükseltgenmesine ve ferrik demirin ferröz formuna indirgenerek ferritinden demirin direkt olarak ayrılmasına neden olur. Ferritin, demirin güvenli depolama formudur. Demir, süperoksit radikali ve H_2O_2 'den OH üretimini teşvik eder [9,10]. Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azalır. SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır [11]. Süperoksit dismutaz, $O_2^{\cdot-}$ anyonunu, daha az reaktif türler olan O_2 ve H_2O_2 'ye dönüştürür [12].



Solunum zincirinin son enzimi olan mitokondriyal sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eden enzimdir.



Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır [13-15].

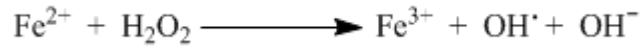
1.1.2. Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) meydana getirir. H_2O_2 membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır [16]. Hidrojen peroksit genellikle biyolojik sistemlerde süperoksidin dismutasyonu ile meydana gelir. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak

bilinir. Bu dismutasyon ya spontandır ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH' da enzimatik dismutasyon daha belirgindir [10,17,18]. Hidrojen peroksit, bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir.

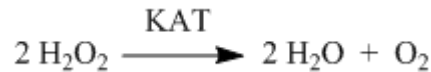


Katalizör varlığında veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat katalizörsüz reaksiyon çok yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekil ise çok hızlıdır ve fenton reaksiyonu adını alır.



Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe^{3+}) süperoksit tarafından ferro demire (Fe^{2+}) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak fenton reaksiyonu ile hidrojen peroksitten $\cdot OH$ ve OH^- üretilir. Mitokondride bol miktarda H_2O_2 bulunur. Metal iyonları da çok olduğu için çok fazla hidroksil radikali üretimi söz konusudur. Bu metal katyonları, DNA veya hücre zarına bağlanırsa hidroksil radikali oluşumuna sebep olabilir [19].

Katalaz (CAT), H_2O_2 ' nin hiçbir konsantrasyonu ile doyumluğa ulaştırılamayan tek enzimdir [20]. SOD aktivitesi sonucunda oluşan H_2O_2 ' nin büyük bir kısmı, CAT tarafından H_2O ve O_2 ' ye dönüştürülür [21].

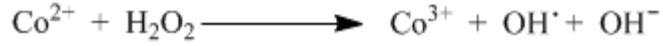
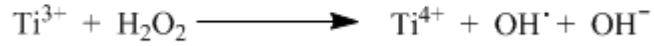
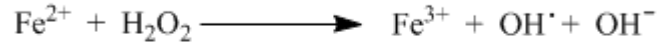


Mayalar üzerinde yapılan çalışmalarda da katalaz enziminin varlığı son yıllarda tespit edilmiştir. Glutasyon Peroksidaz' da hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumlu olan bir enzimdir. Hücreleri çeşitli hasarlara karşı koruyan bir selenoenzim olduğu düşünülür [10, 22, 23]. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), intrasellüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir.



1.1.3. Hidroksil Radikali

Oksijen radikalleri içinde en reaktif ve en toksik etkili olanı hidroksil radikalidir ($\cdot\text{OH}$). Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştığı yerde büyük hasara sebep olur. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları hidroksil oluşumundaki en önemli reaksiyonlardır [24]. Hidroksil radikali oluşunca hemen üretildiği yerin birkaç $\text{\AA}$ uzaklığında herhangi bir molekülle reaksiyona girer. Reaktifliği yüksek olduğu için 37°C 'de beklenen yarılanma ömrü 1×10^{-9} saniyedir [25]. Nükleer ve mitokondriyal DNA, membran lipitleri ve karbonhidratları gibi, hücrenin makro molekülleri üzerine yıkıcı etki yapmamaktadır [26,27].



1.1.4. Singlet Oksijen

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür [10]. Serbest radikal olmamasına rağmen çok reaktif olması ve üretimi sırasında bazı radikal tepkimeler oluşması nedeniyle aynı aileden sayılmaktadır [28]. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle oluşur. Enerji absorpsiyonu ile uyarılan oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirerek ayrı ayrı ya da aynı orbitali işgal edebilir. Bu iki forma singlet oksijen adı verilmektedir. Singlet oksijen, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesiyle ışık yayar [29].

1.1.5. Nitrik Oksit

Nitrik oksit ($\text{NO}^\cdot$), tek sayıda elektron içeren renksiz gaz şeklinde bulunan inorganik bir serbest radikaldir. Bakteriler, sigara dumanı ve egzoz gazları reaktif azot oksitleri üretir. NO kararlı bir serbest radikaldir ve fizyolojik şartlar altında birçok fonksiyonda rol oynar [30]. Hücre içi konsantrasyonu fazla arttığında nöron ölümü ile sonuçlanan toksik olayları başlatır. Nitrik oksit, biyolojik sistemlerde O_2 , O_2^- ve geçiş metalleriyle reaksiyona girer. Metal ve tiyol içeren proteinlerle yürüyen reaksiyonlar, enzim aktivitelerinde zayıflamaya neden olur. Nitrik oksitin elektron transport zincirindeki demir içeren komplekslere saldırması, bozulmuş enerji metabolizmasıyla sonuçlanır. Nitrik oksit oluşumunun artması sinir hücreleri tahribatına yol açar [19].

1.2. Oksidatif Stres

Oksidasyon yani yükseltgenme, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesi prosesidir. Yükseltgenme potansiyeli karşısındakine göre yüksek olan madde yükseltgenirken diğeri indirgenir. Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşabilmektedir [31]. Bu durum yaygın olarak “Oksidatif Stres” şeklinde ifade edilmektedir.

Oksidatif stresin baş sorumluları reaktif oksijen ve azot türleridir [32]. Hücrenin normal solunumu sırasında yan ürün olarak oluşan bu reaktif oksijen ve azot türleri radikalik ve radikalik olmayan türleri içermektedir.

Radikalik oksijen türlerine, süperoksit anyon (O_2^-), hidroksil ($\text{OH}^\cdot$), peroksit ($\text{OOH}^\cdot$) ve alkoksi ($\text{OR}^\cdot$) radikalleri; azot türlerine, azot oksit ($\text{ON}^\cdot$) radikalleri örnek verilebilir. Radikalik olmayan oksijen türlerine ise, hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3) ve singlet oksijen ($^1\Delta_g \text{ } ^1\text{O}_2$); azot türlerine ise, nitroz asit (HNO_2), nitrozil katyonu (NO^+) ve nitroksi anyonu (NO^-) örnek olarak verilebilirler [32]. Bu serbest radikallerin yanı sıra tiyol radikalleri ($\text{SR}^\cdot$) ve karbon merkezli radikallerde mevcuttur. Bu türlerin pek çok değişik mekanizma yoluyla hücre ölümüne neden olduğu, çeşitli DNA türlerine hasar verdiği ve kansere neden olduğu bilinmektedir. Serbest radikallerin proteinlere, nükleik asitlere, DNA'ya, membran lipitlerine ve karbonhidratlara etkileri ayrıntılı şekilde araştırılmıştır [33].

1. **Proteinler:** Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için triptofan, tirozin, fenilalanin histidin, metionin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Glutasyon redüktaz ve gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz gibi reaktiviteleri için yukardaki aminoasitlere bağımlı olan enzimler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenerek inhibe edilirler [34-36].
2. **Nükleik Asitler ve DNA:** Radyasyonla hücre içinde enerji depolanması sonucu iyonlar, serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA' yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksiste, büyük oranda, ya nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine, ya da DNA' daki diğer bozukluklara bağlıdır. Normal metabolizma sırasında, hiperoksia ve çevresel faktörler örneğin fotokimyasal hava kirliliği etkisiyle açığa çıkmış olan serbest radikallerin yol açtığı hücre ölümüne ve mutasyonlara DNA' nın katıldığı da ileri sürülmektedir [37,38].
3. **Membran Lipidleri:** Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar.

Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalın membran yapısında bulunan poliansature yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir H atomu uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit radikali ile hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Süperoksit radikali de hidroksil radikaline dönüşerek etkili olmaktadır. Benzer şekilde hidrojenperoksidin de hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Bu nedenle lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikalın hidroksil radikali olduğu görüşü benimsenmektedir [39,40]. Serbest radikal etkisiyle yağ asidi zincirinden bir H atomunun uzaklaştırılması sonucu, zincir radikal niteliğini kazanmaktadır. Böylece oluşan lipid radikali (L*) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılmasıyla dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir. Bu lipid peroksit radikalleri, zar yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine (LOOH) dönüşmektedir. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek yürümektedir.

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehid ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan malondialdehit (MDA) miktarı tiobarbütirik asit (TBA) testiyle ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, oluşan ara bileşiklerinden dien konjugatlarıyla lipid hidroperoksitlerinin ve son ürünlerden etan ve pentan gibi gazların ölçümü de son yıllarda lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir [41,42].

4. **Karbohidratlar:** Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler fizyolojik şartlarda otooksidasyona uğrayarak, süperoksit ve hidrojen peroksiti meydana getirirler. Monosakkaritlerin otooksidasyonunun, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agerega olmalarına sebep olduğu gibi bazal membran kalınlaşmasına ve sonuçta katarakt, mikroanjiopati gelişimine de sebep oldukları ileri sürülmektedir [43].

1.3. Antioksidanlar

Organizmada oksidan moleküllerin yapacakları hasara karşı koruyucu mekanizmalar bulunur. Oksidan düzeyi ile antioksidan sistem arasında denge söz konusudur. Oksidanların düzeyi yükselir ve antioksidanlar yetersiz kalırsa bu denge bozulur ve oksidan moleküller hücrenin birçok bileşenini (protein, lipid, karbohidrat, nükleik asit, enzimler) etkileyerek hücre hasarına yol açarlar [44,45]. Antioksidanların fonksiyonları arasında serbest radikal oluşumunu sınırlandırması, tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların kırılmasını sağlaması, oluşan serbest radikallerin ortadan kaldırılması, hasarlı moleküllerin tamir ve temizlenmesi yer alır [46-48].

Antioksidanlar içinde, bitkisel kaynaklardan alınan vitaminler, polifenoller, karotenoidler ve bazı fitokimyasallar ile hücredeki çeşitli enzim molekülleri ve tiyol bileşikleri yer alır.

Polifenoller; antosiyanin, fenolik asit, lignans ve flavonoidleri ve stilbenleri içeren geniş bir antioksidan sınıfıdır. Polifenoller bitkilerin sekonder metabolitleridir ve bitki polifenollerini, radikal yok ediciler olup çok etkili antioksidanlardır [49,50].

Flavonoidler, bitkilerdeki polifenolik sekonder metabolitlerin en yaygın grubunu oluşturur ve birçok metabolik bozuklukta tedavi amacıyla kullanılan doğal bileşiklerin önemli bir üyesidir. Sebzelerde, meyvelerde, çay ve şarap gibi içeceklerde doğal olarak

bulunan polifenolik antioksidanlardır. Kanser, koroner kalp hastalığı ve aterosklerosis gibi kronik hastalıklara karşı potansiyel koruyucu olarak görev yaparlar [51,52].

Resveratrol (trans-3,4',5-Trihydroxystilbene) ise, çoğu bitki familyasında bulunan bir fenolik bileşiktir ve koroner kalp hastalıkları ile arterosklerozisten koruma gibi önemli biyolojik etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir [53]. Resveratrol östrojenik, anti-platelet ve anti-inflamatuar özellikler gibi çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik olaylarda rol oynamaktadır [54].

Fitosteroller (bitki steroller); bitkilerde bulunan bir grup steroid alkoldür. Beyaz renklidirler, hafif, karakteristik kokuları vardır, suda çözünmezler, alkollerde çözünürler. Gıda katkı maddesi olarak, ayrıca tıp ve kozmetik ürünlerinde de kullanılırlar. Bitkilerde çeşitli fitosteroller vardır. Hücre zarında yapısal bir rol oynarlar. Bu rol memeli hücrelerinde kolesterolünkine denktir. Ayrıca; sindirim yolunda kolesterolün misellere girmesini engelleyip toplam kolesterol emilimini azaltarak kolesterol düzeylerini düşürülmesini sağlarlar. Bu da vücuttaki toplam kolesterol seviyesini kontrol altında tutmaya yarar [55].

Fitokimyasal bileşikler hakkındaki tüm bu bilgilerin sonucunda şunu söyleyebiliriz ki; fitokimyasal besin terimi besinin sağlıklı ilişkisi olduğunu vurgulayan bir terimdir.

Sıkça tükettiğimiz sebze ve meyvelerde bulunan fitokimyasallar oksidanların yakalanması yanı sıra detoksifiye edici enzimlerin aktivasyonu, immün sistemin uyarılması, hücre çoğalması ve apoptozuna ilişkin gen ekspresyonunu, hormon metabolizması ve antibakteriyal ve antiviral etkileri düzenleyerek de etkili olur [56,57].

Antioksidan ajanlar oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla gösterirler. Bunlar,

- 1. Süpürücü/temizleyici etki gösterenler:** Yani radikal oluşumunu engellerler ve oluşmuş olan radikalleri daha az zararlı hale getirirler. Örnek olarak, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimleri ve metal bağlayıcı bazı proteinleri verebiliriz.
- 2. Giderici etki gösterenler:** Oksidanlarla etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini söndüren ve inaktif hale getiren bileşiklerdir. Örnek olarak, vitaminler (A, C ve E vitaminleri), flavonoidler, mannitol ve antosiyanidinler verilebilir.
- 3. Zincir kırıcı etki gösterenler:** Zincirleme olarak devam eden tepkimeleri belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Örnek olarak bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albümin gösterilebilir.

4. Tamir edici etki gösterenler: Bu grupta DNA tamir enzimleri, metionin sülfoksit redüktaz sayılabilir.

Canlılar da mekanizmalar sonucu oluşan serbest radikaller, çoğu zaman lipit oksidasyonuna ve buna bağlı olarak da hücre ölümlerine neden olmaktadır. Antioksidan bir madde bu oksidasyonun çeşitli aşamalarında yukarıda özetlenen mekanizmalar yoluyla koruyucu özelliğe sahip maddelerdir. Sentetik olarak üretilebildiği gibi doğal kaynaklardan da elde edilebilir. Bu tür maddeler, oluşan serbest radikalleri ya doğrudan temizleyerek ya da bu türlere elektron veya hidrojen aktarımı yaparak etkisiz hale getirir. Genel anlamda iki tür antioksidan madde tanımlanır.

Birincil antioksidan maddeler, zincir kırma tepkimeleri oluşturan veya serbest radikal temizleyen türlerdir.

İkincil antioksidan maddeler veya koruyucu antioksidan maddeler ise, metallerin aktivasyonunu azaltıcı lipit hidroperoksitlerin istenmeyen uçucu türlere parçalanmasını engelleyen, tekli oksijen yakalayan ya da birincil antioksidanların yeniden üretimini sağlayan türlerdir. Ayrıca mekanizmalardaki bu çeşitlilik pek çok maddenin araştırılmasına imkân sağlamıştır [58].

Günümüzün gelişen teknik şartlarında kullanılan sentetik antioksidanların bazı yan etkilerinin olmasından dolayı bitkisel kaynaklardaki doğal antioksidanların araştırılması son yıllarda dikkat çeken bir araştırma konusu olmuş ve önemi günden güne de artmaktadır. Üretilen sentetik yapıları antioksidanların yan etkilerine bağlı olarak kullanımları ve etkileri sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle de daha etkin ve daha düşük yan etkiye sahip olan doğal antioksidanların tanımlanması veya tespit edilerek elde edilebilmesi, etkilerinin ortaya konulması, yaşam kalitesi açısından önemli beklentiler arasında yer almaktadır.

1.4. Antimikrobiyal Aktivite

Antimikrobiyal ilaçların önemli bir bölümünü oluşturan antibiyotikler; bakteriler, mantarlar, aktinomisetler gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve diğer mikroorganizmaların gelişmesini önleyen ya da onları öldüren kimyasal maddelerdir [59]. Geniş oranlarda tedavi alanında yer alan antibiyotikler çok seyreltik çözeltilerde bile bazı mikroorganizmaların üremelerini durduran veya öldüren bileşiklerdir [60].

Antibiyotiğin ticari olarak 1940' larda ortaya çıkmasından sonra, bitkisel maddelerin antibiyotik olarak kullanımında düşüş gözlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite açısından bakteriyel ve fungal kaynaklı antibiyotiklere daha çok güvenildiğinden dolayı bitkisel ürünlerin çok azı antimikrobiyal madde olarak tercih edilmiştir [61]. Ancak penisilinin bulunmasından hemen sonra *Staphylococcus aureus*' un penisiline direnç gösterdiği rapor edilmiş ve 1960' lardan itibaren bakterilerde gözlenen antibiyotik direnci yaygın bir sorun halini almıştır [62].

Bilim adamları direnç geliştiren bakterilere karşı koyabilmek için alternatif antibiyotik ajan üretme çalışmalarını hızlı bir şekilde sürdürmektedirler. Bu aşamada tıbbi bitkiler sahip oldukları fitokimyasallardan dolayı önemli birer araştırma kaynağı haline gelmişlerdir. *In vitro* şartlarda yapılmış olan pek çok çalışmada bitkilerden elde edilen özütlerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir [63-65].

Bitkilerin çeşitli yöntemlerle elde edilen bitkisel özütlerinin antimikrobiyal etkilere de sahip olduğu bilinmektedir. Antimikrobiyal bileşikler mikrobiyal gelişimi ya da canlılığı azaltarak işlenmiş ya da işlenmemiş gıdaların raf ömrünü uzatabilirler. Bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin gıda güvenliğini yüksek oranlarda korumayı başardığı ve bitkisel ekstraktların gıdalarda doğal antimikrobiyal olarak kullanılabileceği yapılan bilimsel araştırmalarla kanıtlanmıştır.

1.5. Literatür Özeti

Eremurus spectabilis Bieb., *Silene chlorifolia* Sm. ve *Plumbago europaea* L. bitkileri insan beslenmesinde ve halk arasında bazı hastalıkların giderilmesinde önemli yeri vardır. *Eremurus spectabilis* Bieb., halk tarafından sebze olarak tüketilmesinin yanı sıra yaprakları boğaz ağrılarında, *Silene chlorifolia* Sm.' nin genç sürgünleri yaş olarak veya kurutularak sebze olarak tüketilmekte, *Plumbago europaea* L. ise diş ağrılarını giderici olarak çiğnenerek kullanılmaktadır.

Çin halk tıbbında romatizma ve fiziksel güçsüzlük tedavisi için kullanılan *E. chinensis*' in glikozid türevleri tespit edilmiştir [66].

Eremurus' un 17 farklı türünün köklerinden elde edilen su ekstraktlarının glukomannan içeriği bakımından oldukça zengin olduğu ve bu polisakkaritlerin D-glukoz, D-mannoz ve asetil grupları içerdiği tespit edilmiştir [67,68]. Yabani bir sebze olan ve

tedavi amaçlı kullanılan *Eremurus spectabilis*' in değişik çözücülerde antiradikal, antimikrobiyal ve antioksiadan aktivitesi araştırılmıştır [69].

Bugüne kadar *Silene* türlerinin kimyasal bileşimleri hakkında çok az çalışma yapılmıştır. *S.vulgaris*' de saponinlerin varlığı bildirilmiştir [70,71]. *Silene* türlerinden elde edilen silenan adında bir pektik polisakkaritin immünomodülatör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [72]. Bazı *Silene* türlerinin yağ asidi kompozisyonu araştırılmıştır ve araştırma sonunda 18:1 ve 18:2 yağ asitleri oldukça yüksek miktarda bulunmuştur [73-76].

Silene conoidea' nın ve bazı bitkilerin antioksidan enzim aktiviteleri belirlenmiştir. SOD aktivitesi en yüksek bu bitkide bulunmuştur [77]. Bazı bitkilerin ve *S. chlorifolia* anti-mikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mikroorganizmasına karşı etki göstermiştir [78]. *Silene*' nin farklı türlerinin yağ asidi içerikleri ile anti-fungal ve anti-bakteriyal aktivitesi araştırılmıştır [79].

Plumbago türlerinin (Plumbaginaceae) anti-enflamatuar, antimikrobiyal hastalıklarında kullanıldığı bildirilmiştir [80]. Tayvan' da *P. zeylanica*' nın tüm bitki ve köklerinin romatizmal ağrılarda, kan çıbanı ve yaralanma tedavisinde bir halk ilacı olarak kullanıldığı [81], kök ve kök kabuklarının geleneksel olarak basur, ishal, cüzzam ve bunun gibi çeşitli cilt hastalıklarının tedavisi için kullanılığı vurgulanmıştır [82].

Plumbago europaea' nın da familyadaki diğer türler gibi plumbagin, hydroplumbagin ve mirisetin-3-O-glukozid maddelerini bünyesinde ihtiva ettiği, antioksidan aktivite çalışmalarında olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir [83]. Plumbagin' in antibakteriyal, antifungal, antikanser, antimutajenik ve antioksidan, anti-leishmanial, anti-plasmodial, anti-alerjik gibi etkilerinin olduğu bildirilmektedir [84].

Maya kültürü oksidatif stres çalışmaları genellikle *S. cerevisiae* üzerine yoğunlaşmıştır. Bu mikroorganizma üzerine yapılan çalışmalar referans olarak kabul edilmektedir. Fakat maya hücrelerinin fizyolojik yapısı farklılıklar göstermektedir. Yapılan bir çalışmada referans olarak kabul edilen *S. cerevisiae*' ya kıyasla *Debaryomyces hansenii*' nin kadmiyum klorür ve hidrojen peroksit'e karşı daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır [85].

Sağlıklı ve kaliteli bir yaşam için besinlerin antioksidan etkilerinin bilinmesi önemlidir. Bu konuda yapılan çalışmalarda genellikle, bitkisel kaynakların çoğunlukla antioksidan kapasiteleri incelenmiş, madde içeriklerine girilmemiştir. Bu çalışmada ise *Eremurus spectabilis* Bieb., *Silene chlorifolia* Sm. ve *Plumbago europaea* L.' nin

resveratrol, flavonoid ve fitosterol içerikleri incelendikten sonra, bu içeriğe baēlı olarak *in vitro* ortamda antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler

Oleik asit (18:1, n 9), linoleik asit (18:2, n 6), linolenik asit (18:3, n 3), Twin 20, Tris-base ve hidroklorik, kuersetin, mirisetin, resveratrol, kateşin, naringin, naringenin, kamferol, metanol, asetonitril, n-hekzan, n-heptan, izopropanol, demir klorür, hidrojen peroksit, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , malt ekstrakt buyyon (MEB), butilhidroksitoluen (BHT), n-Butanol, potasyum klorür, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), dimetil sülfoksit (DMSO), 2- tiyobarbiturik asit (TBA), etil alkol, sodyum klorür, potasyum bikarbonat, yağ asidi metil esteri (doymuş ve doymamış türleri), vitamin standartları, fitosterol standartları, sülfürik asit, hidroklorik asit, fosfat tamponu, EDTA, glutatyon (GSH), sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), şeker analizi standartları, Tris-EDTA-Asetikasit tamponu (TEA), Tris-EDTA tamponu, trikloroasetik asit (TCA), 5,5'ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB), sodyum sitrat, bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sodyum potasyum tartarat, sodyum hidroksil, sodyum karbonat, folin, metafosforik asit (MPA).

2.2. Kullanılan Cihazlar

Döner buharlaştırıcı (rotavapor), homojenizatör, gaz kromatogafi, HPLC cihazı, etüv, UV spektrofotometre, otoklav, elektroforez, vorteks, hassas terazi, otomatik pipeteler, santrifüj, sonikasyon, derin dondurucu.

2.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri

Çalışmada kullanılan (*Eremurus spectabilis* Bieb., *Silene chlorifolia* Sm. ve *Plumbago europaea* L.) bitki örnekleri Elazığ ili çevresinden toplandı ve deneysel aşamaya kadar steril poşetler içine konularak analiz yapılncaya kadar derin dondurucuda saklandı.

2.4. Çalışmalarda Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar; *Escherichia coli* ATCC 25922 *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Epidermophyton sp.*, *Candida albicans* FMC 17, *Saccharomyces cerevisiae* FMC 16, *Kluyveromyces lactis* COWAN 1 Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edildi.

2.5. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Bitki örnekleri için 1/5 (g/ml) oranında metanol ekstraktı hazırlandı. Ekstraktlar blenderda bitki gruplarının çözücüler içerisinde parçalanmasıyla elde edildi. Daha sonra bütün gruplar santrifüj edildi (5000 rpm, +4°C). Santrifüj sonunda elde edilen supernatanttan rotovapor kullanılarak çözücüler ortamdan uzaklaştırıldı. Kullanılmaya hazır hale getirilen ekstraktlar derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.6. Resveratrol ve Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Flavonoidlerin kromatografik analizi için 5 µm iç çapında PREVAIL C18 (15x4.6 mm) ters-faz kolon kullanıldı. Mobil faz olarak %1 asetik asit içeren metanol/su/asetonitril (46/46/8, v/v/v) karışımı kullanıldı [86]. Bu mobil faz 0,45 µm membran filtresi içinden geçirilerek süzüldü ve daha sonra kullanılmadan önce ultrasonikasyon cihazında havası alındı. Kateşin ve naringin için 280 nm, rutin, mirisetin, morin ve kuarsetin için 254 nm, resveratrol için 306 nm ve kamferol için 265 nm dalga boyu kullanılarak RHPLC ayrımını takiben diyot dizi dedektörü (DAD) tarafından bu flavonoidlerin ölçümü yapıldı. Akış hızı 1.0 ml/min ve enjeksiyon değeri 10 µL olarak ayarlandı. Analizlerin kromatografik pikleri reaksiyon sürelerinin karşılaştırılması ve standart referanslarının UV spektrumları ile doğrulandı. Miktar ölçümü standart metot kullanımıyla pikin birleştirme yoluyla gerçekleştirildi. Tüm kromatografik işlemler 25 °C’ de yapıldı.

2.7. Şeker Analizi

Toplanan bitki örnekleri 1:1 (g/ml) oranında kreuze içine alınarak distile su ile iyice homojenize edildi. Daha sonra süzgeç kâğıdı ile süzülerek pellet ile sıvı kısım ayrıldı. Bu işleminden sonra, toplam filtratın hacmi belirlenerek RI dedektörünün bağlı olduğu HPLC cihazı ile analiz edildi. Analizde mobil faz olarak Asetonitril+Su (v/v) (%75/%25) karışımı kullanıldı. Analiz için Shim-Pack HRC NH₂ (150X4.6 mm, 5µ.) kolon kullanıldı.

2.8. Bitki Örneklerinin ADEK Vitaminleri ve Fitosterol Miktarının HPLC Cihazı ile Analizi

5 ml HIP karışımı 25 ml' lik ağzı kapaklı tüpler içine alınarak üzerine 5ml 0.5M KOH çözeltisi ilave edildi. Vortekslendikten sonra 85°C' de 25 dk bekletildi. Tüpler çıkartılarak oda sıcaklığına kadar soğutulup üzerine 5ml saf su ilave edilerek karıştırıldı. Sabunlaşmayan lipofilik moleküller 2x5 ml hekzan ile ekstrakte edildi. Hekzan fazı azot akımı ile uçuruldu. 1 ml (50:50, v/v) asetonitril/metanol karışımında çözülerek otosampler viallerine alınıp analiz edildi.

Analiz, Shimadzu marka HPLC cihazı ile yapıldı. Cihazda pompa olarak LC-10 ADVP UV-visible detektör olarak SPD-10AVP, kolon fırını olarak CTO-10ASVP, otosampler olarak SIL-10ADVP, degasser ünitesi olarak DGU-14A ve Class VP software (Shimadzu, Kyota Japan) mobil faz olarak asetonitril/metanol (68:28:4, v/v/v) karışımı kullanıldı. Mobil faz akış hızı 1ml olarak belirlenecek ve analiz için UV dedektör kullanıldı. Kolon olarak da Süpelcosil LC 18 (25×4.6 cm, 5 µm; Sigma, USA) kolonu kullanıldı. Retinol ve türevleri için dedeksiyon dalga boyu 326 nm, E vitamini ve fitosterol için 202 nm, D ve K vitaminleri için 265 nm'de değerlendirildi [87].

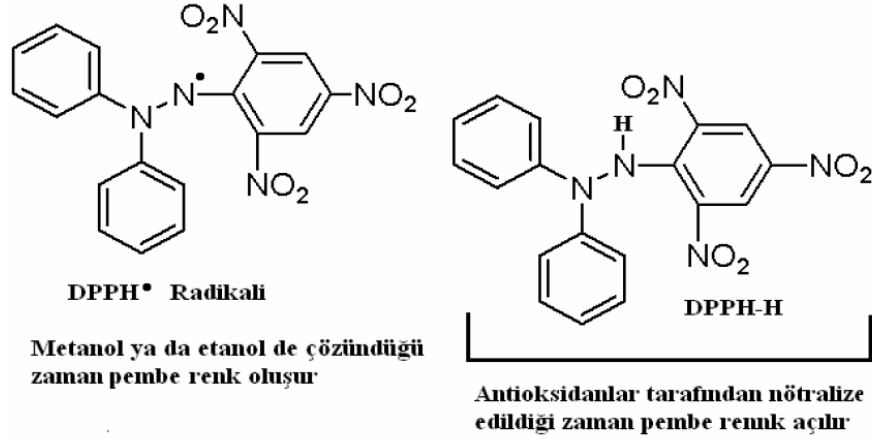
2.9. Serbest Radikal (DPPH) Giderme Aktivitesi

DPPH, serbest radikal temizleme aktivitesi, Brand-Williams ve ark. [88] tarafından belirtilen metoda göre yapıldı. Serbest radikal olarak 25 mg/l α,α-Diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) metanolde hazırlandı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 25, 50, 100 µg/µl bitki ekstraktları ve DPPH çözeltisinden 3,9 ml ilave edildi. Karışımlar, oda sıcaklığında karanlık

bir ortamda 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda absorbanları 517 nm’ de blanka karşı spektrofotometrede okundu [89].

Azalan absorban, geriye kalan DPPH miktarı serbest radikal giderme aktivitesi olarak belirlendi. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% = \frac{\text{Kontrol}_{\text{ABS}} - \text{Sample}_{\text{ABS}}}{\text{Kontrol}_{\text{ABS}}} \times 100$$



Şekil 1. DPPH radikalinin giderilmesi

2.10. *In vitro* Ortamda Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri Shimoi ve ark.’nın [90] yöntemine göre yapıldı. Bu amaçla; pH’ sı 7.4 olan 0.05 M TRIS-HCl / 0.15 M KCl ve % 0.2 TWEEN 20 içeren tampon çözeltisi ile 1 mM FeCl₂ ve 3 µM hidrojen peroksit günlük olarak hazırlandı. Bu tampon çözelti içerisinde 2.30 mM Linolenik asit (LNA, 18:3 n-3), 10.44 mM Linoleik asit (LA, 18:2, n-6), 3.97 mM çözeltileri DMSO’ da çözünerek hazırlandı ve aşağıdaki deney grupları hazırlandı:

Kontrol grubu : 5 ml trisma-base tamponu, 0.4 ml yağ asidi karışımı

FR grubu: 5 ml trisma-base tamponu, 1 ml FeCl₂, 1 ml H₂O₂, 0.4 ml yağ asidi karışımı

Bitki grupları : 5 ml trisma-base tamponu, 1 ml FeCl₂, 1 ml H₂O₂, 0.4 ml yağ asidi karışımı, 0.5, 1 ve 2 ml olmak üzere farklı miktarlarda bitki ekstraktı ilave edildi.

Bu gruplar hazırladıktan sonra, 37°C’ de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda etüvden çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve gruplardaki örnekler %4’ lük BHT ilave edilerek daha ileri oksidasyon olması engellendi. Daha sonra örnek karışımlardan 1 ml alınarak lipid peroksidasyon düzeyi ölçüldü.

2.10.1 *In vitro* Ortamda Lipid Peroksidasyon (LPO) Ölçümü

Örneklerden 1 ml alındıktan sonra üzerine %0,6’ lık TBA çözeltisi ile 2 ml distile su ilave edilip vortekslendi. Daha sonra 90°C’ de 30 dakika bırakıp reaksiyon sonucu oluşan pembe renk 3 ml n-bütanol ile ekstrakte edildi. Örnekler santrifüj edildi ve santrifüj sonunda elde edilen supernatant kısmın yoğunluğu HPLC cihazında floresans dedektörle ölçüldü. Sonuçlar nmol/μl olarak verildi.

2.10.2 *In vitro* Ortamda Yağ Asidi Miktarının Belirlenmesi

LPO miktarının ölçümü dışında kalan reaksiyon karışımı üzerine %2’ lik metanolik H₂SO₄ (v/v) konularak vortekslendi ve 16 saat 55°C’ de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, soğutulduktan sonra üzerine 5 ml %5’ lik NaCl ilave edildi. Reaksiyon ortamında oluşan yağ asidi metil esterleri 5ml n-hekzan ilave edildi [91]. Yağ asidi metil esterleri karışımı %2’ lik KHCO₃ ile muamele edildikten sonra çözücüsü uçuruldu. Yağ asidi metilesterleri karışımları n-hekzanda çözünerek gaz kromatografisi cihazında, yağ asidi metil esterleri SHIMADZU GC 17 gaz kromatografisi ile analiz edildi. Buanaliz için 25 m uzunluğunda, 0,25 μm iç çapında ve Pernabontd 25 mikron filmkalınlığına sahip Machery-Nagel (Germany) kapiller kolon kullanıldı. Analiz sırasındakolon sıcaklığı 120-220°C, enjeksiyon sıcaklığı 240°C ve dedektör sıcaklığı 280°C olaraktutuldu ve kolon sıcaklık programı 120°C’ den 220°C’ ye kadar ayarlandı. Sıcaklık artışı 200°C’ ye kadar 5°C /dakika ve 200°C’ den 220°C’ ye kadar 4°C /dakika olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında, standart yağ asidi metil esterleri enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Daha sonra örnekler ait yağ asidi metil esterlerinin analizi yapıldı. Bu işlemten sonra Class GC 10 programı kullanılarak yağ asitlerinin miktar hesaplaması yapıldı. Sonuçlar μg/ml olarak ifade edildi.

2.11. Antimikrobiyal Aktivite

2.11.1. Ekstrelerin Hazırlanışı

Araştırmada bitkilerin kullanılan kısımlarından 10 gr alınıp 200 ml metanol ilave edilip ekstraksiyona tabi tutuldu [92]. Elde edilen ekstraktların çözücülerini rotavaporda uzaklaştırılarak ve etüvde kurutularak kuru ekstraktlar elde edildi. Kurutulan ekstraktlar metanolde çözündürüldü.

2.11.2. Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması ve Aşılama

Bakteri suşları; Nutrient Buyyon' a aşılanarak $35\pm1^{\circ}\text{C}$ ' de 24 saat, maya suşları; Yeast Malt Ekstrakt Buyyon' da ve dermatofit funguslar Glukozlu Sabouroud Buyyon' da $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ' de 48 saat süre ile inkübe edildi. Sıvı besiyerinde gelişen kültürler, Mc Farland (0.5) standart tüpüne göre yoğunluk ayarı yapıldıktan sonra buyyon tüplerine aktarıldı. Erlenmayerde steril edilen ve $45-50^{\circ}\text{C}$ ' ye kadar soğutulan Müller Hinton Agar, Yeast Malt Ekstrakt Agar ve Sabouraud Dextrose Agar yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanıp bakteri, maya ve fungusların buyyondaki kültürü ile %1 oranında aşılanarak (106 bakteri/ml, 104 maya/ml, 104 fungus/ml) iyice çalkalandıktan sonra 9 cm çapındaki steril petri kutularına 15' er ml konuldu ve besiyerinin homojen bir şekilde dağılması sağlanmış oldu.

2.11.3. Oyuk Agar Metodu

Katılaştıran agar üzerine 6 mm çapında oyuk açıldı. Açılan oyuklara bir damla besiyerinden sonra 10 µl örnek aktarıldı. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C ' de 1.5-2 saat bekletildikten sonra bakteri aşılanan plaklar $37\pm1^{\circ}\text{C}$ ' de 24 saat, maya ve dermatofit aşılanan plaklar ise $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ' de 3 gün süre ile inkübe edildi. Çalışma 3 paralel olarak yürütülerek ve sonuçlar ortalama değer olarak inhibisyon zonu (mm) şeklinde değerlendirildi [93,94].

2.12. Mayaların Gelişme Ortamında Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi

Bu amaçla; öncelikle deneyde kullanılacak olan *Saccharomyces cerevisiae* FMC 16 ve *Kluveromyces lactis* COWAN 1'in gelişimi ve çoğalması için Malt Ekstrakt Buyyon (17 g/l) besiyeri ortamı hazırlandı. Besiyeri ortamı hazırlandıktan sonra aşağıdaki gruplara ayrıldı;

Kontrol :Sadece MEB besiyeri ortamı ilave edildi.

Kontrol 2 (P) :MEB besiyeri ortamı ve kullanılan bitki ekstraktları ilave edildi.

Bitki ekstraktı ile FR :MEB besiyeri ortamı ve bitki ekstraktları ilave edildi. Ayrıca inkübasyonun 24 saatinde bu gruba FR çözelti karışımı eklendi.

72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, gruplardaki örnekler % 4' lük BHT ilave edilerek daha ileri oksidasyon olması engellendi ve örnekler santrifüj edilerek hücre pelletinden ayrıldı.

Elde edilen pellet fosfat tamponu (pH: 7.4) ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra kalan pellete 3 ml TEA (0.03 M Tris, 114 µl Asetik asit, 0.5 M EDTA) tamponu ilave edildi ve 40 saniye sonikasyon yapıldı. Sonikasyon işleminden sonra +4°C' de 9000 rpm' de 10 dk süre ile santrifüj edilen örneklerin supernatant kısımları glutatyon ve protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla tüplere alındı.

Geriye kalan pellet kısmına ise hekzan/izopropanol eklenerek ortamdaki yağ asidi miktarları belirlendi. Deney sonunda ayrıca yağ asidi sentezinden sorumlu olan enzimlerin hem belirlenmesi hem de oksidasyon sonucundaki değişimlerinin de gözlemlenmesi amacıyla elektroforez işlemi de gerçekleştirildi.

2.12.1. Maya Hücrelerinde Glutatyon Miktarının Ölçülmesi

Bu amaçla elde edilen supernatanta 1 ml %10' luk TCA ilave edildi. Bu şekilde proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Karışım bu şekilde yaklaşık 10 dk oda sıcaklığında bekletilip bu sürenin sonunda 4500 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Proteinler çöktürüldükten sonra üst supernatant kısım başka bir deney tüpüne alınıp GSH miktarını ölçmek için aşağıdaki işlemler yapıldı. Supernatant kısım üzerine 0.3 M Na₂HPO₄ çözeltisinden 2 ml ilave edildi ve 1 ml 150 µM DTNB

çözültisi ilave edilerek karıştırıldı 5-10 sn sonra oluşan sarı renk oda sıcaklığında iyice stabil hale geldikten sonra 412 nm’ de blanka karşı okundu [95].

2.12.2. Glutasyon Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Örneklerdeki GSH miktarı tayini, saf GSH standardından (Merck) hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Bunun için; saf glutatyondan 10 ml için 0.002 g olacak şekilde hazırlandıktan sonra aşağıdaki şekilde gruplar oluşturuldu:

S1→ 20 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

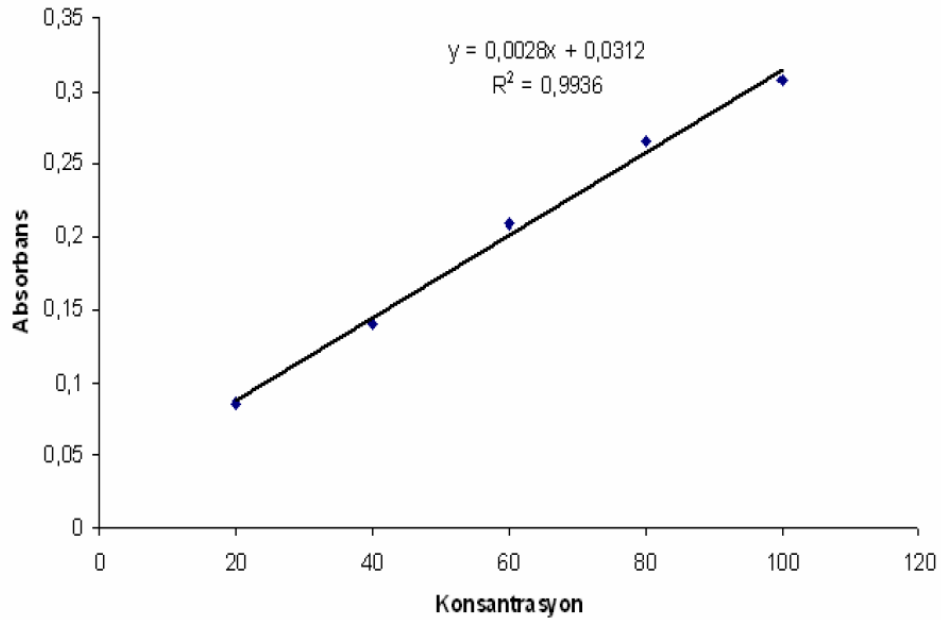
S2→ 40 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

S3→ 60 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

S4→ 80 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

S5→ 100 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

Gruplar stabil hale geldikten sonra 412 nm’ de blanka karşı okundu ve okunan değerlere göre Şekil 2’ de ki kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. GSH miktarının hesaplanmasında mg/g pellet miktarı cinsinden belirlendi.



Şekil 2. Glutasyon kalibrasyon eğrisi

2.12.3. Maya Hücrelerinde Total Protein Miktarının Ölçülmesi

Örneklerin total protein miktarlarının ölçümü Lowry yöntemine göre yapıldı [96]. Bunun için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı:

A= %1 (w/v) Bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi

B= %2 (w/v) Sodyum potasyum tartarat

C= 0.2 M Sodyum hidroksit

D= %4 (w/v) Sodyum karbonat

Protein ile ilgili deneyler için 49 ml C reaktifi üzerine 49 ml D reaktifi daha sonra 1 ml A ve 1 ml B reaktifinden ilave edildi. Bu çözeltilerin karışımından hazırlanan reaktife E solüsyonu adı verildi. Daha sonra protein çözeltisinden deney tüpüne alınıp üzerine 4 ml E reaktifinden ilave edilerek karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresi sonunda 500 μl Folin (10 ml Folin-Ciocalteu reaktifi üzerine 10 ml saf su ilave edilerek hazırlanır) karışımında eklenerek 30 dakika tekrar oda sıcaklığında bekletildi ve sonra 750 nm' de blanka karşı spektrofotometrede okundu.

Total protein ölçümünde maya hücresinde proteinler çöktürüldükten sonra elde edilen pellete 1 ml distile su ilave edilip vortekslendi, tekrar santrifüj edildi ve oluşan süpernatant da ölçüm yapıldı.

2.12.4. Protein Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Bu amaçla saf haldeki albuminden 10 ml için 0.003 gr olacak şekilde hazırlandıktan sonra standart grupları aşağıdaki şekilde hazırlandı:

S1→ 100 μl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

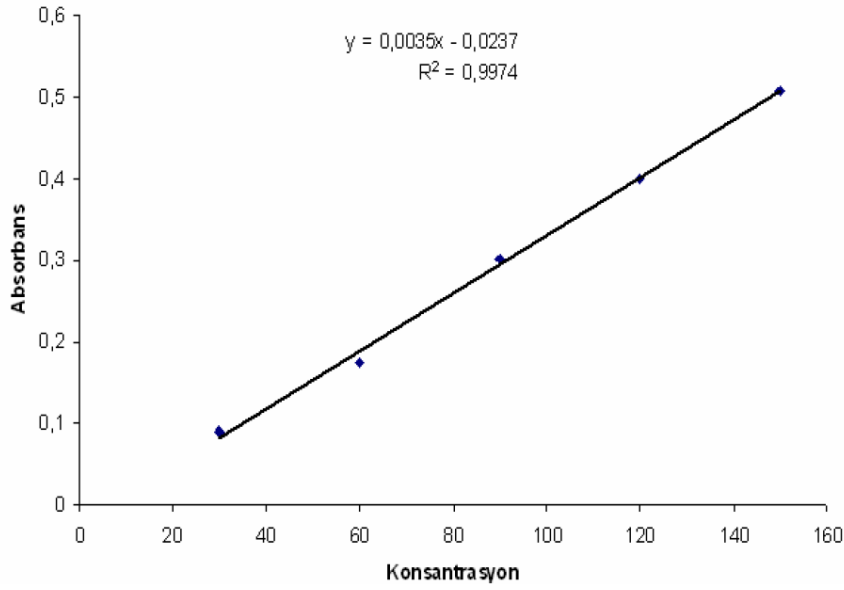
S2→ 200 μl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

S3→ 300 μl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

S4→ 400 μl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

S5→ 500 μl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

Gruplar 750 nm' de blanka karşı okundu ve okunan değerlere göre Şekil 3'de ki kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Örneklerin protein miktarları elde edilen bu kalibrasyon eğrisindeki denklem vasıtasıyla hesaplandı.



Şekil 3. Protein kalibrasyon eğrisi

2.12.5. Maya Kültürü Lipid peroksidasyon Miktarının Ölçülmesi

İnkübasyon sonrasında TEA tamponu ile sonikasyon edilen hücre peletleri +4 °C’de 9000 rpm 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen supernatantlardan 1 ml alındıktan sonra lipid peroksidasyon miktarı *in vitro* ortamda lipid peroksidasyon ölçüm basamakları aynen uygulanarak ölçüldü [90].

2.12.6. Maya Kültürü Lipidlerin Ekstraksiyonu

Maya örneklerinden lipidlerin ekstraksiyonu 3:2 (v/v) hekzan/izopropanol karışımının kullanıldığı Hara ve Radin metoduyla yapıldı. Sonikasyon işleminden sonra kalan pellet üzerine 10 ml hekzan-izopropanol ilave edilip, her örnek 5 dakika süre ile vortekslendi. Daha sonra 4500 rpm’de 10 dakika süre ile santrifüj edilen örneklerin supernatant kısmı alınarak kapaklı deney tüplerine konuldu [97].

2.12.7. Maya Kültürü Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Metil esteri hazırlamak için hekzan/izopropanol fazı içindeki lipid ekstraktı 30 ml’lik sızdırma yapmayan deney tüplerine alındı. Üzerine %2’lik metanolik sülfürik asitten 5 ml ilave edilip, vortekslendi. Bu karışım 55 °C’lik etüvde 16 saat süre ile metilleşmeye

bırakıldı. Metilleşme süresi sonrası tüpler etüvden çıkarılıp oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra üzerine 5 ml %5'lik sodyum klorür ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri 5 ml hekzan ile ekstre edilip, oluşan hekzan fazı alındı. Bu faz üzerine 5 ml %2'lik KHCO_3 ilave edildi ve tekrardan faz ayırımına bırakıldı. Daha sonra metil esterlerini içeren karışım, 45 °C'de ve azot akımı altında çözücüsü uçuruldu. Deney tüpleri içerisinde kalan lipid fazı 1 ml heptan ile çözülerek ağzı kapaklı otosampler viallere alındı ve gaz kromatografisinde analiz edildi [91].

2.12.8. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz kromatografik Analizi

Lipid ekstraktı içindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra SHIMADZU GC 17 cihazı ile analiz edildi. Bu analiz için 25 m uzunluğunda, 0,25 µm iç çapında ve PERMABOND 25 mikron film kalınlığına sahip Machery-Nagel (Alman) kapiller kolon kullanıldı.

Analiz sırasında kolon sıcaklığı 120–220 °C, enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve dedektör sıcaklığı 280 °C olarak tutuldu. Kolon sıcaklık programı 120 °C'den 220 °C'ye kadar ayarlandı. Sıcaklık artışı 200 °C'ye kadar 5 °C/dk ve 200 °C'den 220 °C'ye kadar 4 °C/dk olarak belirlendi. 220 °C'de 8 dakika tutulup, toplam süre 35 dakika olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında örnekler ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemten sonra gerekli programlama yapılarak örnekler ait yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapıldı [98].

2.13. SDS-PAGE Analizleri

Serbest ve serbest olmayan proteinlerin örnekleri Laemmli [99] tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile incelendi.

Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml' lik ayırma jel solusyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst

kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar (~1 cm) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi.

Tarak dişlerinin ara dolgu maddesi olarak ifade edilen yükleme jeli 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve otomatik pipet yardımıyla jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Yükleme jeli çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25-30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jelde meydana gelen ve örneklerin bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solusyonu; 0.125 M Tris (pH 6.8), %2' lik SDS, % 0.002 oranında bromofenol mavisi, %20' lik gliserol, %10' luk merkapttoethanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 µl olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solusyondan ilave edilip iyice karıştırıldı. Tarak dişinin genişliğine bağlı olarak, hazırlanan karışımdan 10–20 µl kadar transfer edildi. Tank içerisine yeterli miktarda tank solusyonu ilave edildi.

Güç kaynağından önce düşük voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. 5–10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180–200 V). Çıplak gözle izlenebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel %1.25' lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en çok bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solusyonundan alınan jel boyayı giderici solusyon (destain solution) ortamına alındı. Ara sıra çalkalanılarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solusyonda 5' er dakika bekletildi ve solusyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2–3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş oldu.

Kullanılan Çözeltiler

- 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)
- 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)
- %10 Sodyum dodesilsülfat çözeltisi (SDS)

- %30 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi
 - %10 Amonyum persülfat çözeltisi (APS)
 - N, N, N', N-tetrametil-ethylendiamin (TEMED)
 - Gliserin
 - 2-β-merkaptoethanol
 - %0.05 Bromofenol blue çözeltisi
 - Boyama çözeltisi (Stain solusyon/100 ml):
 - %0.1 Coomassie blue R-250
 - %45 Metanol
 - %10 Glasiyal asetik asit
 - %45 Distile su
 - Boya çıkarma çözeltisi (Destain solusyon/100 ml):
 - %45 Metanol
 - %10 Glasiyal asetik asit
 - %45 Distile su
 - Tank solusyonu (Running buffer, pH 8.3)
 - Tris base 9.0 gr
 - Glisin 43.0 gr
 - Distile su 600 ml
- SDS-PAGE İçin Jellerin Hazırlanması

2.14. İstatistik Analizi

İstatistik analizi için, SPSS 16.0 software programı kullanıldı. Kontrol grubu ile deneysel gruplar arasındaki karşılaştırma varyans analizi (ANOVA) ve LSD testleri kullanılarak yapıldı. Sonuçlar mean±SEM olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklarda $p>0.05$, $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ ve $p<0.0001$ değerleri kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Bitki Örneklerinin Resveratrol ve Flavonoid İçeriği

Flavonoid analizi sonuçlarına göre; bitki örneklerinin hepsinde rutin flavonoidinin yüksek oranda bulunduğu, diğer flavonoidlerin ise daha düşük oranlarda bulunduğu belirlendi (Tablo 1). Rutin içerikleri kendi aralarında karşılaştırıldığında en fazla içeriğe *Eremurus spectabilis* (ERA) grubunda en az içeriğin ise *Plumbago europaea* (PLM) grubunda ($p<0.0001$) olduğu görüldü. Grupların mirisetin içerikleri kendi aralarında kıyaslandığında, *Silene chlorifolia* (SLN) grubunun diğer gruplara kıyasla bu flavonoidi yüksek düzeyde içerdiği belirlendi ($p<0.0001$). Morin ve kuersetin içeriği SLN grubunda diğer gruplara göre önemli düzeyde yüksek bulundu ($p<0.0001$). Toplam flavonoid ve resveratrol miktarı gruplar arasında kıyaslandığında ise PLM grubunda ERA ve SLN gruplarına göre yüksek miktarda bu bileşiklere rastlandı ($p<0.0001$).

Tablo 1. Bitki ekstraktlarının flavonoid ve resveratrol içeriği ($\mu\text{g/g}$)

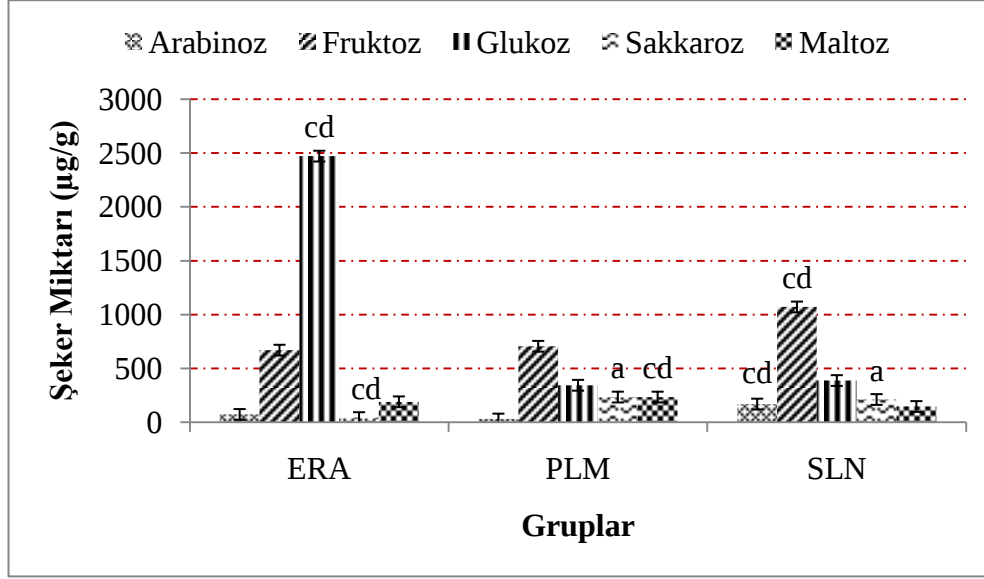
Flavonoid/ Gruplar	ERA	SLN	PLM
Rutin	216 $\pm$ 1,01	203,61 $\pm$ 0,83	23,61$\pm$4,28^{cd}
Mirisetin	-	229$\pm$4,47^{cd}	3,65 $\pm$ 0,15
Morin	0,17 $\pm$ 0,01	4,44$\pm$0,09^{cd}	0,35 $\pm$ 0,20
Kuersetin	0,17$\pm$0,2^a	0,08$\pm$0,04^{cd}	0,17$\pm$0,1^a
Kamferol	-	0,16$\pm$0,01^{cd}	-
Kateşin	-	-	1232,5$\pm$6,72^{cd}
Naringin	-	-	97,66$\pm$1,01^{cd}
Naringenin	-	-	4,73$\pm$0,09^{cd}
Resveratrol	0,86$\pm$0,02^{cd}	-	-
Toplam	217,2	437,29	1362,67^{cd}

a: $p>0.05$, cd: $p<0.0001$

3.2. Bitki Örneklerinin Şeker İçerikleri

Bitki örneklerinin şeker içeriğine bakıldığında (Şekil 4) bütün gruplarda fruktoz ve glukozun fazla miktarda bulunduğu tespit edildi. ERA grubuna bakıldığında diğer gruplara kıyasla glukoz oranı fazla miktarda ($p<0.0001$), sakkaroz ise oldukça düşük ($p<0.0001$) seviyede bulundu. PLM grubunun sakkaroz miktarı diğer gruplara kıyasla herhangi bir

farklılık ($p>0.05$) göstermedi ve maltoz miktarının ise oldukça fazla miktarda ($p<0.0001$) olduğu tespit edildi. SLN grubuna bakıldığında fruktoz diğer gruplara göre oldukça fazla miktarda ($p<0.0001$) bulundu. Grupların arabinoz miktarları kıyaslandığında ise SLN grubunda arabinozun önemli ölçüde ($p<0.0001$) yer aldığı tespit edilirken, sakkaroz miktarları arasında herhangi bir fark görülmedi ($p>0.05$).



Şekil 4. Bitki ekstraktlarının şeker içeriği (µg/g)

a: $p>0.05$, cd: $p<0.0001$

3.3. Bitki Örneklerinin Fitosterol ve ADEK Vitaminleri İçeriği

Bitki örneklerinin vitamin analizi sonuçlarına göre (Tablo 3) vitamin K₁ ve stigmasterol'ün diğer gruplara kıyasla SLN grubunda, vitamin D ve β-sitosterol miktarlarının ERA grubunda, ergosterol miktarının ise PLM grubunda oldukça fazla miktarda olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Retinol miktarı PLM ve SLN grupları arasında herhangi bir farklılık göstermezken ($p>0.05$), α tokoferol'ün ise ERA ve SLN grupları arasında oldukça düşük seviyede bir farklılık gösterdiği belirlendi ($p<0.05$).

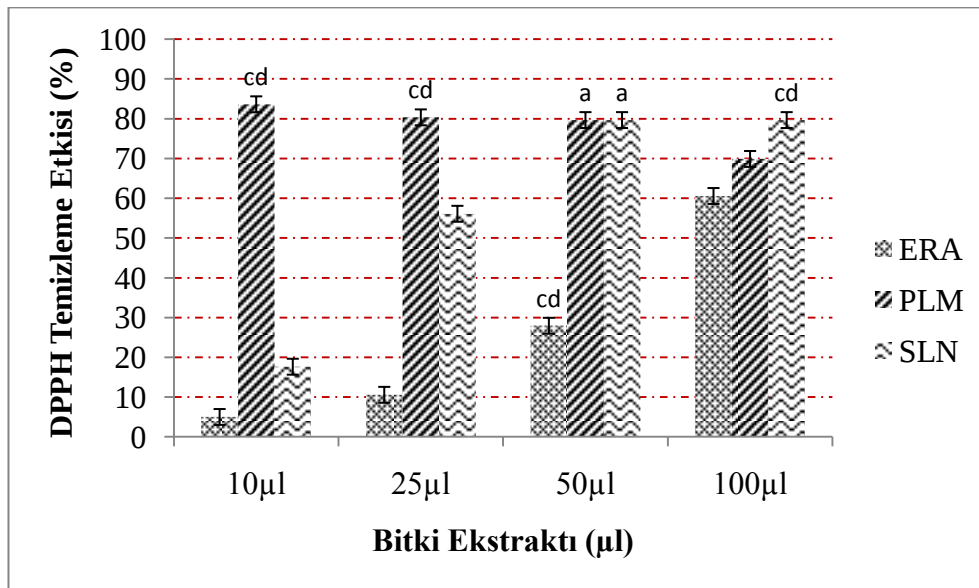
Tablo 2. Bitki ekstraktlarının lipofilik vitaminler ile fitosterol içerikleri (µg/g)

Lipofilik vitaminler ve fitosteroller	ERA	SLN	PLM
Vitamin K ₁	0,113±0,032	2,046±0,050^{cd}	0,620±0,052
Retinol	-	0,213±0,025^a	0,240±0,030^a
Vitamin D	3,420±0,075^{cd}	1,773±0,125	0,673±0,077
α Tokoferol	0,306±0,040^b	0,213±0,025^b	2,930±0,065
Ergosterol	0,680±0,115	1,596±0,066	11,526±0,170^{cd}
Stigmasterol	-	3,196±0,735^{cd}	-
β-sitosterol	13,970±0,550^{cd}	4,260±0,269	8,543±0,571

a:p>0.05, b:p<0.05, cd:p<0.0001

3.4. Bitki Örneklerinin DPPH Radikalini Giderme Aktivitesi

DPPH (α,α -Diphenyl-1-picrylhydrazyl) serbest radikalini temizleme sonuçlarına göre; ERA, PLM ve SLN gruplarının 10µl' den itibaren etkili oldukları belirlendi (Şekil 5). 10 µl ve 25 µl konsantrasyonlarda ki örnekler içerisinde en fazla etki PLM grubunda, 100 µl' de ise SLN grubunda görüldü ($p<0.0001$). 50 µl konsantrasyonda ise PLM ve SLN arasında bir fark görülmezken ($p>0.05$), ERA grubunda önemli ölçüde azalma görüldü ($p<0.0001$). Konsantrasyona bağlı olarak gruplar karşılaştırıldığında ise PLM grubunun en yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu belirlendi.

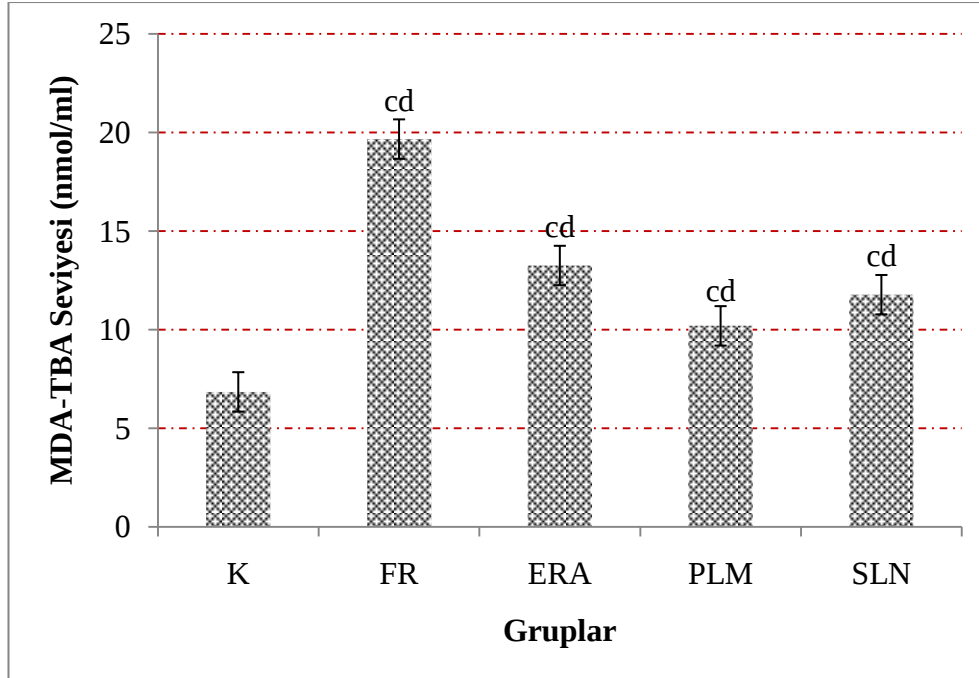


Şekil 5. Bitki estraktlarının DPPH radikalini temizleme etkisi (%)

a:p>0.05, cd:p<0.0001

3.5. Bitki Örneklerinin *In vitro* Ortamda ki Antioksidan Etkileri

Lipid peroksidasyon düzeyi kontrol (K) grubuna göre kıyaslandığında, $\text{FeCl}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ içeren (FR) grupta çok belirgin düzeyde yüksek olduğu saptandı ($p<0.0001$) (Şekil 6). Bitki grupları K grubuna göre kıyaslandığında her üç grupta da önemli düzeyde yükselme görüldü ($p<0.0001$). Buna karşılık FR grubuyla bitki grupları karşılaştırıldığında ise FR grubuna göre belirgin düzeyde bir azalma tespit edildi ($p<0.0001$). Bitki grupları kendi aralarında kıyaslandığında da ERA grubunun PLM ve SLN gruplarına göre SLN grubunun da PLM grubuna göre önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p<0.0001$).



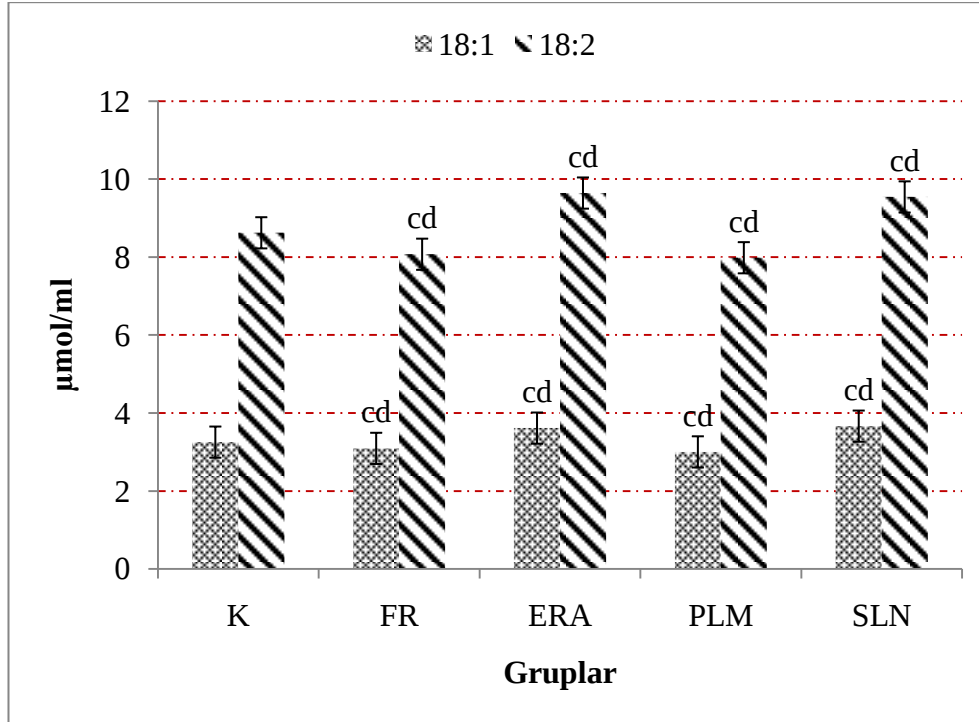
Şekil 6. Bitki ekstraktlarının *in vitro* ortamda lipid peroksidasyonu üzerine antioksidan etkileri (nmol/ml)

cd:p<0.0001

3.6. Bitki Ekstraktlarının *In vitro* Ortamda ki Yağ Asidi Metil Esterleri Üzerine Etkileri

FR grubuna göre bitki örneklerinin yağ asidi miktarları karşılaştırıldığında, oleik ve linoleik asidi miktarlarının bitki ekstraktı içeren gruplarda önemli düzeylerde korunduğu belirlendi (Şekil 7). Ancak, kontrol grubuna göre kıyaslandığında FR içeren gruptaki yağ

asidi oranlarında önemli azalmalar olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). FR grubuna göre bitki ekstraktlarının linoleik asit (18:2, n-6) miktarları karşılaştırıldığında bu yağ asidinin gruplarda korunduğu ve miktarın FR grubuna göre fazla miktarlarda olduğu belirlendi ($p<0.0001$). Oleik asit (18:1, n-9) miktarında FR grubuna göre bitki ekstraktı içeren gruplarda yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.0001$).

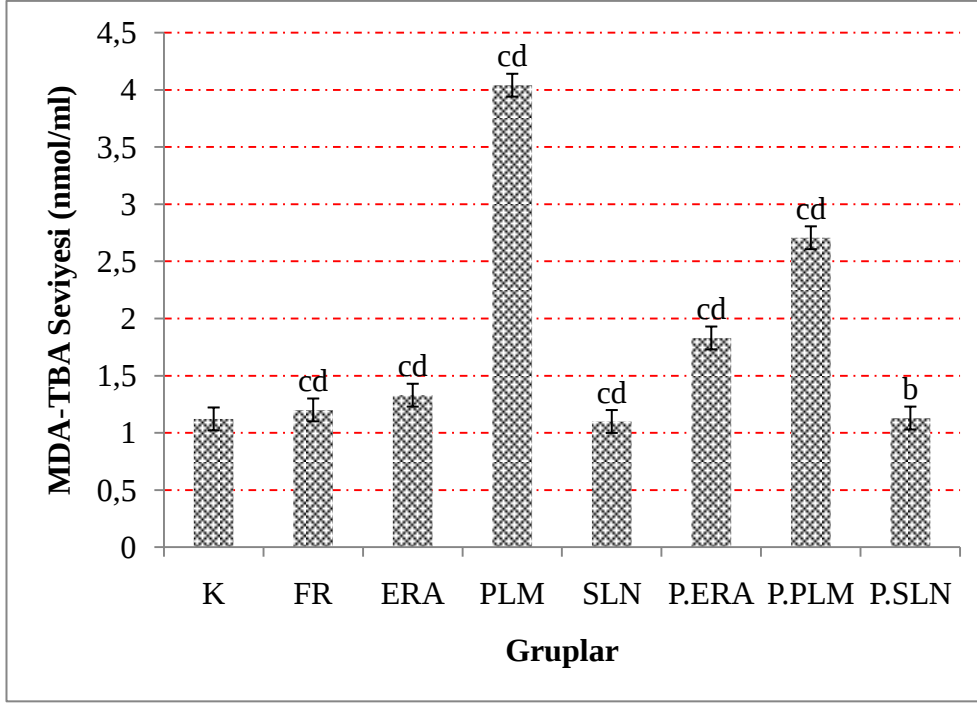


Şekil 7. Bitki ekstraktlarının *in vitro* ortamda metil esterleri üzerine etkisi (µmol/ml)

cd: $p<0.0001$

3.7. Bitki Ekstraktlarının *S. cerevisiae*' da ki Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

S. cerevisiae' da ki lipid peroksidasyon miktarı kontrol grubuna kıyasla FR gruplarında artış gösterdi ($p<0,05$, $p<0,0001$). K grubu ile bitki grupları LPO miktarı bakımından kıyaslandığında ise SLN grubunda önemli düzeyde düşüş gözlenirken ($p<0,0001$), diğer bitki gruplarında önemli düzeyde artış belirlendi ($p<0,0001$). MDA-TBA seviyesi en yüksek olan bitki grubu ise PLM olarak tespit edildi (Şekil 8).



Şekil 8. Bitki ekstraktlarının *S. cerevisiae* 'nın MDA-TBA seviyesi (nmol/ml)

b:p<0.05,cd:p<0.0001

3.8. Bitki Ekstraktlarının *S. cerevisiae* 'nın Yağ Asidi İçeriği Üzerine Etkisi

Bitki ekstraktlarının *S. cerevisiae* 'nın yağ asidi içeriği üzerine etkisi incelendiğinde; Palmitik asit (16:0) miktarının K ve FR' ye göre bitki ekstraktı içeren gruplarda önemli ölçüde arttığı saptandı ($p<0.0001$) (Tablo 3). Bitki grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise 16:0 yağ asidi en fazla besiyeri+*Silene chlorifolia* (P.SLN) grubunda görüldü ($p<0.0001$).

Palmitoleik (16:1, n-7) asit üzerindeki etkilere bakıldığında K ve FR grupları arasında önemli bir fark görülmedi ($p>0.05$). K ve FR gruplarına göre kıyaslandığında SLN, PLM ve P.SLN gruplarında önemli ölçüde artış görülürken ERA, P.PLM ve P.ERA gruplarında önemli düzeyde azalma tespit edildi ($p<0.0001$).

Stearik asit (18:0) düzeyleri incelendiğinde FR grubunda K grubuna göre önemli düzeyde arttığı ($p<0.0001$) FR ile ERA grupları arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı ($p>0.05$), PLM grubunun K ve FR gruplarına göre önemli düzeyde azaldığı ($p<0.0001$) ve SLN, P.ERA, P.PLM ile P.SLN gruplarının K ve FR gruplarına kıyasla önemli düzeyde arttığı ($p<0.0001$) belirlendi.

Oleik (18:1) yağ asidinde K grubunun FR grubuna göre önemli derecede artış gösterdiği belirlendi ($p<0.0001$). ERA grubu FR grubuna göre belirgin bir azalma gösterirken ($p<0.0001$) diğer bitki gruplarının hepsinde K ve FR gruplarına göre belirgin bir artış tespit edildi ($p<0.0001$). P.ERA ve P.PLM grupları arasında ise istatistiksel bir fark görülmedi ($p>0.05$).

Linoleik asit (18:2) miktarları incelendiğinde FR grubuna göre K ve diğer bütün bitki gruplarında önemli derecede artış görüldü ($p<0.0001$). Bitki grupları kendi aralarında incelendiğinde ise en fazla linoleik asit miktarını P.SLN grubunda tespit edildi ($p<0.0001$).

Linolenik asit (18:3) miktarlarına bakıldığında K ve FR gruplarına göre bitki gruplarının hepsinde yüksek düzeyde olduğu, bitki grupları da kendi içinde incelendiğinde de SLN grubunun yüksek düzeyde 18:3 yağ asidi içerdiği görüldü ($p<0.0001$).

Diğer yağ asitlerinin miktarları incelendiğinde ise K grubuna göre FR ve diğer bütün bitki gruplarının oldukça yüksek seviyede oldukları görüldü ($p<0.0001$). Bitki gruplarında kendi arasında incelendiğinde diğer yağ asitlerinin en fazla bulunduğu grup P.ERA olarak belirlendi ($p<0.0001$).

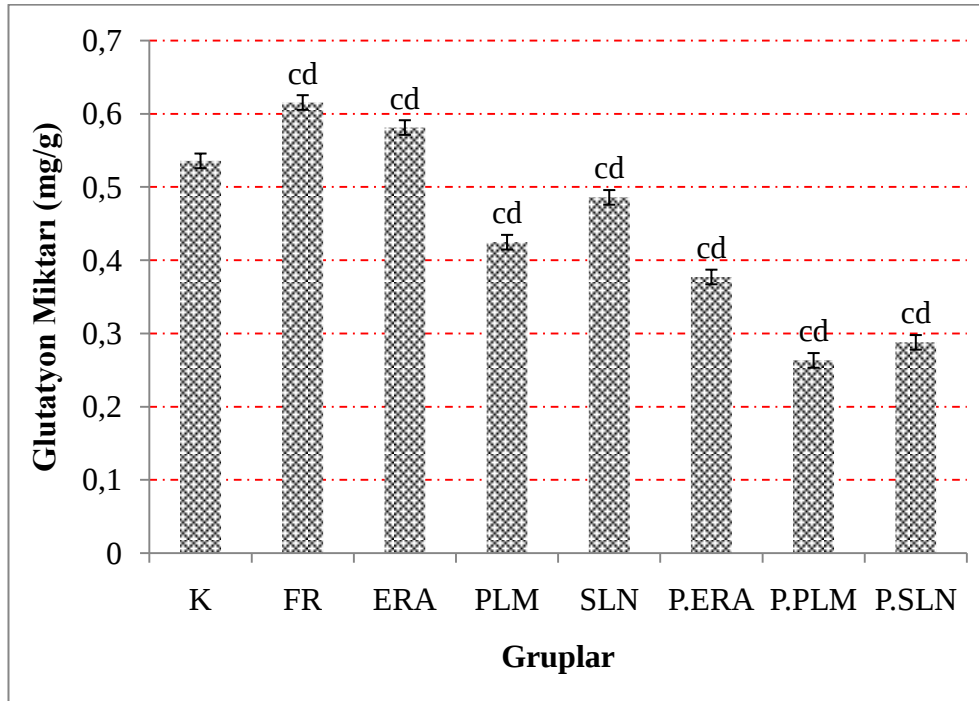
Tablo 3. Bitki ekstraktlarının *S. cerevisiae* 'nın yağ asidi içeriği üzerine etkisi (mg/g)

Yağ asitleri/ Gruplar	Kontrol	FR	ERA	PLM	SLN
16:0	0,532±0,02	0,559±0,01	0,606±0,002	0,720±0,02	1,019±0,05
16:1	0,359±0,006^a	0,359±0,005^a	0,327±0,005	0,407±0,001	0,549±0,006^{cd}
18:0	0,239±0,002	0,247±0,006	0,247±0,007	0,226±0,005	0,361±0,001
18:1	0,171±0,001	0,147±0,003	0,132±0,002	0,232±0,001	0,239±0,007
18:2	0,25±0,02	0,22±0,01	0,090±0,004	0,176±0,006	0,302±0,002
18:3	0,04±0,01	0,05±0,01	0,290±0,009	0,487±0,003	1,186±0,002^{cd}
Diğerleri	0,128±0,002	0,252±0,002	0,328±0,002	0,663±0,005	0,702±0,002
Yağ asitleri/ Gruplar	Kontrol	FR	P.ERA	P.PLM	P.SLN
16:0	0,532±0,02	0,559±0,01	0,908±0,01	0,604±0,03	1,208±0,05^{cd}
16:1	0,359±0,006^a	0,359±0,005^a	0,342±0,007	0,320±0,006	0,437±0,009
18:0	0,239±0,002	0,247±0,006	0,745±0,005	0,264±0,003	0,912±0,001^{cd}
18:1	0,171±0,001	0,147±0,003	0,211±0,001^a	0,211±0,001^a	0,228±0,002
18:2	0,25±0,02	0,22±0,01	0,192±0,006	0,139±0,007	0,364±0,003^{cd}
18:3	0,04±0,01	0,05±0,01	0,548±0,001	0,555±0,005	1,057±0,002
Diğerleri	0,128±0,002	0,252±0,002	1,153±0,005^{cd}	0,542±0,002	0,696±0,005

a: $p>0.05$, cd: $p<0.0001$

3.9. Bitki Ekstraktlarının *S. cerevisiae*' nin Glutasyon Miktarı Üzerine Etkisi

Glutasyon miktarları K grubuna göre karşılaştırıldığında FR ve ERA grubunda önemli ölçüde arttığı ($p<0.0001$), diğer bitki gruplarında ise önemli ölçüde azaldığı ($p<0.0001$) tespit edildi. Bitki grupları FR grubuna göre kıyaslandığında ise bütün gruplarda belirgin bir şekilde azaldığı belirlendi ($p<0.0001$) (Şekil 9).

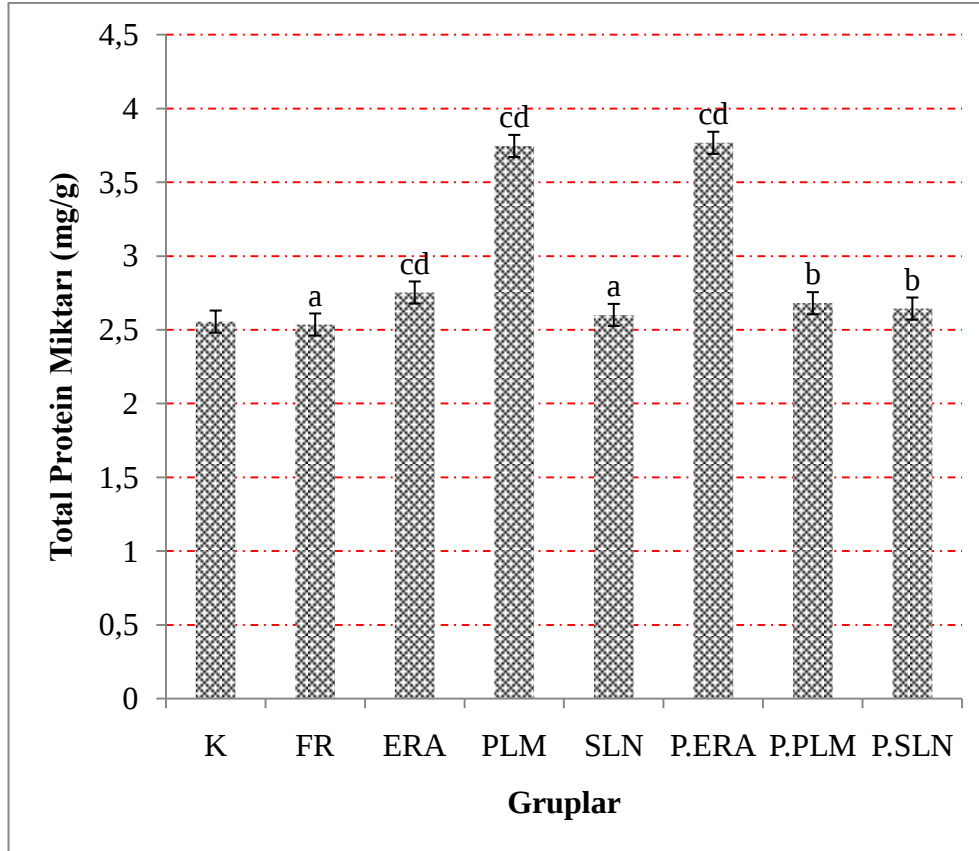


Şekil 9. Bitki ekstraktlarının *S. cerevisiae*' da ki glutasyon miktarı üzerine etkisi (mg/g)

cd: $p<0.0001$

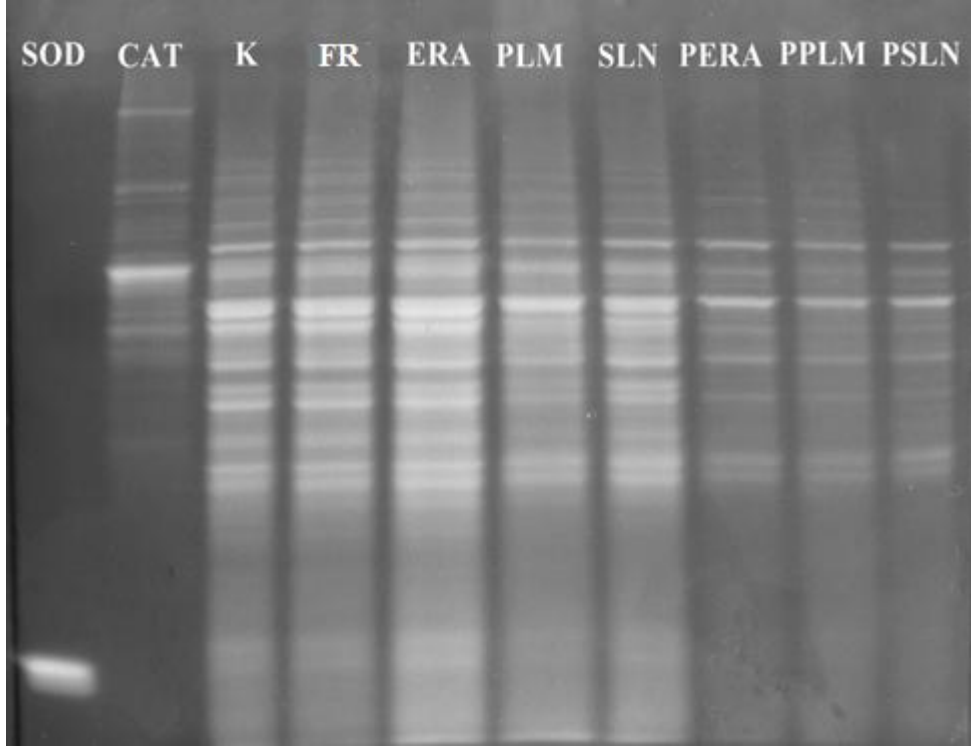
3.10. Bitki Ekstraktlarının *S. cerevisiae*' da ki Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi

Bitki ekstraktlarının maya hücresi üzerindeki total protein miktarı üzerine olan etkilerini incelendiğinde K grubu ile FR ve SLN grupları arasında herhangi bir fark görülmedi ($p>0.05$) (Şekil 10). K grubuna göre bitki grupları incelendiğinde ise ERA, PLM, P.PLM, P.SLN ve P.ERA gruplarının önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Bitki grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında da P.PLM ve P.SLN arasında önemli bir fark görülmedi ($p<0.05$).



Şekil 10. Bitki ekstraktlarının *S. cerevisiae*'nin total protein miktarı üzerine etkisi (mg/g)
a:p>0.05, b:p<0.05, cd:p<0.0001

3.11. *S. cerevisiae*' nin SDS-Page Analizi



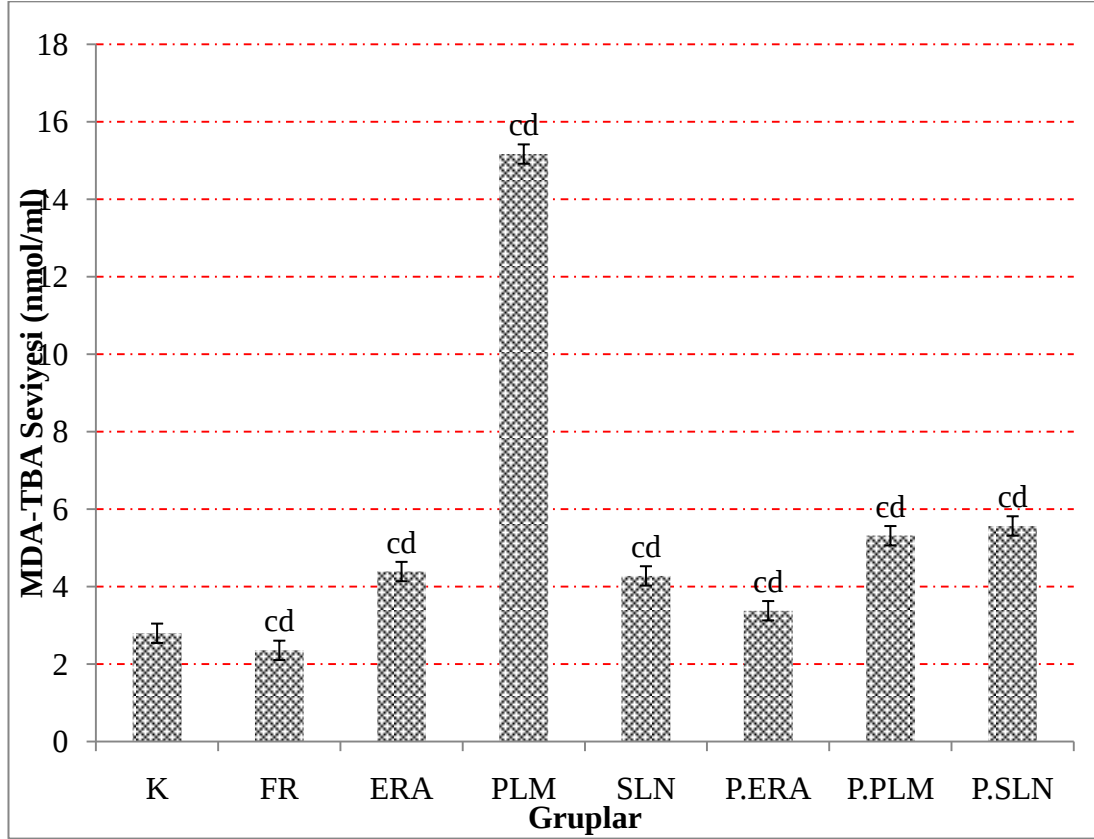
Şekil 11. *S. cerevisiae*' nin SDS-Page analizi

SDS-PAGE jel görüntüsü değerlendirilecek olursa; Jelde yer alan ilk iki bant standart olarak yüklenen SOD ve CAT enzimlerininidir. Gruplarda ki SOD miktarını gösteren protein bandı K, ERA ve FR gruplarında belirgindir. CAT miktarı Kontrol grubuna kıyasla ERA ve FR gruplarında protein bandının belirginliği bu enzimin ekspresyonun miktarının arttığını göstermektedir. FR' nin gruplarda enzimin ekspresyon düzeyini arttığı bantların belirgin olmasından anlaşılmaktadır. Sadece ekstrakt ve maya içeren kültürlerde protein bantlarının zayıflığı bu gruplarda ekspresyon düzeyinin düşük olduğu anlamına gelmektedir. Sonuç olarak radikal ilavesi maya kültüründe protein miktarını arttırmıştır.

3.12. Bitki Ekstraktlarının *K. lactis*' in Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

K. lactis' de ki lipid peroksidasyon miktarı K grubuna kıyasla FR gruplarında önemli bir azalma gösterdi ($p < 0,0001$). Kontrol grubu ile bitki grupları LPO miktarı bakımından

kıyaslandığında ise bütün gruplarda önemli düzeyde artış gözlemlendi ($p<0,0001$). MDA-TBA seviyesi en yüksek olan bitki grubu ise PLM olarak saptandı (Şekil 12).



Şekil 12. Bitki ekstraktlarının *K. lactis*' in MDA-TBA seviyesi (nmol/ml)

cd: $p<0.0001$

3.13. Bitki Ekstraktlarının *K. lactis*' in Yağ Asidi İçeriği Üzerine Etkisi

Bitki ekstraktlarının *K. lactis*' in yağ asidi profili üzerine etkisi incelendiğinde (Tablo 4); Palmitik asit (16:0) miktarının K grubuna göre P.ERA ve SLN dışındaki bütün gruplarda önemli derecede yüksek olduğu saptandı ($p<0.0001$). Bitki grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında ise en yüksek içerik P.PLM grubunda tespit edildi ($p<0.0001$).

Palmitoleik (16:1, n-7) asit üzerindeki etkilere bakıldığında FR, ERA, PLM, P.PLM ve P.SLN gruplarında K grubuna göre oldukça yüksek olduğu P.ERA grubunun ise önemli miktarda azaldığı görüldü ($p<0.0001$). Bitki grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında en yüksek miktar P.PLM grubunda tespit edildi ($p<0.0001$).

Stearik asit (18:0) düzeyleri incelendiğinde K grubuna göre FR ve PLM grubunda oldukça yüksek miktarda tespit edildi. PLM dışında ki bitki grupları ise K grubuna göre

oldukça düşük seviyedeysen PLM grubu bitki grupları içerisinde ki en yüksek miktar olarak belirlendi ($p<0.0001$).

Oleik (18:1) yağ asidinde K grubuna göre SLN ve P.ERA dışındaki bütün gruplarda oldukça yüksek olduğu görüldü ($p<0.0001$). Bitki grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise en yüksek grup P.PLM grubu olarak belirlendi ($p<0.0001$).

Linoleik asit (18:2) miktarları K grubuna kıyasla FR grubunda oldukça yüksek bulundu. Kontrol grubu ile P.ERA grubu arasında istatistiksel bir farklılık bulunmazken ($p>0.05$), diğer bitki gruplarında 18:2 miktarı önemli düzeyde artış gösterdi ($p<0.0001$).

Linolenik asit (18:3) miktarlarına bakıldığında FR grubunun K grubuna göre oldukça yüksek olduğu ($p<0.0001$), K ve FR gruplarına göre de bitki gruplarının hepsinde 18:3 yağ asidinin yüksek düzeyde olduğu ($p<0.0001$), bitki grupları da kendi içinde incelendiğinde de P.SLN grubunun yüksek düzeyde 18:3 yağ asidi içerdiği görüldü ($p<0.0001$).

Diğer yağ asitlerinin miktarları incelendiğinde ise K grubuna göre FR ve diğer bütün bitki gruplarının oldukça yüksek seviyede oldukları bulundu ($p<0.0001$). Bitki gruplarında kendi arasında incelendiğinde diğer yağ asitlerinin en fazla bulunduğu grup PLM olarak belirlendi ($p<0.0001$).

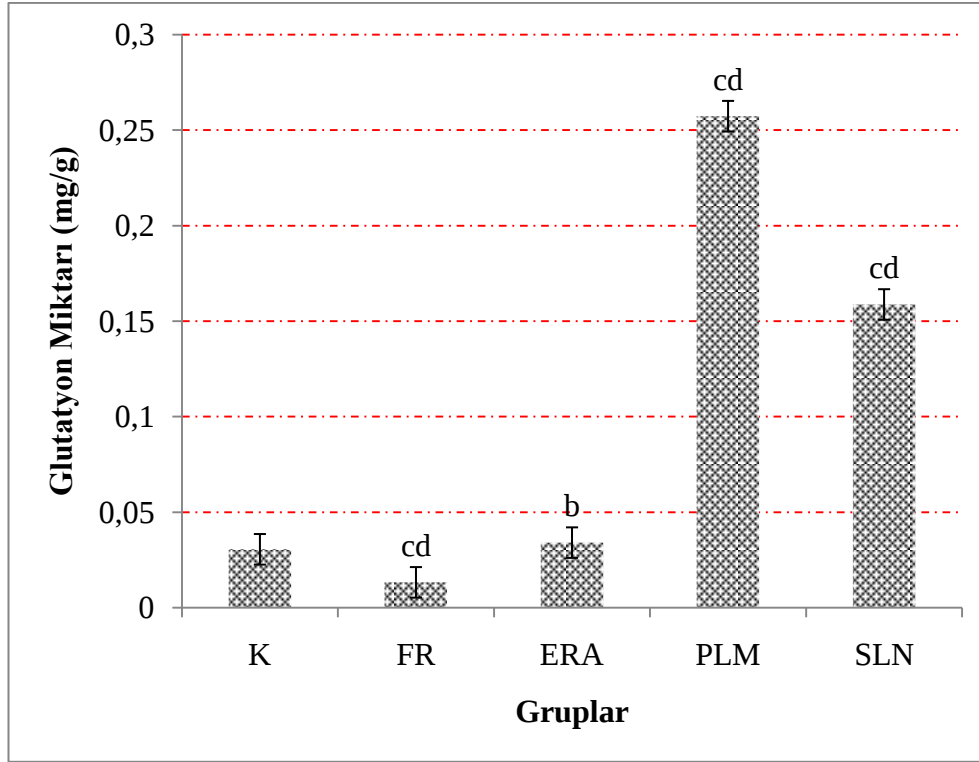
Tablo 4. Bitki ekstraktlarının *K. lactis* ' in yağ asidi profili üzerine etkisi (mg/g)

Yağ asitleri/ Gruplar	Kontrol	FR	ERA	PLM	SLN
16:0	0,363±0,003	0,919±0,005	0,888±0,008	2,058±0,003	0,269±0,002
16:1	0,118±0,001	0,171±0,002	0,220±0,086	0,572±0,006	0
18:0	0,507±0,007	0,638±0,007	0,260±0,004	2,012±0,046^{cd}	0,110±0,003
18:1	0,081±0,002	0,337±0,007	0,320±0,002	0,641±0,004	0
18:2	0,126±0,007	0,340±0,04^{cd}	0,508±0,003	0,612±0,002	0,371±0,005
18:3	0,049±0,004	0,146±0,008	1,130±0,004	1,390±0,002	0,652±0,003
Diğerleri	0,082±0,002	0,761±0,004	0,379±0,004	0,899±0,006^{cd}	0,403±0,005
Yağ asitleri/ Gruplar	Kontrol	FR	P.ERA	P.PLM	P.SLN
16:0	0,363±0,003	0,919±0,005	0,161±0,02	1,413±0,13^{cd}	1,280±0,01
16:1	0,118±0,001	0,171±0,002	0,080±0,03	0,669±0,02^{cd}	0,489±0,03
18:0	0,507±0,007	0,638±0,007	0,072±0,02	0,428±0,2	0,315±0,05
18:1	0,081±0,002	0,337±0,007	0,048±0,45	0,741±0,04^{cd}	0,279±0,03
18:2	0,126±0,007	0,340±0,04^{cd}	0,113±0,03^a	0,810±0,06	1,240±0,315^{cd}
18:3	0,049±0,004	0,146±0,008	0,236±0,07	2,089±0,04	2,853±0,007^{cd}
Diğerleri	0,082±0,002	0,761±0,004	0,089±0,03	0,518±0,05	0,179±0,04

a:p>0.05,cd:p<0.0001

3.14. Bitki Ekstraktlarının *K. lactis* ' in Glutasyon Miktarı Üzerine Etkisi

Glutasyon miktarları K grubuna göre karşılaştırıldığında FR grubunda önemli ölçüde azaldığı ($p<0.0001$), PLM ve SLN gruplarında ise önemli ölçüde arttığı ($p<0.0001$) tespit edildi. K grubuna göre ERA grubunda önemli bir fark tespit edilmedi ($p<0.05$). Bitki grupları FR grubuna göre kıyaslandığında ise bütün grupların belirgin bir şekilde arttığı belirlendi ($p<0.0001$).

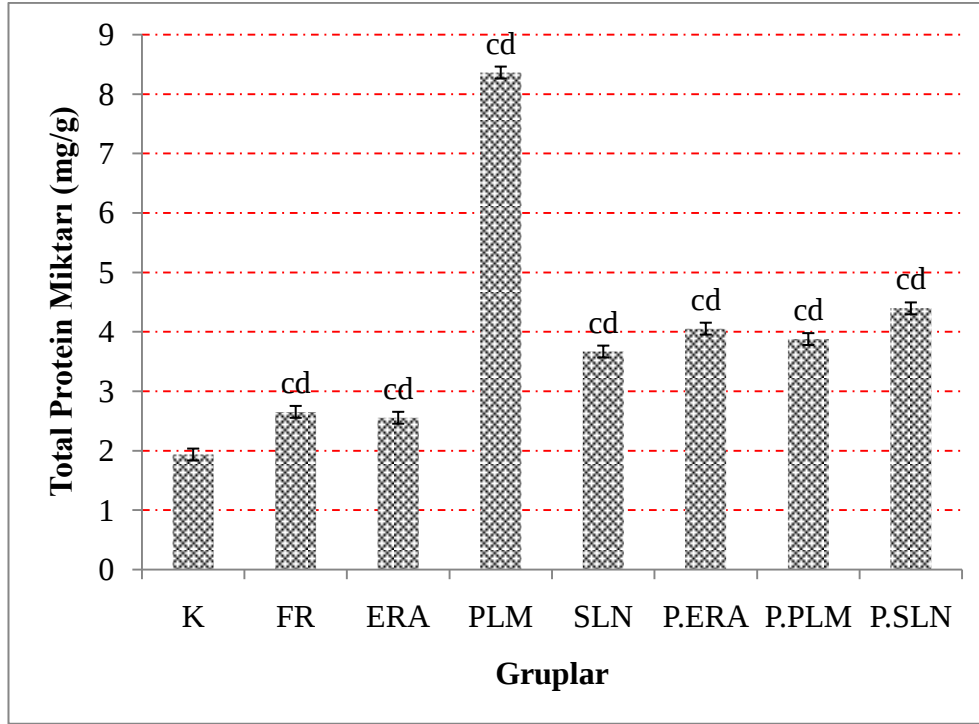


Şekil 13. Bitki ekstraktlarının *K. lactis*' in glutasyon miktarı üzerine etkisi (mg/g)

b:p<0.05, cd:p<0.0001

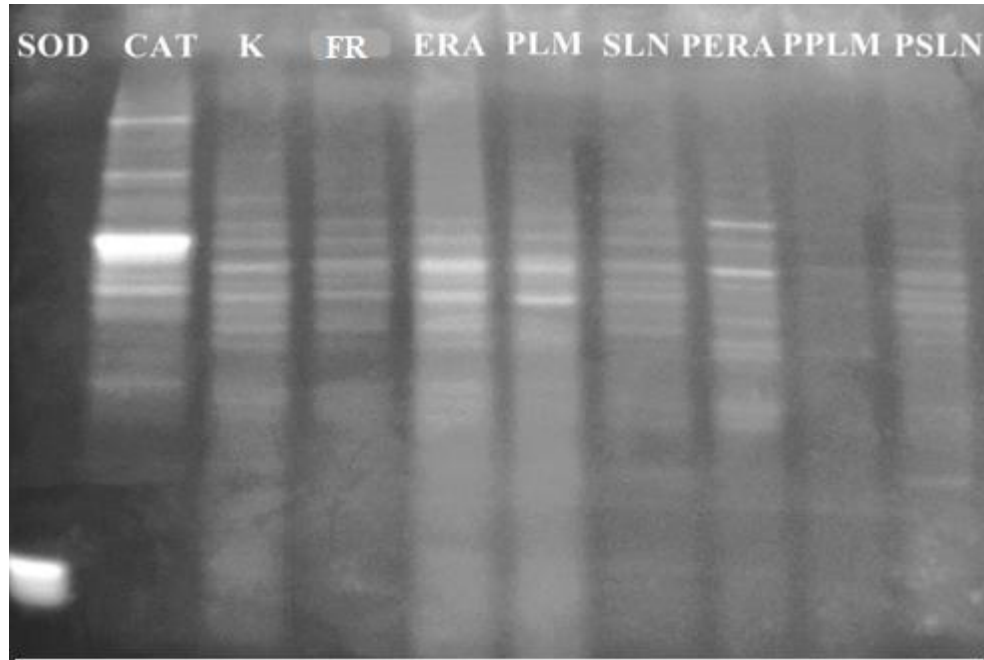
3.15. Bitki Ekstraktlarının *K. lactis*' in Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi

Bitki ekstraktlarının maya hücresi üzerindeki total protein miktarı üzerine olan etkilerini incelediğimizde K grubuna göre bütün gruplar grupların önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.0001$). Bitki grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise PLM grubunda önemli miktarda bir artış tespit edildi ($p<0.0001$).



Şekil 14. Bitki ekstraktlarının *K. lactis*' in total protein miktarı üzerine etkisi (mg/g)
cd:p<0.0001

3.16. *K.lactis*' in SDS-Page Analizi



Şekil 15. *K. lactis*' in SDS-Page analizi

SDS-PAGE jel görüntüsü değerlendirilecek olursa; Jelde yer alan ilk iki bant standart olarak yüklenen SOD ve CAT enzimleridir. Gruplarda ki SOD miktarını gösteren protein bandı ERA ve PLM gruplarında kısmen belirgindir. CAT miktarı incelendiğinde PLM, ERA ve PERA gruplarında protein bandının belirginliği bu enzimin ekspresyonun miktarının arttığını göstermektedir. FR' nin gruplarda enzimin ekspresyon düzeyini arttırdığı bantların belirgin olmasından anlaşılmaktadır. Sadece ekstrakt ve maya içeren kültürlerde protein bantlarının zayıflığı bu gruplarda ekspresyon düzeyinin düşük olduğu anlamına gelmektedir. Sonuç olarak radikal ilavesi maya kültüründe protein miktarını arttırmıştır.

3.17. Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi

Çalışmada kullanılan bitki grubu metil alkol ekstraktlarının bazı patojen bakteri, maya ve dermofitlere karşı antimikrobiyal aktiviteleri Tablo 5' de gösterilmiştir. Genel olarak bitki örneklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; bitki örneklerinin mikroorganizma grupları üzerinde etkili olduğu, bu etkinin maya ve dermofit funguslara göre bakteri gruplarında daha belirgin olduğu saptandı.

Bitkilerden ERA' nin en fazla *E. coli* (14 mm), *S. aureus* (12 mm), *C. albicans* (9mm), ve *Epidermophyton sp.* (8mm) üzerinde etkili olduğu belirlendi. SLN' nin *E.coli* üzerinde 22 mm' lik bir inhibisyon zonu oluşturduğu bu zonun *Epidermophyton sp.* üzerinde 12 mm, *S. aureus* üzerinde 10 mm, *C. albicans* üzerinde 8 mm. olduğu saptandı. PLM' nin en fazla *S. aureus* üzerinde aktivite gösterdiği (23mm) belirlendi. Diğer mikroorganizma gruplarının ise sırasıyla *E. coli* (15 mm) ve *C. albicans* (11 mm) olduğu belirlendi.

Tablo 5. Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi

Gruplar	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.albicans</i>	<i>E. sp.</i>
ERA	12	14	9	8
SLN	10	22	8	12
PLM	23	15	11	-

4. TARTIŞMA

Doğal besinlerin antioksidan aktivitelerini araştırmaya yönelik çalışmalar son yıllarda giderek artmaktadır. Çoğu meyve ve sebzenin içeriğinde yer alan şekerler, vitaminler, fenolik bileşikler ve fitosteroller besin değerlerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar.

- ***In vitro* Ortamda Bitki Ekstraktlarının Etkisi**

Analiz sonuçlarında, bitki örneklerinden 9 farklı flavonoid türü tespit edildi, ERA grubunun resveratrol ihtiva ettiği bununla beraber flavonoid içeriğine bakıldığında ise ERA grubunun Rutin bakımından zengin olduğu belirlendi.

Bitki gruplarının toplam flavonoid içeriklerine bakıldığında en yüksek içerik PLM grubunda bulundu. PLM grubunun Kateşin bakımından zengin olduğu tespit edildi. SLN grubunun da mirisetin bakımından oldukça zengin olduğu görüldü.

Plumbago cinsine ait bazı bitkiler çalışılmış, *P. zeylanica*' da total flavonoid içeriği 45.5 ± 5.2 mg GAE/g olarak bulunmuştur [100] Yine aynı bitkinin total fenolik içeriği 109 mg/g olarak belirlenmiştir [101]. *Plumbago europea* yapraklarında ise yeni bir flavonol olan 7-O-methylmyricetin (europetin) maddesi tespit edilmiştir [102].

Son yıllarda özellikle epidemiyolojik çalışmalar flavonoidler bakımından zengin bir beslenme ile kronik kalp hastalıkları ve kanser riskinin azaltılması arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir [103,104]. Flavonoid içeriği bitkiden bitkiye göre hatta aynı bitkinin farklı organlarında bile değişiklik gösterir [105]. Flavonoidler bakımından zengin bir beslenmenin A ve C vitamininden bile daha güçlü antioksidan etkisi olduğu düşünülmektedir [106].

Araştırmamızda bitkilerin şeker içeriklerinin incelenmesinde ERA grubunda glukoz, PLM grubunda Fruktoz, SLN grubunda da yine fruktozun fazla miktarlarda yer aldığı görüldü.

Eremurus cinsine ait bazı türlere ait çalışmalar incelendiğinde, *Eremurus zangezuricus*' da glucomannan bulunduğu belirtilmiştir. Glukomannanın kimyasal bileşimi de %25.6 D-glukoz, D-mannoz, %71.8 D-mannoz olarak saptanmıştır. Bu sonuç bizim çalışmamızda ki ERA grubunun şeker içeriği ile uygunluk göstermektedir [107].

Eremurus anisopterus' un köklerinden birçok polisakkarit bulunduğu bildirilmiş ve galaktomannan saf olarak elde edilmiştir [108].

Plumbago cinsine ait bazı bitkilerin şeker içerikleri araştırılmış, *Plumbago zeylanica* Linn Syn. ve *Plumbago rosea* Linn. bitkilerinin kök kabuğundan fruktoz ve glukoz izole edilmiştir [109]. Bu çalışma çalışmamızda yer alan PLM grubunun yüksek miktarda fruktoz ve glukoz ihtiva etmesini desteklemektedir.

Silene türlerine ait nektarlardaki şeker içeriklerinin araştırılmasında da yüksek miktarda fruktoz tespit edilmiştir [110].

Bitki ekstraktlarının vitamin ve fitosterol içeriklerine bakıldığında ERA grubunda β -sitosterol ve Vitamin D, SLN grubunda Stigmasterol ve Vitamin K₁ PLM grubunda ise Ergosterol ve β -sitosterol miktarlarının oldukça fazla olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda yer alan bitkilerin ait olduğu cinse bağlı bazı türlerin literatürleri incelendiğinde, *Plumbago zeylanica*' nın β -sitosterol bileşenine sahip olduğu [109], *Silene conoidea*' da stigmasterol bulunduğunu belirlemişlerdir [111]. Bu sonuçlar bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Tüm bu analizlere ilaveten çalışmamızda bitki örneklerimizin antioksidan kapasiteside araştırılmıştır. Bu amaçla bitki gruplarının DPPH radikalini temizleme etkisine bakıldığında bütün grupların radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu belirlendi ve bütün gruplar içerisinde de en yüksek aktivite PLM grubunda görüldü.

Plumbago europea' nın DPPH ve 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) ABTS radikalini temizleme etkisini araştırılmasında; ABTS sonucunu 13.92 ± 0.05 mg/ml, DPPH sonucunu ise 19.82 ± 0.05 mg/ml olarak bildirmişlerdir [83]. Bir başka çalışmada da *Plumbago zeylanica*' nın kök ekstraktlarının DPPH radikalini temizleme aktivitesi $96 \mu\text{l/ml}$ olarak bildirilmiştir [100].

Bitki gruplarının farklı radikal temizleme etkisinin içerdiği fenolik bileşiklerden özellikle flavonoidlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü bir flavonoidin kimyasal yapısı, bulunduğu OH $\cdot$ gruplarının sayısı ve yerleşim merkezleri flavonoidlerin antioksidan özelliklerini etkileyen en önemli etmenlerdir. Flavonoidlerde OH grubunun fazla olması antiradikal etkinliği arttıran başlıca etkendir. Çünkü OH grubundaki hidrojen donör olarak görev almakta ve başta hidroksil, peroksil ve peroksinitrit olmak üzere radikalleri kararlı hale getirmektedir [112].

Bitki ekstraktlarının *in vitro* ortamda lipid peroksidasyonu üzerine antioksidan etkileri incelendiğinde FR grubunun K grubuna göre oldukça yüksek olduğu ve bütün bitki

gruplarında bu düzeyin FR grubuna göre önemli düzeyde azaldığı tespit edildi. Tüm bu veriler çalışmamızda kullanmış olduğumuz bitkilerin *in vitro* ortamda insan yaşamını en fazla etkileyen dejenaratif metabolik hastalıklara neden olan lipit oksidasyonunu önlemede etkili olduğu sonucunu düşündürmektedir.

Yapılan bir çalışmada, *Silene paradoxa*'nın kök ekstraktlarında, nikel ve bakır toleransları ve bunlara göre MDA seviyesi ölçülmüş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir [113].

Bitki ekstraktlarının *in vitro* ortamda metil esterleri üzerine etkisi araştırıldığında ise bitki gruplarının hepsinde metil esterlerinin korunduğu görülmüştür. 18:1 yağ asitleri K, FR, ERA, PLM ve SLN gruplarında sırasıyla 3,25, 3,09, 3,61, 3, 3.66 µmol/ml, 18:2 yağ asitleri ise 8.62, 8.07, 9.64, 7.98 ve 9.54 µmol/ml olarak belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada *Silene brachuica*, *S. viridiflora* ve *S. wallichiana*'da ki 18:1 yağ asidi içeriklerini sırasıyla %10.3, 5.4 ve 8.3, 18:2 yağ asitlerini ise %11, 18.8 ve 22.5 olarak belirlenmiştir [114].

- **Anaerobik Kültür Ortamında Bitki Ekstraktlarının Etkisi**

Maya kültürü oksidatif stres çalışmaları genellikle *S. cerevisiae* üzerine yoğunlaşmıştır. Bu mikroorganizma üzerine yapılan çalışmalar referans olarak kabul edilmektedir [85]. Bu çalışmada da genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan *Kluyveromyces lactis* ve genellikle oksidatif stres çalışmalarında tercih edilen *Saccharomyces cerevisiae* mayalarını tercih ettik.

Saccharomyces cerevisiae'nın lipit peroksidasyon ürünlerinin çok düşük seviyelerde olduğu saptandı. Bunun nedeninin *S.cerevisiae*'nın kullanılan radikallere karşı oldukça yüksek seviyede direnç oluşturmamasından kaynaklanabileceği sonucuna varıldı.

Bitki gruplarının *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde ki etkisi incelendiğinde de PLM grubunun LPO miktarının oldukça yüksek olduğu görüldü. Bu durum PLM grubunun yapısında bulunan bir maddenin maya hücresi üzerinde toksit etki göstererek LPO'yu arttırdığını düşündürmektedir. Yapılan bir çalışmada *P. zeylanica*'nın toksik etki gösterdiği bildirilmiştir [115].

Kluyveromyces lactis kültüründe ise K grubuna kıyasla FR grubunda azalma, diğer gruplarda ise yüksek artışlar kaydedildi. Bu farklı bulguların nedeni olarak mikroorganizmaların serbest radikal hasarlarına karşı farklı ölçülerde direnç gösterebileceğini düşündürmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda H_2O_2 'nin bazı hücre biyomembranlarından serbest bir şekilde difüze olmadığını ortaya koymuştur. Başta *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ve bir memeli hücresi olan Jurkat-T hücrelerinde H_2O_2 'nin difüzyonuna karşı biyomembranlarında bir bariyer sisteminin olduğu bildirilmiştir [116–121]. Bu etkinin H_2O_2 'nin konsantrasyonuna bağlı olduğu, düşük seviyedeki H_2O_2 'ye karşı maya hücresinin adaptasyon gösterdiği, yüksek seviyedeki H_2O_2 'ye karşı ise direnç ortaya koyduğu belirlenmiştir. *Saccharomyces cerevisiae* plazma membranlarının H_2O_2 'ye maruz kaldıktan sonra birkaç dakika içerisinde hızlı bir şekilde geçirgenlik ve biyofizyolojik özelliklerini değiştirdiği gözlenmiş ve bu değişikliklerin lipid bileşimindeki değişimlerden kaynaklandığını ileri sürülmüştür [116]. Hidrojen peroksit karşı hücre membranının potansiyel geçirgenliği üzerine yağ asit sentetaz (FAS) geni tarafından kodlanan yağ asidi sentezinin rolü incelenmiştir. Maya hücresinin H_2O_2 'ye karşı yağ asidi sentaz aktivitesini arttırdığı, membran yağ kompozisyonunda ki bu artış hücrenin H_2O_2 geçirgenliğine direnç göstermesi ve canlılık halinin uzamasına neden olduğu sonucuna varılmıştır [122]. Mayanın gösterdiği bu direnç üzerine bir diğer hipotez ise *Shizosaccharomyces pompei* üzerinde yapılan çalışma ile ileri sürülmüştür. Yine bu çalışma ile ergosterol sentez yolundaki bir genin (ERG3 ya da ERG6) delesyonu ile toplam sterol seviyesinin azalması sonucu membran sterol bileşiminin değişerek mayanın H_2O_2 'ye karşı daha dirençli hale gelebildiği ileri sürülmüştür [123].

S. cerevisiae'nin H_2O_2 'e karşı direncinin açıklandığı bir diğer çalışmada da mayanın geçirdiği gelişme fazlarındaki direnç seviyesi araştırılmış ve çalışma sonunda mayanın durağan fazda H_2O_2 gibi oksidanlara karşı direncinde artış olduğu ortaya konmuştur [121].

Tüm bu araştırmaların bizim yaptığımız çalışma ile paralellik gösterdiği sonucuna varıldı. Çünkü *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına inkübasyonun 24. saatinde eklenen radikallerin hücre ölümüne yol açmadığı gibi lipid oksidasyonu oluşumunu da gerçekleştirmediği gözlemlendi. Buna neden olarak mayanın özellikle de duraklama fazında oksidana karşı direnç artışı göstermesinin ve hücre membranında bulunan çoklu yağ asitlerinin membran geçirgenliğini azaltmasının yol açtığı kanısına varıldı.

Literatürde belirtilen bu bulguların yaptığımız çalışma ile paralellik gösterdiğini söyleyebiliriz. Deneysel çalışmamızda inkübasyonun 24. saatinde eklenen radikallere karşı maya hücrelerinin canlılık aktivitesinde herhangi bir değişim olmadığı gibi radikal hasarlarına karşıda direnç gösterdiği sonucuna varıldı.

Bitki ekstraktlarının *Saccharomyces cerevisiae*'nin yağ asidi profili üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında Palmitik asit (16:0) miktarının K ve FR'ye göre bitki ekstraktı içeren gruplarda arttığı saptandı. Bitki grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde ise 16:0 yağ asidi en fazla SLN ve P.SLN gruplarında görüldü.

Çalışmamızda yer alan diğer yağ asitleri üzerine olan etki araştırıldığında da genel tablo olarak yine SLN grubunun yağ asidi içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada da *S. brachuica*, *S. viridiflora*, ve *S. wallichiana*'nin palmitik asit miktarları araştırılmış ve sırasıyla 18.5, 24.7 ve 26.6 olarak tespit edilmiştir [114]. Literatürde yer alan bu bilgi araştırmamız sonucunda elde ettiğimiz verileri desteklemektedir.

Tüm bu yağ asitlerindeki artışlar göz önüne alındığında ise bitki ve radikal içeren gruplarda yağ asitlerinin dikkat çekici düzeylerde arttığı ve buna da *Saccharomyces cerevisiae* mayasının gelişme ortamında bulunan farklı bitki ekstraktlarının neden olduğunu düşünmekteyiz.

Bitki gruplarının *Saccharomyces cerevisiae*'nin yağ asidi bileşimi üzerinde radikal ilavesinin etkileri karşılaştırıldığında özellikle 16:0, 18:2 ve 18:3 yağ asitlerinin sentezinin ortama radikal ilavesi ile oldukça belirgin seviyelerde arttığı gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak bu yağ asitlerinin sentezinden sorumlu olan enzimler üzerinde Fe (II) iyonunun aktive edici etkisi olabileceğini ileri sürebiliriz.

Saccharomyces cerevisiae'nin geleneksel yöntemlerle elma suyunda uygulanan fermantasyonunun yağ asitleri üzerine etkisinin araştırılmasında miristik asit, palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, oleik ve linoleik asit tespit edilmiştir. Ayrıca bu yağ asitlerinden palmitik asidin fermantasyon teknolojisi için önemli bir değere sahip olduğunu ortaya koyulmuştur [124]. Buna ilave olarak bir hücrenin yağ asidi içeriğinin aynı zamanda gelişme ortamının lipit içeriğine de bağlı olarak değişiklik gösterebildiği yapılan çalışmalarla belirtilmiştir [125,126].

Kluveromyces lactis'in yağ asidi kompozisyonu incelendiğinde palmitik asit (16:0) miktarının K grubuna göre P.ERA ve SLN dışındaki bütün gruplarda önemli derecede yüksek olduğu saptandı. Palmitoleik (16:1, n-7) asit üzerinde ki etkilere bakıldığında FR, ERA, PLM, P.PLM ve P.SLN gruplarında K grubuna göre oldukça yüksek olduğu P.ERA grubunun ise önemli miktarda azaldığı görüldü. Stearik asit (18:0) düzeyleri incelendiğinde K grubuna göre FR ve PLM grubunda oldukça yüksek miktarda tespit edildi. PLM dışında ki bitki grupları ise K grubuna göre oldukça düşük seviyede belirlendi. Oleik (18:1) yağ asidinde K grubuna göre SLN ve P.ERA dışında ki bütün gruplarda oldukça yüksek olduğu

görüldü. Linoleik asit (18:2) miktarları K grubuna kıyasla FR grubunda oldukça yüksek bulundu. Linolenik asit (18:3) ve diğer yağ asitlerinin miktarları incelendiğinde de FR grubunun K grubuna göre oldukça yüksek olduğu, K ve FR gruplarına göre de bitki gruplarının hepsinde 18:3 ve diğer yağ asitlerinin miktarları yağ asidinin yüksek düzeyde olduğu görüldü.

Bu durum, farklı tür bitkiler besin içeriği olarak değişik oranlarda madde içerdikleri ve özellikle de kullanılan karbon kaynağının farklı olması ile sentezlenen bu yağ asitlerinin transkribinden sorumlu olan enzimlerin aktivitesini inhibe ya da stimüle ederek yağ asidi miktarlarında farklılığa yol açabileceği şeklinde izah edilebilir. Çünkü membran yağ asidi bileşimi açık bir şekilde çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Ayrıca hücrenin yağ asidi bileşimi, gelişme ortamının karbon kaynağından da etkilenebilir [125,127].

Yapılan bir çalışmada *Kluyveromyces marxianus*' un oksidatif strese karşı oldukça dirençli olduğu vurgulanmaktadır. Stres etmeni kimyasalların yüksek dozlarda (50 mM H₂O₂, 1 mM parakuat) ve çevre koşullarının (1.2 ve 6 bar basınç) zorlaştırıldığı kültür ortamında bu türün canlılık yüzdesi 68 ile 95.2 arasında değişmektedir. Bu sonuçlar *Kluyveromyces*' in hem yüksek doz kimyasallara karşı hem de olumsuz çevre koşulları altında yüksek direnç gösterdiğini ispat etmektedir [128].

Bir çalışmada ise 40 mM H₂O₂ ilavesinden 1 saat sonrasında *Schizosaccharomyces pombe* hücrelerinin %10' undan azının hayatta kaldığı saptanmıştır [129].

Bitki ekstraktlarını içeren gelişme ortamına radikal ilavesinin *Saccharomyces cerevisiae*' dan sentezlenen glutasyon miktarları üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında K grubuna göre FR ve ERA grubunda arttığı, diğer bitki gruplarında ise azaldığı tespit edildi. Bitki grupları FR grubuna göre kıyaslandığında ise bütün gruplarda azaldığı belirlendi. Bu durumun, bitki örneklerinin flavonoid ve fitosterol içeriklerine bağlı olarak açığa çıktığını düşünmekteyiz. Bitki örneklerinin toplam flavonoid düzeyleri incelendiği zaman en fazla içeriğin PLM grubunda, en az miktarın ise ERA grubunda olduğu belirlenmiştir. *S. cerevisiae*' nin glutasyon miktarı sonuçlarında ise yüksek düzeyde flavonoid içeren ekstrakt gruplarında glutasyonun azlığı belirlenmiştir. Bunun nedeninin gelişme ortamına ilave edilen radikal flavonoidlerce inhibe edilmesinden ileri geldiğini düşünmekteyiz.

Bu yorumu destekleyen bir çalışmada, H₂O₂' ye karşı oluşturulan adaptasyonlardan birinin intraselular glutasyonun artışının olabileceği bildirilmiştir [130]. *S. cerevisiae*' nin

farklı besin kaynaklarına ve oksidatif strese cevap olarak glutatyon sentezlediği başka bir çalışmada tespit edilmiştir [131].

Kluyveromyces lactis' in glutatyon miktarları K grubuna göre karşılaştırıldığında FR grubunda azaldığı, PLM ve SLN gruplarında ise arttığı tespit edildi.

Bu durumun, bitki örneklerinin flavonoid, fitosterol ve vitamin değerleri ile mikroorganizmaların farklı biyokimyasal yapılarından kaynaklandığını ve flavonoidlerin, kültür ortamına ilave edilen radikalleri erken safhada inhibe ederek oksidatif hasarı en az düzeye indirdiğini düşünmekteyiz. Bu durumda, glutatyon miktarının azlığı flavonoid miktarıyla ilişkilendirilebilir.

Yapılan bir çalışmada kadmiyum klorid (KD) ve 1,4-dithiothreitol (DTT) ilavesiyle oluşturulan oksidatif strese karşı *D. hansenii* ve *S. cerevisiae* direnç ve bazı biyokimyasal parametreleri belirlenmiştir. *D. hansenii*' nin gelişme ortamına eklenen her iki molekülde glutatyon miktarını arttırdığı, buna karşın *S. cerevisiae*' nin gelişme ortamına eklenen DTT bu organizmanın glutatyon sentezini arttırırken, KD' nin kontrol grubuna kıyasla glutatyon miktarında azalma belirlenmiştir [85].

Diğer bir çalışmada ise hidrojen peroksit ve parakuat ilavesi ile oluşturulan oksidatif stres sonucu *Kluyveromyces marxianus*' un antioksidan enzim düzeyleri ve farklı hava basınçları altında organizmanın canlılık düzeyleri test edilmiştir. Sonuç olarak 1.2 ve 6 bar basınç altında SOD, CAT ve glutatyon redüktaz miktarlarının kimyasal maddelerin eklenmesinden sonra artış gösterdiği belirlenmiştir. Basıncın artması ile enzim düzeylerinde ki değişiminde incelendiği çalışmada artan basınca bağlı olarak enzim miktarlarının da artış ancak bu artışın zamana bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir [128].

Bütün bu bulgular bize mikroorganizmanın farklı çevre koşullarına karşı protein sentez miktarının değiştiğini ortaya koymaktadır. Buna ek olarak oksidasyonun ilerleyen zamana bağlı olarak mikroorganizmaca tolere edildiğini de göstermektedir. Yani akut fazdaki oksidasyonda protein sentez hızı artarken ilerleyen zaman sürecinde ekspresyonun azaldığı belirlenmiştir.

Saccharomyces cerevisiae' nin bitki ekstraktı içeren ortamdaki toplam protein düzeyleri K grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel bir farklılık görülmemesine rağmen, FR grubunda kısmi azalma, SLN grubunda ise kısmi artış kaydedildi. Bu durumun *S. cerevisiae*' nin ortamdaki reaktif direnç göstermesine dayandırılabilir. Diğer ekstrakt gruplarında ise protein miktarının K grubuna göre daha fazla olduğu belirlendi.

Bitki ekstraktlarının *K. lactis* üzerinde ki total protein miktarı üzerine olan etkilerini incelediğimizde K grubuna göre bütün grupların yüksek olduğu tespit edildi. Bu durum bitki ekstraktlarının maya hücre proteinlerini koruduğunu düşündürmektedir. Bu farklılığın türlerin biyokimyasal ve fizyolojik değişkenliğinden ve inkübasyon süresinden ileri geldiğini düşünmekteyiz.

- **Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkisi**

Genel olarak bitki örneklerinin antimikrobiyal aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; bitki örneklerinin mikroorganizma grupları üzerinde kontrole (metanol) kıyasla etkili olduğu, bu etkinin maya ve dermofit funguslara göre bakteri gruplarında daha belirgin olduğu saptandı.

ERA ekstraktında ise *C. albicans* ve *E. sp* benzerlik gösterirken 14 mm ile en iyi sonuç *E. coli* üzerinde alınmıştır.

SLN ekstraktı, kullanılan tüm mikroorganizmalara karşı farklı oranlarda etki etmiş ve en büyük inhibisyon zonu ise *E. coli*' de görülmüştür. *Silene* türleriyle ilgili birçok antimikrobiyal çalışma mevcuttur. *S. vulgaris* ve *S. cserei* subsp. *aeoniopsis* ile yapılan çalışmalarda *C. albicans* üzerinde $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, *E. coli* üzerinde ise $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve *S. aureus* üzerinde ise $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ de minimum inhibisyon zonu tespit edilmiştir [79].

PLM ekstraktı en fazla *S. aureus*' un gelişimini engellemiştir. Yapılan bir çalışmada yakın bir tür olan *P. zeylanica*' nın 10 mg/ml etanol ekstraktının çeşitli mikroorganizmalar üzerinde ki etkisi araştırılmış *S. aureus*' da 15 mm, *E. coli*' de ise 12 mm olarak tespit edilmiştir [132]. Bulunan tüm bu sonuçlar literatürle uygunluk göstermektedir.

Elde ettiğimiz bütün bu bulgular neticesinde bitkiler üzerinde yapılan bu çalışmanın doğal antioksidanların ve antimikrobiyallerin kullanımına yönelik yapılacak olan bundan sonraki araştırmalara da ışık tutacağını düşünmekteyiz. Çünkü günümüzün gelişen teknik şartlarında kullanılan sentetik antioksidanların bazı yan etkilerinin olmasından ve sentetik antimikrobiyallere karşı oluşan direnç doğal antimikrobiyallerle alternatifler adına bitkisel kaynaklardaki doğal antioksidanların ve antimikrobiyallerin araştırılması son yıllarda dikkat çeken bir araştırma konusu olmuştur ve önemi günden güne artmaktadır. Daha etkin ve daha düşük yan etkiye sahip olan doğal antioksidanların ve antimikrobiyallerin tanımlanması veya tespit edilerek elde edilebilmesi, etkilerinin ortaya konulması, yaşam kalitesi açısından önemli beklentiler arasında yer almaktadır.

5. KAYNAKLAR

- [1] **Sarer, E. and Pancoli S. S.** 1998. Composition of the Essential Oil From *Calaminthanepeta* (L.) Savi ssp. *Glandulosa* (req.) P.W. Ball. **Flav. Fragr. J.**, 13: 31-32.
- [2] **Esen, M.** 2008. *Verbascum pinetorum* (Boiss.) O. Kuntze Bitki Ekstraktının Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, M.K.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/Hatay.
- [3] **Slater TF.** 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.*, 222:1-15.
- [4] **Grisham MB, Grander DN.,** 1989. Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia with reperfusion. *Clin Chest Med*, 10:71-81.
- [5] **Wheeler CR, Salzman JA. Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW Jr.,** 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*, 184:193-199.
- [6] **Maxwell SR.,** 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49:345-361.
- [7] **Brunori, M., Rotilio, G.,** 1984. Biochemistry of Oxygen Radical Species. *Method. Enzymol.*, 105, 22-35.
- [8] **Mccord, J.M.,** 1993. Human Disease, Free Radicals, and The Oxidant/Antioxidant Balance. *Clin. Biochem.* 26, 351- 357.
- [9] **Bilinski, T., Litwinska, J., Blaszczyński, M., Andrzej, B.,** 1989. Superoxide Dismutase Deficiency and The Toxicity of The Products of Autooxidation of Polyunsaturated Fatty Acid in Yeast. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1001, 102-106.
- [10] **Akkuş, İ.,** 1995. Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri. Mimoza yayınları 134s. Konya.
- [11] **Jeong, J.B. Park, J.H. Lee, H.K. Ju, S.Y. Hong, S.C. Lee, J.R. Chung, G.Y. Lim, J.H. and Jeong, H.J.,** 2009. Protective effect of the extracts from *Cnidium officinale* against oxidative damage induced by hydrogen peroxide via antioxidant effect. *Food and Chem. Toxicol.*, 47, 525-529.

- [12] **Doyotte, A. Cossu, C. Jacquin, M.C. Babut, M. and Vasseur, P., 1997.** Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and digestive gland of freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquatic Toxicol., 39, 93-110.
- [13] **Bast, A. Haenen, G.R.M.M. and Cees, J.A.D., 1997.** Oxidants and antioxidants: State of the art. The American Journal of Medicine, 91, (Suppl 3C), 30, 3C-2S_3C-13S.
- [14] **Frei, B., 1994.** Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of Action. The Am. J. of Med., 97(Suppl 3A), 26, 3A-5S-3A-12S.
- [15] **Smirnoff, N. and Pallanca, J.E., 1995.** Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. Biochem. Soc. Trans., 24, 16.
- [16] **Markesbery, W.R., 1997.** Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. Free Radical Biology And Medicine. 23(1), 134-147.
- [17] **Klebanoff, S.J., 1980.** Oxygen Metabolism and Toxic Properties of Phagocytes. Ann. Int. Med. 93, 480-489.
- [18] **Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993.** An Introduction to Free Radical Biochemistry. Br. Med. Bull. 49(3), 479-480.
- [19] **Reiter, R.J., 1998.** Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. Progress in Neurobiology. 56, 359-384.
- [20] **Cemeli, E. Baumgartner, A. and Anderson, D., 2009.** Antioxidants and the Comet assay. Muta. Resear., 681, 51-67.
- [21] **Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., 1999.** Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, London.
- [22] **Fırat, S., 1997.** Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon , glutatyon peroksidaz, glutatyon- S-transferaz düzeyleri ve N-asetil sistein'in bu sistem üzerindeki etkisi. Uzmanlık Tezi, G. Ü. Tıp Fak. Biyokimya Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.
- [23] **Mungan, G., 1996.** Kan bankalarında CPDA-1 (Citrate Phosphate Dextrose Adenine) ile saklanan kanlarda allopürinolün lipid peroksidasyonu ve biyokimyasal parametrelere etkisinin incelenmesi. Uzmanlık Tezi, Ankara Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara.

- [24] **Mccord, J,M., Day, E,D.,** 1978. Superoxide- depent production of hydroxyl radical catalyzed by iron □ EDTA complex. FEBS Letters, 86(1),139-142.
- [25] **Karbownik, M, Reiter, R,J.,** 2000. Antioxidative effects of melatonin in protectionagainst cellular damage caused by ionizing radiation. Experimental Biology and Medicine. 225, 9-22.
- [26] **Halliwell, B., Gutteridge, J,M,C., Cross, C,E.,.** 1993. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? J Lab Clin Med. 119(6), 598-613.
- [27] **Halliwell, B.,** 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? The Lancet. 344, 721-24.
- [28] **Halliwell, B., Gutteridge, J,M,C.,** 1989. Oxygen radicals and singlet oxygen. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon. 93-109.
- [29] **Cheeseman K., Slater H., T,F.,** 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry. Br. Med. Bull. 49(3),479-480.
- [30] **Simonian, N,A., Coyle, J,T.,** 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36, 83-106.
- [31] **Papas, A. M.** 1996. Determinants of Antioxidant Status in Humans. Lipids, 31, 77-82
- [32] **Aruoma, O. I.** 1997. Extracts as Antioxidant Prophylactic Agents. Inform., 8: 1236-1242.
- [33] **Candan, F.** 2001. Serbest Radikaller ve Etki Mekanizmaları. Yüksek Lisans Ders Notu. Sivas.
- [34] **Erden M., Bor N.M.,** 1984. Changes of Reduced Glutathione,Glutathione Peroxidase after Radiation in Guinea Pigs.Biochem Med 31:217-27.
- [35] **Erden M.,** 1987. Changes of Hexose monophosphate Pathway andMethemoglobin Reductase Enzyme Activity after RadiationGuinea Pigs. Comp Biochem Physiol 86:629-33.
- [36] **Mitchell JB, Russo A.,** 1987. The role of Glutathione in Radiationand Drug Induced Cytotoxicity. Br J Cancer 55:96-104.
- [37] **Blakely WF, et al.,** 1990. Hydrogen Peroxide Induced BaseDamage in DNA. Radiat Res 121:338-43.
- [38] **Mason RP, et al.,** 1990. Free Radical reactions with DNA and ItsNucleotides. Basic Life Sci 52:119.

- [39] **Piretti MV, Pagliuca G, Vagine M.,** 1987. Proposal of AnAnalytical Method for the Study of the Oxidation Products of Membrane Lipids. *Anal Biochem*; 167:358-61.
- [40] **Maede Y, Kuwabara M, Sasaki A, et al.,** 1987. Elevated Glutathione Accelerates Oxidative Damage to Erythrocytes Produced by Aromatic Disulfide. *Blood*; 73:312-7.
- [41] **Baird MB, Birnbaum LS, Sfeir GT.,** 1980. NADPH-Driven Lipid Peroxidation in Rat Liver Nuclei and Nuclear Membranes. *Arch Biochem Biophys*; 200:108-15.
- [42] **Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M.,** 1988. Studies on Lipid Peroxidation in Rat Liver Nuclei and Isolated Nuclear Membranes. *Bioclinum Biophys Acta*; 958:375-87.
- [43] **Yanbeyi, S.,** 1999. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Doktora Tezi, O. M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- [44] **Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D.,** 1987. Oxygen radicals and human disease. *An Intern Med.*; 107:526-545.
- [45] **Southorn PA, Powis G.,** 1988. Free radicals in medicine II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc.*; 63:390-408.
- [46] **Nakazawa H, Genka C, Fujishima M.,** 1996. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol.* 46:15-32.
- [47] **Yalçın AS.** 1998. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim.* 11:342-346.
- [48] **Yu BP.,** 1994. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.*; 74:139-162.
- [49] **Bruinsma, K. and Taren, D.L.,** 1999. Chocolate: food or drug? *J. Am. Diet Assoc.*, 99, 1249-1256.
- [50] **Wan, Y. Vinson, J.A. Etherton, T.D. Proch, J. Lazarus, S.A. and Kris-Etherton, P.M.,** 2001. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74, 596-602.

- [51] **Hertog, M.G. Feskens, E.J. Hollman, P.C. Katan, M.B. and Kromhout, D.,** 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011.
- [52] **Le Marchand, L. Murphy, S.P. Hankin, J.H. Wilkens, L.R. and Kolonel, L.N.,** 2000 Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92, 154-160.
- [53] **Pace-Asciak, C.R. Hahn, S.E. Diamandis, E.P. Soleas, G. and Goldberg, D.M.,** 1995. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implication for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica. Acta.*, 235, 207-219.
- [54] **Gorham, J. Coughlan, S.J.,** 1980. Inhibition of photosynthesis by stilbenoids, *Phytochemistry*, 19, (10) 2059-2064.
- [55] **Ostlund, R.E.,** 2002. Phytosterols in human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.*, 22, 533-549.
- [56] **Liu, R.H.,** 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78(Suppl), 517- 520.
- [57] **Bouic, P.J.,** 2001. The role of phytosterols and phytosterolins in immunomodulation: a review of the past 10 years. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 4, 471-475.
- [58] **Acar, G.** 2006. *CROCUS* Cinsine ait (*Crocus biflorus* Miller, *Crocus baytopiorum* Mathew, *Crocus flavus* Weston subsp. *dissectus* T. Baytop & Mathew) Saf Ekstraktlarının Antimikrobiyal ve Antioksidant Etkisi. P.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- [59] **Sanlı, Y.,** 1988. "Kemoterapotik İlaçlar, ", Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi yayınları, No:412 Ders Kitabı, ISBN 975-482-028-7.
- [60] **Baytop, T.,** 1999. "Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi (Geçmiste ve Bugün) ", Nobel Tıp Kitap Evleri 2. Baskı.
- [61] **Cowan, M. M.,** 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12: 564-582.
- [62] **Biletler M.,** 2000. Bacterial Resistance.
<http://www.accp.com/p4b4m2sample.pdf>.

- [63] **Okeke, M. I., Iroegbu, C. U., Eze, E. N., Okoli, A. S., Esimone, C. O.,** 2001. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 78: 119-127.
- [64] **Rios, J. L., Recio, M. C.,** 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80-84.
- [65] **Canales, M., Hernandez, T., Serrano, R., Hernandez, L. B., Duran, A., Rios, V., Sigrist, S., Hernandez, H. L. H., Garcia, A. M., Angeles-Lopez, O., Fernandez-Araiza M. A., Avila, G.,** 2007. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: a comparative study. *Journal of Pharmacology*, 110: 343-347.
- [66] **Li C., et al.,** 1999. Constituents of *Eremurus chinensis*. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 653-656.
- [67] **Shcherbukhin, V.D., Kuznetsov, A.A., and Shcherbukhina, N.K.,** *Usp. Biol. Khimii.*, 1983. vol. 24, pp. 232– 254.
- [68] **Smirnova, N.I., Mestechkina, N.M., and Shcherbukhin, V.D.,** 2001. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, , vol. 37, no. 3, pp. 332–337.
- [69] **Karaman K, et al.,** 2010. Volatile Compounds and Bioactivity of *Eremurus spectabilis* (Ciris), a Turkish Wild Edible Vegetable. *Journal of Medicinal Food*. (In press)
- [70] **M. Glensk, V. Wray, M. Nimtz, and T. Schoepke,** 1999. *J. Nat. Prod.*, 62, 717
- [71] **S. Bouguet-Bonnet, M. Rochd, P. Mutzenhardt, and M. Henry,** 2002. *Magn. Reson. Chem.*, 40, 618.
- [72] **O. A. Bushneva, R. G. Ovodova, A. S. Shashkov, A. O. Chizhov, and Y. S.** 2003. *Ovodov, Biochem. (Moscow)*, 68, 1360.
- [73] **R. Alarcon, L. T. Ortiz, and P. Garcia,** 2006. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 41, 1239.
- [74] **I. Tolibaev, K. S. Mukhamedova, and A. I. Glushenkova,** 1993. *Khim. Prir. Soedin.*, 512.
- [75] **C. I. Vardavas, D. Majchrzak, K. H. Wagner, I. Elmadfa, and A. Kafatos,** 2006. *Food Chem.*, 99, 822.
- [76] **A. G. Hanna and H. S. M. Soliman,** 1992. *Egyptian J. Food Sci.*, 20, 417.

- [77] **Liu M-y, Zhang J.**, 2004. Analysis of antioxidant ingredients of five edible wild herbs. *Journal of Plant Resources and Environment* 13, 58-9.
- [78] **Tosun F., et al.**, 2005. The Evaluation of Plants from Turkey for in vitro Antimycobacterial Activity, *Pharmaceutical Biology*, Vol. 43, No. 1, pp. 58–63.
- [79] **Kucukboyaci N. et al.**, 2010. FATTY-ACID COMPOSITIONS OF *Silene vulgaris* AND *S. cserei* SUBSP. *aeoniopsis* SEEDS AND THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITIES., *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 46, No. 1.
- [80] **Arunachalam Kantha D. et al.**, 2010. Anti-inflammatory and cytotoxic effects of extract from *Plumbago zeylanica*, *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4(12) pp. 1239-1245.
- [81] **Okoli C, Akah O, Ezugworie** 2005. U. Anti-inflammatory activity of extracts of root bark of *securidaca longipedunculata* fres (*polygalaceae*). *Afr. J. Trad. CAM*, 3: 54-63.
- [82] **Uma DP, Soloman FE, Sharda AC** 1999. Indian medicinal plants and their roots. *Pharmaceut Biol.*, 37: 231-236.
- [83] **Serrilli A.M., et al.**, 2009. Polar and antioxidant fraction of *Plumbago europaea* L., a spontaneous plant of Sardinia *Natural Product Research* Vol. 24, No. 7.
- [84] **Demma J., et al.**, 2009. Genotoxicity of plumbagin and its effects on catechol and NQNO-induced DNA damage in mouse lymphoma cells., *Toxicology in Vitro* 23 266–271.
- [85] **Navarrete C., et al.**, 2009. Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*., *FEMS Yeast Res* 9 582–590.
- [86] **Zu, Y. Li, C. Fu, Y. and Zhao, C.**, 2006. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *J. of Pharma and Biomed. Anal.*, 41, 714–719.
- [87] **Bruinsma, K. and Taren, D.L.**, 1999. Chocolate: food or drug? *J. Am. Diet Assoc.*, 99, 1249-1256.

- [88] **Brand-Williams, W. Cuvelier, M.E. and Berset, C.,** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.*, **28** (1), 25- 30.
- [89] **Hsu, B. Coupar, I. M. and Ng, K.,** 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*. *Food Chem.*, **98**, 317–328.
- [90] **Shimoi, K. Masuda, S. Furugori, M. Esaki, S. and Kinae, N.,** 1994. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in γ -ray-irradiated mice. *Carcinogenesis*, **15**, 2669-2672.
- [91] **Christie, W.W.,** 1990. Gas chromatography and lipids. The Oil Pres, Glaskow.
- [92] **Ntambi J.M.,** 1999. Regulations of Stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J of Lipid Res.*, **409**, 1549-1558.
- [93] **Rimoldi, O.J. Finarelli, G.S. and Brenner, R.R.,** 2001. Effectes of diabetes and insulin on hepatic Delta 6 desaturese gene expression. *Biochem. AndBiophy. Res. Com.*, **283(2)**, 323-326.
- [94] **Ntambi, J.M. Miyazaki, M. Stoehr, J.P. Lan, H. Kendziorski, C.M. and Yandell,B.S.,** 2002. Loss of stearoyl–CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 11482–11486.
- [95] **Elman, G.I.,** 1959. Tissue Sulphydryl Groups. *Arch. Bioc.*, 70-77.
- [96] **Lowry, O.H. Rosenbrough, N.J. Farr, A.L. and Randall, R.J.,** 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *The J. of Biochem.*, **193**, 265-277.
- [97] **Hara, A. and Radin, N.S.,** 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent, *Anal. Biochem.*, **90** (1), 420–426.
- [98] **Tvrzicka, E., Vecka, M., Stankova, B. and Zak, A.,** 2002. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography flame ionisation detection quantative aspects, *Anal. Chimica. Acta*, **465**, 337-350.
- [99] **Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- [100] **Shivraj H. Nile and C.N.Khobragade** 2010. Antioxidant activity and flavonoid derivatives of *Plumbago zeylanica* Journal of Natural Products, Vol. 3(2010):130-133.
- [101] **Zahin M. et al.** 2009. The *In Vitro* Antioxidant Activity And Total Phenolic Content Of Four Indian Medicinal Plants International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol. 1, Suppl 1, Nov.-Dec.
- [102] **Harborne J. B.,** 1967. Comparative biochemistry of the flavonoids-IV. ^{*1}: Correlations between chemistry, pollen morphology and systematics in the family plumbaginaceae Phytochemistry Volume 6, Issue 10, Pages 1415-1428.
- [103] **Hung, H.C. Joshipura, K.J. Jiang, R. Hu, F.B. Hunter, D. and Smith-Warner, S.A.,** 2004. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J. of Natl. Cancer Inst.*, **96(21)**, 1577-1584.
- [104] **Tripoli, E. Guardia, M.L. Giammanco, S. Majo, D.D. and Giammanco, M.,** 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem.*, **104**, 406-479.
- [105] **Justesen, U.,** 2000. Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *J. of Chroma. A*, **902**, 369-379.
- [106] **Sokol-Letawska, A. Oszmianski, J. and Wojdylo, A.,** 2007. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chem.*, **103(3)**, 853-859.
- [107] **Smirnova N. I. Et al.,** 2002. Localization of Acetyl Groups in the Macromolecule of Glucomannan Obtained from Roots of *Eremurus zangezuricus* *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 38, No. 5.
- [108] **Changfeng Hu, et al.,** 2011. Isolation and structural characterization of a novel galactomannan from *Eremurus anisopterus* (Ker. et Kir) Regel roots Carbohydrate Polymers 84 402–406
- [109] **Pawar R.K.,** 2010. Physico-chemical standardisation and development of HPTLC method for the determination of plumbagin in Kalmegh Navayas Loha an ayurvedic formulation International Journal of Current Pharmaceutical Research ISSN- 0975-7066.

- [110] **Witt T. Et al.** 1999. Nectar Dynamics and Sugar Composition in Flowers of *Silene* and *Saponaria* Species (Caryophyllaceae) *Plant bio* 1 (1999) 334-345.
- [111] **Ali Z.** 1998. Phytochemical studies on the chemical constituents of *Silene conoidea* and *Stocksia brahuica.*, Doctor of Philosophy Int.Centre for Chem. Sciences H.E.J. Res. Inst. of Chem. Uni. Of Karachi-75270.
- [112] **Özşahin A.D.,** 2010. Malatya yöresine ait bazı üzüm ve kayısı çeşitlerinin fitokimyasal içeriklerine bağlı olarak antioksidan aktivitelerinin araştırılması. Doktora Tezi. Fırat Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü
- [113] **Cristina Gonnelli et al.** 2001. Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa* *Physiologia Plantarum* 113: 507–514.
- [114] **Mamadalieva N. Z.** 2010. Fatty-Acid composition and antibacterial activity of CHCl_3 extracts of three plants of the genus *Silene* *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 46, No. 1.
- [115] **Teshome K. et al.,** 2008. Toxicity studies on dermal application of plant extract of *Plumbago zeylanica* used in Ethiopian traditional medicine *Journal of ethnopharmacology.*, pp. 236-248 vol. 117.
- [116] **Folmer, V. Pedroso, N. Matias, A.C. Lopes, S.C.D.N. Antunes, F. Cyrne, L. and Marinho, H.S.,** 2008. H_2O_2 induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochi. Et Biophy. Acta*, **1778**, 1141–1147.
- [117] **Chance, B. Sies, H. and Boveris, A.,** 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, **59**, 527-605.
- [118] **Antunes, F. and Cadenas, E.,** 2000. Estimation of H_2O_2 gradients across biomembranes. *FEBS Lett.*, **475**, 121-126.
- [119] **Seaver, L.C. and Imlay, J.A.,** 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, **183**, 7182-7189.
- [120] **Branco, M.R. Marinho, H.S. Cryne, L. and Antunes, F.,** 2004. Decrease H_2O_2 plasma membrane permeability during adaptation to H_2O_2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6501-6506.

- [121] **Sousa-Lopes, A. Antunes, F. Cryne, L. and Marinho, H.S.,** 2004. Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Lett.*, **578**, 152-156.
- [122] **Matias, A.C. Pedroso, N. Teodoro, N. Marinho, H.S. Antunes, F. Nogueira, J.M. Herrero, E. And Cyrne, L.,** 2007. Down-regulation of fatty acid synthase increases the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells in to H₂O₂. *Free Rad. Biol. Med.*, **43**, 1458-1465.
- [123] **Tafforeau, L. Le Blastier, S. Bamps, S. Dewez, M. Vandenhoute, J. And Hermand, D.,** 2006. Repression of ergosterol level during oxidative stress by fission yeast F-box protein Pof14 independently of SCF. *EMBO J.*, **25**, 4547-4556.
- [124] **Abrodo P.A., Inmaculada M.C., Juan J.M.A., and Domingo B.G.,** 2005. Fatty acid composition of cider obtained either by traditional or controlled fermentation. *Food Chem.*, **92**, 183-187.
- [125] **Rosi I., and Bertuccioli M.,** 1992. Influences of lipid addition on fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma characteristics of experimental wines. *J. Inst. Brew.*, **98**, 305-31.
- [126] **Beltran G., Novo M., Guillamon J.M., Mas A., and Rozes N.,** 2008. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds., *Inter. J Food Microbiol.*, **121**, 169–177.
- [127] **Bencheikroun A., and Bonaly R.,** 1992. Physiological properties and plasma membrane composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown in sequential batch culture and in presence of surfactant., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 673-678.
- [128] **Pinheiro R., Belo I., Mota M.,** 2002. Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure *Appl Microbiol Biotechnol* 58:842–847.
- [129] **Lee JS., Dawes IW., Roe JH.,** 1995. Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione., *Microbiology* 141:3127–3132.
- [130] **Izawa S., Inoue Y., and Kimura A.,** 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **368**, 73-76.

- [131] **Penninckx M.**, 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzy. And Micro. Tech.*, **26**, 737-742.
- [132] **Vineet M., et al.**, 2010. An in vitro antimicrobial activity of callus and root extracts of plumbago zeylanica Linn., In various test microorganism India. Volume 5, Issue 2, Article-001.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Burak BİRCAN
Doğum Yeri ve Tarihi : ANKARA-1986
Adresi : Cumhuriyet Mah. Şht. Kr. Gn. Hulusi SAYIN Cad.
No:167/4 ELAZIĞ
Tel : 0 532 643 43 88
e-mail : burak.bircan@gmail.com

Eğitim Bilgileri

- Lise (Hacı Ömer Tarman Anadolu Lisesi 2003 Almanca)
- Üniversite (Fırat Üniversitesi Biyoloji Bölümü 2009)
- Yüksek Lisans (Fırat Üniversitesi-Genel Biyoloji)

Yabancı Dil

- İngilizce (Orta)
- Almanca (Orta)

Bilimsel Etkinlikler ve Kurslar

- Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası 2010
- 20. Ulusal Biyoloji Kongresi 2010 Denizli
- 2. Elazığ Enfeksiyon Günleri Sempozyumu
- ISO 17025:2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği Sertifikası 2011
- ISO 9001, ISO 14001, OHSAS 18001 Entegre Yönetim Sistemi İç Denetçi Sertifikası 2011

Yayınlar

Ulusal Konferans ve Sempozyumlar

- Ö.YILMAZ., M. GÜVENÇ., A. Dilek ÖZŞAHİN., A. ASLAN., B. BİRCAN., Z. BAYDAŞ., M. TUZCU, Eritrositlerde Lpo Oluşumu ve Gsh Düzeyi Üzerine Kayısı ve Üzüm Polifenolik Bileşiklerin Etkisi, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21–25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye
- S. KIRBAĞ., P. ERECEVİT., A. N. ÖNGANER., Ö.YILMAZ., B. BİRCAN., O. KİREÇCİ., Besin Olarak Tüketilen *Pisum sativum*’un Bazı Probiyotik Maya Türlerinin Gelişimi ve Yağ Asidi Sentezine Etkisinin Araştırılması, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21–25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye
- D. ÖZSAHİN., Ö. YILMAZ., Z. GÖKCE., P. ERECEVİT. and B. BİRCAN, Food Contents of *Prunus armeniaca* L. cv. Kabaası Fruits Extracts and Their Effects On The Lipid Peroxidation in The Fenton Reagent Environment, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21–25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye
- B. BİRCAN., Ö.YILMAZ., Y. ERDEN., A. D. ÖZŞAHİN. ve Z. KARABOĞA., *Punica granatum* L. Meyve Ekstraktının *In Vitro* Ortamda Oluşturulan Lipid Peroksidasyonu ve Dpph Serbest Radikaline Karşı Antioksidan Etkisinin Araştırılması, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21–25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye
- Y. ERDEN., Ö. YILMAZ., B. BİRCAN., A. D. ÖZŞAHİN., M. TUZCU. ve Z. KARABOĞA., *Pistacia terebinthus* L. Ekstraktlarının Soya ile Mısırözü Yağının Bulunduğu *In Vitro* Ortamda Lpo Oluşumuna Karşı Antioksidan Etkisinin Araştırılması, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21–25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye
- Ö. YILMAZ., A. N. ÖNGANER., P. ERECEVİT., S.KIRBAĞ., B. BİRCAN., *Musa sapientum* ’un (Muz) Fitokimyasal İçeriklerinin Belirlenmesi ve *Lactobacillus* sp. üzerindeki etkisi, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21–25 Haziran 2010, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye

Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

- Ö. Yılmaz , A. D. Özşahin, B. Bircan , Y. Erden and Z. Karaboga., Radical scavenging Activity of the *Pistacia terebinthus* in Fenton Reagent environment and its Protective Effects on the Unsaturated Fatty Acids, ASIAN JOURNAL OF CHEMISTRY Volume 22 (2010)

Projeler

- Y. ERDEN., N. ASLAN., B.BİRCAN., Z. KARABOĞA., *In vitro* Şartlarda Bazı Bitkisel Yağların Varlığında Oluşturulan Lipid Peroksidasyonu Üzerine *Pistacia terebinthus* & *Punica granatum* Ekstraktlarının Antioksidan Etkisinin Araştırılması 2209 – Üniversite Öğrencileri Yurt İçi / Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı TÜBİTAK (Proje elemanı) 2009.