

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KROM III KLORÜR TUZUNA MARUZ KALAN
MAYALARA C VİTAMİNİ KATILARAK MAYALARIN
MALONDİALDEHİT, GLUTATYON, ANTİOKSİDAN
VİTAMİNLER VE ENZİMLERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ebru ÇÖTELİ

Doktora Tezi

Anabilim Dalı: Kimya

Danışman: Prof. Dr. Fikret KARATAŞ

ARALIK - 2013

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KROM III KLORÜR TUZUNA MARUZ KALAN MAYALARA C
VİTAMİNİ KATILARAK MAYALARIN MALONDİALDEHİT, GLUTATYON,
ANTİOKSİDAN VİTAMİNLER VE ENZİMLERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ebru ÇÖTELİ

(08117104)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 27/11/2013

Tezin Savunulduğu Tarih: 18/12/2013

Tez Danışmanı :

Prof. Dr. Fikret KARATAŞ (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri :

Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR (F.Ü)

Prof. Dr. İsmet YILMAZ (İ.Ü)

Doç. Dr. Süleyman AYDIN (F.Ü)

Doç. Dr. Süleyman SERVİ (F.Ü)

ARALIK-2013

ÖNSÖZ

Tezimin planlanmasında, yürütülmesinde ve çalışmalarımın her safhasında benden sabır ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fikret KARATAŞ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarımızda kullandığımız maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'nın hazırlanmasında imkânlarını sağlayan Yrd. Doç. Dr. Seher GÜR'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımız sırasında desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Süleyman AYDIN'a ve Lizozom enzimini temin eden Dr. Aslı GİRAY KURT'a çok teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmalarımda destek ve ilgisini gördüğüm arkadaşım Özge KARAASLAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı FF 11.01 no'lu proje kapsamında destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca destek ve ilgisini gördüğüm babam, annem ve kayın valideme şükranlarımı sunarım. Ayrıca beni her konuda sabırla destekleyip yardımlarını esirgemeyen eşim Ahmet Turan ÇÖTELİ ve kızlarım Nehir ile Simanur ÇÖTELİ'ye çok teşekkür ederim.

Ebru ÇÖTELİ
ELAZIĞ-2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	IX
TABLoların LİSTESİ	XI
KISALTMALARIN LİSTESİ	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.1.1. Oksidatif Stres	1
1.1.2. Serbest Radikaller	1
1.1.3. Serbest Radikallerin Oluşumu	1
1.1.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)	2
1.1.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	2
1.1.3.3. Hidroksil Radikali ($^{\cdot}OH$)	2
1.1.3.4. Singlet Oksijen (1O_2)	3
1.1.3.5. Nitrik Oksit ($NO^{\cdot}$)	3
1.1.4. Serbest Radikal Kaynakları	3
1.1.5. Serbest Radikallerin Etkileri	3
1.1.5.1. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri	3
1.1.5.2. Proteinlere Etkileri	4
1.1.5.3. Karbohidratlara Etkileri	4
1.1.5.4. Lipitlere Etkileri ve Malondialdehit (MDA) Oluşumu	4
1.1.6. Serbest Radikaller ve Yol Açtıkları Hastalıklar	4
1.1.7. Mayalarda Oksidatif Stres Nedenleri	5
1.1.8. Antioksidanlar ve Metabolizma İçin Önemleri	5
1.1.8.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar	5
1.1.8.1.1. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD)	5
1.1.8.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	6
1.1.8.1.3. Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd)	6
1.1.8.1.4. E Vitamini (Tokoferoller)	7

1.1.8.1.5. Karotenler (A Vitamini)	7
1.1.8.1.6. C Vitamini (Askorbik asit)	8
1.1.8.1.7. Glutasyon (GSH).....	9
1.1.8.2. Eksojen Antioksidanlar (İlaçlar).....	9
1.1.8.3. Gıda Antioksidanları	9
1.1.9. Mayalarda Yer Alan Temel Antioksidan Savunma Sistemleri	10
1.1.10. Mayalar Hakkında Genel Bilgi.....	10
1.1.11. Mayaların Kullanım Alanları.....	11
1.1.12. Mayaların Mikrobiyal Özellikleri.....	11
1.1.13. Mikroorganizmaların Çoğalma Kinetiği	11
1.1.14. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’ nın Yapısı	12
1.1.15. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’ nın Yaşam Döngüsü	14
1.1.16. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) İle İlgili Yapılmış Bazı Çalışmalar ...	15
1.1.17. Metal ile Mikroorganizma Arasındaki Etkileşim Mekanizması (Biyosorpsiyon)	16
1.1.18. Biyosorpsiyonu Etkileyen Faktörler	16
1.1.18.1. pH.....	16
1.1.18.2. Sıcaklık.....	16
1.1.18.3. Biyokütle Miktarı.....	17
1.1.18.4. Karıştırma Hızı	17
1.1.19. Ağır Metal ve Toksik Metal Kavramları.....	17
1.1.20. Krom	17
1.1.20.1. Kromun Kimyasal Özellikleri ve Doğada Bulunuşu	17
1.1.20.2. Krom Kaynakları ve Krom İhtiyacı	17
1.1.20.3. Kromun Metabolizması ve Biyolojik Fonksiyonları	17
1.1.20.4. Krom Yetersizliği ve Toksisitesi	18
1.1.21. Amaç	18
2. MATERYAL VE METOT	20
2.1. Materyal.....	20
2.1.1. Maya Kültürü (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’ nün Temini.....	20
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri.....	20
2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	20
2.1.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar	22
2.1.5. Deneyde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	22

2.1.6.	Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) Kültürünün Hazırlanması	23
2.1.7.	Maya Örneklerinde Seyreltme İşlemi ve Ekimleri	23
2.1.8.	Deney Düzeneklerinin Hazırlanması	24
2.2.	Metot	24
2.2.1.	Ham Özüt Hazırlanması	25
2.2.2.	A ve E Vitamini Analizi	25
2.2.3.	C Vitamini Analizi	27
2.2.4.	Malondialdehit (MDA) Analizi	28
2.2.5.	İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyon Analizi	29
2.2.6.	Ham Özütteki Total Protein Derişiminin Tayini	31
2.2.7.	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analiz Yöntemi	32
2.2.8.	Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd) Analiz Yöntemi	34
2.2.9.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini	36
2.2.10.	İstatistiksel Değerlendirme	38
3.	BULGULAR.....	39
3.1.	Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’nın Spektrofotometrede Sayımı	39
3.2.	Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’nın Üreme Eğrisi	39
3.3.	Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’ya Uygulanacak Uygun pH’ın Belirlenmesi	41
3.4.	Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’ya Uygulanacak Cr ⁺³ Dozunun Belirlenmesi	42
3.5.	Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’ya Uygulanacak C Vitamini Dozlarının Belirlenmesi	43
3.6.	C Vitamini, Glutasyon (GSH, GSSG) ve MDA Analizlerinin İncelendiği Maya Örneklerindeki Tanecik Sayıları	44
3.7.	Maya Örneklerindeki A ve E Vitaminleri, Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd), Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Total Protein Analizlerindeki Tanecik Sayıları	45
3.8.	Protein Tayini	46
3.9.	Maya Örneklerindeki C Vitamini Sonuçları	48
3.10.	Maya Örneklerindeki Malondialdehit (MDA) Miktarları	49
3.11.	Maya Örneklerindeki Glutasyon (GSH-GSSG) Miktarları	50
3.12.	Maya Örneklerindeki A ve E Vitamini Değerleri	54
3.12.1.	A Vitamini Değerleri	54
3.12.2.	E Vitamini Değerleri	55
3.13.	Maya Örneklerindeki Antioksidan Enzimlerin Aktivite Değerleri	56

3.13.1.	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzimi Aktivite Değerleri	56
3.13.2.	Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd) Enzimi Aktivite Değerleri	57
3.13.3.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi Aktivite Değerleri.....	58
4.	TARTIŞMA.....	59
	KAYNAKLAR.....	70
	ÖZGEÇMİŞ	91

ÖZET

Bu çalışmada, Krom III klorür ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) tuzuna maruz kalan (10 ve 40 ppm krom olmak üzere) maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'ların ortamına 10, 15 ve 20 ppm C vitamini katıldı. Daha sonra bu mayaların 12, 24 ve 36. saat sonra canlılık oranları, A, E ve C vitaminleri, indirgenmiş glutatyon (GSH), yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ve Malondialdehit (MDA) miktarları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile GSH-Px (Glutatyon Peroksidaz), GSH-Rd (Glutatyon Redüktaz) ve SOD (Süperoksit Dismutaz) antioksidan enzimlerinin aktiviteleri ise spektrofotometre ile belirlendi.

Besi ortamlarına 10 ve 40 ppm olmak üzere iki farklı dozda krom ile 10, 15 ve 20 ppm C vitamini uygulanmış mayaların 12, 24 ve 36. saatlerinde protein miktarları araştırıldı.

Mayalarda artan krom dozu ve süreye bağlı olarak protein miktarında azalmalar ($p < 0,05$), artan C vitamini dozu ve süreye bağlı olarak da protein miktarında artışların ($p < 0,05$) olduğu gözlemlendi.

Krom dozuna bağlı olarak mayaların serbest radikal oluşumunda artış olduğu, bunun indirekt göstergesi olan MDA miktarında artışlar ($p < 0,05$) ve GSH/GSSG oranında ise azalmalar ($p < 0,05$) olduğu belirlendi. Besi ortamına katılan C vitamini dozuna bağlı olarak mayaların; MDA miktarlarında azalmalar ($p < 0,05$), GSH/GSSG oranlarında ise artmaların ($p < 0,05$) olduğu belirlendi.

Yine artan krom dozuna bağlı olarak mayaların GSH, A, E ve C vitamini miktarlarında azalma ($p < 0,05$), GSSG miktarlarında, GSH-Px, GSH-Rd ve SOD aktivitelerinde ise artma ($p < 0,05$) olduğu gözlemlendi.

Süreye bağlı olarak ise; mayaların GSH, A, E ve C vitamini miktarlarında azalma ($p < 0,05$), GSSG miktarları, GSH-Px, GSH-Rd ile SOD aktivitelerinde de artma ($p < 0,05$) olmuştur.

Doz artışına bağlı olarak besi ortamlarına C vitamini katılan mayaların GSH, A, E ve C vitamini miktarlarında artma ($p < 0,05$), GSSG miktarları ile GSH-Px, GSH-Rd ve SOD aktivitelerinde ise azalma ($p < 0,05$) olduğu belirlenmiştir.

Tüm bu sonuçlardan kontrol grubuna göre kromun, antioksidan vitaminler ile GSH miktarlarını azalttığı, MDA ve GSSG miktarları ile antioksidan enzim aktivitelerini de artırdığı belirlenmiştir. Fakat besi ortamına eklenen kroma ilave olarak C vitamini katılmasının ise; antioksidan vitaminler ile GSH miktarlarını artırdığı, MDA ve GSSG miktarları ile antioksidan enzim aktivitelerini de azalttığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak; kromun serbest radikal oluşumunu artırdığı, C vitaminin ise antioksidan özelliğinden dolayı serbest radikal oluşumunu azalttığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: A, E, C vitaminleri, GSH, GSSG, MDA, GSH-Px, GSH-Rd, SOD, Krom III Klorür.

SUMMARY

Research on the Effects of Exposure to Chromium III Chloride Salt on Yeasts and the Effects of Vitamin C, Malondialdehyde, Glutathione, Antioxidant Vitamins and Enzymes

In this study, 10, 15 and 20 ppm vitamin C is added to the environment of the (Including 10 and 40 ppm chromium) yeast (*Saccharomyces cerevisia*) which is exposed to Chromium III chloride ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) salt. These yeasts are then 12, 24 and 36 hours later, the survival rate, A, E and C vitamins, reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) and malondialdehyde (MDA) Quantities high performance liquid chromatography (HPLC) and the GSH-Px (Glutathione Peroxidase), GSH-Rd (Glutathione Reductase) and SOD (Superoxide Dismutase) antioxidant enzyme activities determined by the spectrophotometer.

Two different dose of chrome and 10, 15 and 20 ppm of vitamin C have been applied to the stock environment, the amount of protein have been investigated at the 12, 24 and 36 hours of yeasts.

Reduction in the amount of protein ($p < 0,05$) has been observed due to time and increasing chromium dose in yeasts. And increase in the amount of protein ($p < 0,05$) has been observed due to time and increasing dose of vitamin C.

Increase in the amount of MDA ($p < 0,05$) and GSH / GSSG ratio reductions ($p < 0,05$) has been determined due to dosage of the chromium. Participating in a nutrient medium, depending on the dose of vitamin C of yeasts; reductions in the amounts of MDA ($p < 0,05$), GSH / GSSG ratio and increase in ($p < 0,05$) has been determined increasing chromium doses depending on the yeast GSH, A, E and vitamin C in amounts of reduction ($p < 0,05$), GSSG in amounts of GSH-Px, GSH-Rd and SOD activity and increase in ($p < 0,05$) has been observed.

There has been an increase GSH-Px, SOD activity and GSH-Rd in the increase in ($p < 0,05$) GSH yeasts, A, E and vitamin C in amounts of reduction ($p < 0,05$), GSSG quantities, due to time.

Due to dose increase, there has been an increase in the amount of GSH, A, E, C vitamins of yeast which enters the stock environment and there has been a decrease in the amount of ($p < 0,05$), the amount of GSSG, GSH-Px, GSH-Rd and SOD activities.

All of these results, it has been determined that compared to control group chromium reduces the amount of GSH with antioxidant vitamins, and increases the antioxidant enzyme activities with MDA and GSSG amounts. But in addition to chromium added to the culture media, adding vitamin C increases the amount of GSH and antioxidant vitamins, and reduces the antioxidant enzyme activities.

As a result, it has been concluded that the chromium increases the formation of free radicals, vitamin C reduces free radical formation due to its antioxidant function.

Keywords: A, E, vitamin C, GSH, GSSG, MDA, GSH-Px, GSH-Rd, SOD, Chromium III Chloride

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1. E vitamini (α -Tokoferol)'nin yapısı.....	7
Şekil 1.2. A vitamininin yapısı.....	7
Şekil 1.3. C vitamininin yapısı	8
Şekil 1.4. Glutatyonun (GSH) yapısı.....	9
Şekil 1.5. Mikroorganizma çoğalma kinetiği.....	12
Şekil 1.6. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)'nin yapısı	12
Şekil 1.7. Maya hücresinin yapısı.....	13
Şekil 1.8. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)'nin yaşam döngüsü.....	14
Şekil 2.1. A vitamini çalışma grafiği ve doğru denklemi	26
Şekil 2.2. E vitamini çalışma grafiği ve doğru denklemi.....	27
Şekil 2.3. C vitamini çalışma grafiği ve doğru denklemi	28
Şekil 2.4. MDA çalışma grafiği ve doğru denklemi.....	29
Şekil 2.5. Yükseltgenmiş glutatyon çalışma grafiği ve doğru denklemi	30
Şekil 2.6. İndirgenmiş glutatyon çalışma grafiği ve doğru denklemi.....	31
Şekil 3.1. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)'nin çeşitli dalgalı boyundaki absorban değerleri	39
Şekil 3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> kültürlerinde zamana bağlı üremenin izlenmesi.....	40
Şekil 3.3. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)'ya pH'ın etkisi.....	42
Şekil 3.4. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)'ya kromun etkisi.....	43
Şekil 3.5. C vitamini, Glutatyon (GSH, GSSG) ve MDA ölçümlerindeki tanecik sayıları.....	44
Şekil 3.6. Zamana bağlı olarak gruplardaki tanecik sayıları.....	45
Şekil 3.7. Sığır serum albumin standart (BSA) protein eğrisi.....	46
Şekil 3.8. Maya örneklerindeki total protein miktarları.....	47
Şekil 3.9. Maya örneklerindeki C vitamini miktarları	48
Şekil 3.10. Maya örneklerindeki MDA miktarları	49
Şekil 3.11. 12. saatteki maya örneklerinin GSH ve GSSG değerleri	50
Şekil 3.12. 24. saatteki maya örneklerinin GSH ve GSSG değerleri	51
Şekil 3.13. 36. saatteki maya örneklerinin GSH ve GSSG değerleri	52
Şekil 3.14. 12, 24 ve 36. saatteki maya örneklerindeki GSH / GSSG oranının ortalama değerleri	53
Şekil 3.15. Maya örneklerindeki A vitamini miktarları.....	54
Şekil 3.16. Maya örneklerindeki E vitamini miktarları	55

Şekil 3.17. Maya örneklerindeki GSH-Px enzimi aktivite değerleri.....	56
Şekil 3.18. Maya örneklerindeki GSH-Rd enzimi aktivite değerleri	57
Şekil 3.19. Maya örneklerindeki SOD enzimi aktivite değerleri	58

TABLoların LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’nın çeşitli dalgaboylarındaki absorbands değerleri	39
Tablo 3.2. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’nın 600 nm’de süreye bağlı olarak, absorbands değerlerine karşılık gelen tanecik sayıları	40
Tablo 3.3. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’ya pH’ın etkisi (Tanecik sayıları ve standart sapmalar 10^6 ile çarpılmalıdır.)	41
Tablo 3.4. Maya (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)’ya kromun etkisi (Tanecik sayıları ve standart sapmalar 10^6 ile çarpılmalıdır.)	43
Tablo 3.5. C vitamini, Glutasyon (GSH, GSSG) ve MDA ölçümlerindeki tanecik sayıları (Tanecik sayıları ve standart sapmalar 10^6 ile çarpılmalıdır.)	44
Tablo 3.6. Zamana bağlı olarak gruplardaki tanecik sayıları (Tanecik sayıları ve standart sapmalar 10^6 ile çarpılmalıdır.)	45
Tablo 3.7. Sığır serum albumin standart (BSA) protein eğrisi değerleri.....	46
Tablo 3.8. Maya örneklerindeki total protein miktarları	47
Tablo 3.9. Maya örneklerindeki C vitamini miktarları.....	48
Tablo 3.10. Maya örneklerindeki Malondialdehit (MDA) miktarları.....	49
Tablo 3.11. 12. Saatteki maya örneklerinin Glutasyon (GSH-GSSG) miktarları ile GSH/GSSG oranları	50
Tablo 3.12. 24. Saatteki maya örneklerinin Glutasyon (GSH-GSSG) miktarları ile GSH/GSSG oranları	51
Tablo 3.13. 36. Saatteki maya örneklerinin Glutasyon (GSH-GSSG) miktarları ile GSH/GSSG oranları	52
Tablo 3.14. Maya örneklerindeki GSH/GSSG oranının ortalama sonuçları	53
Tablo 3.15. Maya örneklerindeki A vitamini miktarları	54
Tablo 3.16. Maya örneklerindeki E vitamini miktarları.....	55
Tablo 3.17. Maya örneklerindeki Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) enzimi aktivite değerleri	56
Tablo 3.18. Maya örneklerindeki Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd) enzimi aktivite değerleri	57
Tablo 3.19. Maya örneklerindeki Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi aktivite değerleri ..	58

KISALTMALARIN LİSTESİ

SC	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AA	: Askorbik asit
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetikasit
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	:Yükseltgenmiş Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz Enzimi
SOD	: Süperoksit Dismutaz Enzimi
GSH-Rd	: Glutasyon Redüktaz Enzimi
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (Redükte)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
LOOH	: Lipit hidroperoksit
KH₂PO₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
NaClO₄	: Sodyum Perklorat
NaHCO₃	: Sodyum Bikarbonat
H₃PO₄	: Fosforik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
BSA	: Sığır Serum Albümin Standartı
H₃PO₄	: Fosforik Asit
HClO₄	: Perklorik Asit
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
NBT	: Nitro Blue Tetrazolium
NaN₃	: Sodyum Azid
Na₂HPO₄	: Sodyum Monofosfat
XOD	: Ksantin Oksidaz Enzimi
HCl	: Hidrojen Klorür
μ	: Mikron

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Oksidatif Stres

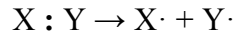
Metabolizma, doğuştan sahip olduğu oksidan-antioksidan bir dengeye sahiptir. Dengenin bozulması metabolizmada oksidatif strese yol açar [1]. Oksidatif strese yol açan maddeler 2 sınıfa ayrılır:

- **Radikaller:** Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), Peroksil ($L(R)OO^{\cdot}$), Hidroperoksil ($HOO^{\cdot}$), Hidroksil ($^{\cdot}OH$)
- **Radikal Olmayanlar:** Hipoklorit ($^{\cdot}OCl$), Singlet oksijen (1O_2), Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve Ozon (O_3) gibi maddelerdir [2, 3].

1.1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktifler ancak yarı ömürleri çok kısadır. Metabolizmanın işleyişi sırasında oluşabilecekleri gibi dış etkenlerle de meydana gelebilirler [4, 5]. Serbest radikaller;

1- Kovalent bağlı molekülün homolitik bölünmesiyle oluşur.

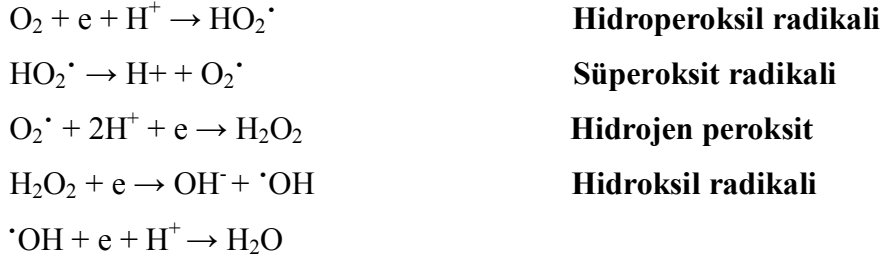


2- Bir molekül elektron kaybederse serbest radikaller oluşur. Elektron kaybı esnasında molekülün dış orbitalinde paylaşılmamış elektron varsa radikal meydana gelir.

3- Bir moleküle elektron transferi yoluyla da serbest radikaller oluşur. Bu yolla molekülün dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşacağı için radikaller meydana gelir [6, 7].

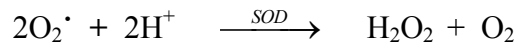
1.1.3. Serbest Radikallerin Oluşumu

Oksijenden oluşan radikaller biyolojik sistemlerde bulunan en önemli radikallerdendir. Hem gerekli hem de toksik özelliği olan oksijen; iki eşleşmemiş elektronlara sahip olması ve eşleşmemiş elektronların ayrı orbitallerde aynı yönde dönmesi ona radikal olma özelliğini kazandırır [8]. Moleküler oksijene bir elektron ilavesiyle süperoksit, iki elektron ilavesiyle hidrojen peroksit ve üç elektron transferi yoluyla da hidroksi radikalleri oluşmaktadır [9, 10].



1.1.3.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot}$)

Oksijenin bir elektron alıp indirgenmesi yoluyla serbest süperoksit radikali meydana gelir. Bu radikalin reaktivliği yüksek değildir [11-13]. Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar, fiziksel ve kimyasal maddeler ile otooksidasyon yoluyla süperoksit radikalleri meydana gelir [14]. SOD enzimiyle katalizlenen dismutasyon tepkimesi ile hidrojen peroksit ve moleküler oksijen oluşmaktadır. Bu tepkime SOD enzimi ile 109 kat daha hızlı cereyan eder [15].

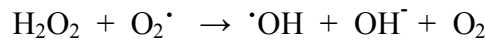


1.1.3.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

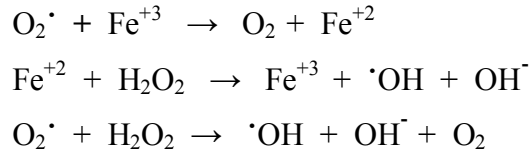
Moleküler oksijenin 2 elektron alması veya süperoksidin 1 elektron alması yoluyla peroksit meydana gelir. Daha sonra peroksit molekülü de 2 hidrojen atomuyla reaksiyona girerek Hidrojen peroksiti oluşturur [8]. Serbest radikal olmamasına rağmen reaktif oksijen türlerinin oluşumunda rol alır [10]. Hidrojen peroksit katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer oksidaz sayesinde hücreden uzaklaştırılır [16].

1.1.3.3. Hidroksil Radikali ($^{\cdot}OH$)

En reaktif radikaldır ancak yarılanma ömrü çok kısadır. Meydana geldiği bölgede büyük hasarlara yol açar. Hidroksil radikali; hidrojen peroksit ile süperoksit radikalinin tepkimesi sonucu oluşur.



Bu tepkime Haber-Weiss tepkimesidir ve bu tepkime demir katalizörlüğünde çok hızlı cereyan eder [8,16].



1.1.3.4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Ortaklanmamış elektrona sahip olmadığı için radikal olmayan ancak serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olan bir moleküldür. Moleküler oksijenle singlet oksijenin farkı; moleküler oksijende paylaşılmamış iki dış elektron aynı yönde ve aynı yörüngelerde iken, singlet oksijende elektron dönme yönleri birbirine zıttır [17, 18].

1.1.3.5. Nitrik Oksit ($\text{NO}^\bullet$)

Yapısında eşleşmemiş elektron bulundurmasına rağmen $\text{NO}^\bullet$ birçok biyomolekül ile kolayca tepkimeye giremezken, peroksil, alkil gibi diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girerek daha az reaktif moleküller oluşturur [10].

1.1.4. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller; iyonize radyasyon, stres oluşturan şartlar, alkol ve uyuşturucu maddeler, çevresel ajanlar (pestisitler, sigara dumanı, anestezipler), küçük moleküllerin otooksidasyonu, enzimler (ksantin oksidaz) ve proteinler (hemoglobin), mitokondrial elektron transportu, peroksizomlar (oksidazlar), endoplazmik retikulum ve nükleer membran elektron transport sistemleri yardımıyla oluşmaktadır [19].

1.1.5. Serbest Radikallerin Etkileri

1.1.5.1. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

DNA serbest radikallerden kolaylıkla zarar görebilir. İyonize radyasyon, oksijen konsantrasyonunun artması, ksantin oksidaz ve çeşitli kimyasal maddeler DNA'da radikal oluşumuna neden olurlar. Bu radikaller DNA'nın yapısını bozar. Bu hasar hücrenin yapısının bozulmasına ve hücrenin ölümüne neden olur. Ayrıca DNA yapısındaki pürin ve pirimidin bazlarının parçalanması sonucunda bu radikaller DNA'nın denatürasyonuna neden olurlar [5, 20].

1.1.5.2. Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenmesi aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır [21]. Zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali az olduğu için serbest radikal etkilerine karşı proteinler doymamış yağ asitlerinden daha az etkilenirler. Serbest radikal hasarı proteinlerde belirli bölgede birikmişse hücrenin canlılığı açısından zararlı etki yapar [22, 23].

1.1.5.3. Karbohidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerine zararlı etkileri vardır. Özellikle monosokkaritlerin otooksidasyonu ile hidrojen peroksit ve okzoaldehitler oluşur. Açığa çıkan okzoaldehitler de proteinlere bağlanarak kanser ve yaşlanmaya neden olabilirler. Serbest radikallerin karbohidratlar üzerindeki diğer etkisi de polisakkarit depolimerizasyonudur [24].

1.1.5.4. Lipitlere Etkileri ve Malondialdehit (MDA) Oluşumu

Serbest radikallerin etkilediği en hassas biyomolekül lipitlerdir [25]. Biyolojik zarlar lipit ve proteinden meydana gelmiştir. Serbest radikaller lipit peroksidasyonuna yol açarlar. Lipit peroksidasyonu sonucu hem lipitler hem de zar proteinleri zarar görür [17]. Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Bu reaksiyon sonucunda reaktif aldehitler üretilir. Malondialdehit (MDA); peroksidasyona uğramış çoklu doymamış yağ asitlerinin bölünmesiyle oluşan üç karbonlu bir dialdehitdir. Lipit peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna yol açarak zarar verir. Ayrıca MDA metabolizmadaki oksidatif durumun göstergesi olarak kullanılır [26, 27].

1.1.6. Serbest Radikaller ve Yol Açtıkları Hastalıklar

Oksidatif stres sonucu; kanser, kalp ve damar hastalıkları, astım, diyabet, hipertansiyon, grip, pnömoni, hepatit, inflamasyon hastalıkları gibi birçok hastalığa yol açtığı belirtilmiştir [28]. Ayrıca iltihabi hastalıklar, radyasyon hasarı, göz hastalıkları, yaşlanma, Alzheimer hastalığı gibi hastalıklara serbest radikallerin etkilerinin olabileceği belirtilmiştir [23].

1.1.7. Mayalarda Oksidatif Stres Nedenleri

Mayalardaki oksidatif stres nedenleri şunlardır:

- **Fiziksel stres koşulları** (Ozmotik stres, yüksek su / gaz basıncı, radyasyon, ısı şoku, kurutma / susuzlaştırma),
- **Kimyasal stres koşulları** (pH stresi, besin sınırlaması / açlık, metal iyonlarının stresi, etanol ve diğer metabolitlerin yol açtığı toksisite ve oksidatif stres),
- **Biyolojik stres koşulları** (Maya hücresinin yaşlanması ve ortamdaki diğer organizmalar ve onlarla yarışma)’dır.

Oksijenli solunum esnasında mayalar $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve $OH^{\bullet}$ gibi reaktif oksijen türlerine maruz kalırlar. Bu reaktif oksijen türleri başlıca proteinler, lipitler ve DNA’da oksidatif hasarlara neden olurlar. Oksidatif strese karşı maya hücreleri içerdikleri antioksidan enzimler ve moleküller vasıtasıyla karşı koyarlar [29].

1.1.8. Antioksidanlar ve Metabolizma İçin Önemleri

Serbest radikallerin oluşumu ve bunların yol açtığı hasarı önlemek için metabolizmada birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlara ‘antioksidanlar’ adı verilmektedir [30].

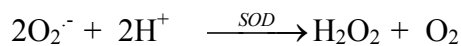
Antioksidanlar görevlerini ya serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek veya onları daha zayıf bir moleküle çevirerek yerine getirirler. Antioksidanlar, hücrenin membran ve sıvı kısımlarında bulunurlar [31]. Antioksidanlar, endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı antioksidanlar ve gıda antioksidanları olarak sınıflandırılırlar:

1.1.8.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar

- **Enzimler** [SOD, CAT, GSH-Px, GSH-Rd, Hidroperoksidaz vb.]
- **Enzim olmayan antioksidanlar** [α -tokoferol (E-vitamini), β -karoten (A-vitamini), askorbik asit, melatonin, transferin, ferritin, hemoglobin, albumin, bilirubin, glutatyon gibi].

1.1.8.1.1. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD)

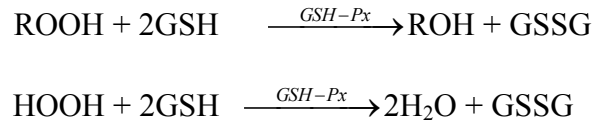
Metabolizmada serbest radikallerin toksik etkilerine karşı ilk savunmayı SOD enzimi yapmaktadır. Bu enzim süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür [32, 33].



SOD enziminin çeşitli şekilleri mevcuttur. Prokaryotlarda Fe ve Mn-SOD mevcutken, ökaryotlarda Mn, Cu-Zn ve ekstrasellüler SOD tipi bulunmaktadır [11]. İnsan sitoplâzmasında Cu ve Zn içeren SOD tipi bulunurken mitokondrisinde Mn içeren SOD şekli mevcuttur. Enzim hücre içindeki süperoksit radikallerinin düzeylerini düşük tutarak hücreyi bu radikallerin zararlı etkilerine karşı korur [34, 35].

1.1.8.1.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

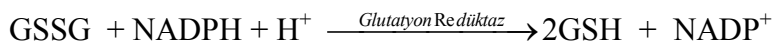
Aktif merkezinde sellenosistein içerip hücre içi bir enzim olan Glutasyon peroksidaz enzimi metabolizmada bulunan doğal bir antioksidandır. GSH-Px; iki adet tiyol grubu ihtiva eden glutasyonu, glutasyon disülfite yükseltgerken hidroperoksitleri ve H₂O₂'yi indirger [36, 37].



GSH-Px enziminin selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki şekli mevcuttur. Selenyum bağımlı enzim şekli hem H₂O₂ hem de hidroperoksitlere etki ederek bunların zararlı etkilerini ortadan kaldırır. Selenyum bağımlı olmayan şekli ise; sadece lipid hidroperoksitlerin yıkımında görev alır [38].

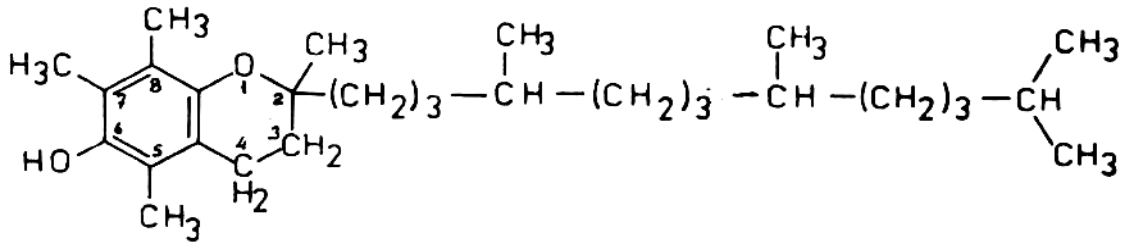
1.1.8.1.3. Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd)

Glutasyon redüktaz enziminin yapısında selenyum vardır. GSSG (okside glutasyon)'yi hızla GSH (redükte glutasyon)'a çevirerek hücreyi peroksitlere karşı korur [39]. Glutasyon hücre içinde bulunan ve hücrenin proteinlerini oksidatif hasarlara karşı koruyan bir moleküldür. Bu reaksiyonda Glutasyon Redüktaz enzimi rol oynar [40].



Glutasyon redüktaz yapısında flavin adenin dinükleotid (FAD) içerir ve NADPH'tan bir elektronun GSSG'nin disülfüd bağlarına aktarılmasını katalizler. Bu reaksiyonda görev alan NADPH'in kaynağı pentoz fosfat yoludur [41].

1.1.8.1.4. E Vitamini (Tokoferoller)

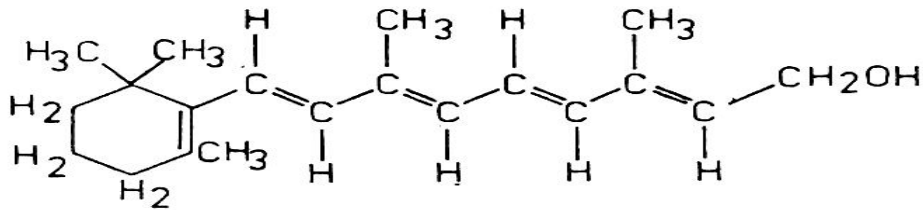


E Vitamini
(α -Tokoferol)

Şekil 1.1. E vitamini (α -Tokoferol)'nin yapısı

Tokoferol yapısında olup, yağda çözünüp suda çözünmeyen, yer fıstığı, badem, pamuk yağı, keten tohumu ve bitkisel yağlarda bulunan bir vitamindir [42]. E vitamini, lipid peroksi radikallerini yıkarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırdığından zincir kırıcı bir antioksidan olarak da bilinir [10]. GSH-Px enzimi ile E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlarlar. GSH-Px, peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini de peroksitlerin sentezlenmesini önler [43]. E vitamininin özellikle radikal reaksiyonları sırasında zincir kırıcı etkisi vardır. Glutasyon ve askorbik asit ile E vitamininin antioksidan etkisi daha çok artar [44-46].

1.1.8.1.5. Karotenler (A Vitamini)

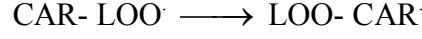


Vitamin A₁

Şekil 1.2. A vitamininin yapısı

Yağda çözünüp suda çözünmeyen, bir primer alkol grubuna ve çok sayıda doymamış bağa sahip bir vitamindir. A vitamininin birçok türü mevcut olup, en etkili ve en yaygın türü β -karoten'dir. A vitamini antioksidan özelliğinin yanı sıra hücre ve intrasellüler zarın sağlamlığı, glikoprotein sentezinde önemli rolleri vardır [47]. Karotenoidlerin uzun konjuge çift bağlı sistemlere sahip olması onları serbest radikal saldırılarını önlemede etkili

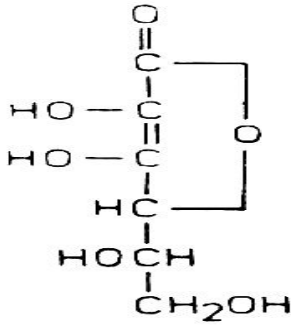
hale getirmektedir. β -karotenin (CAR) peroksil radikali ile direkt olarak reaksiyona girebileceği belirtilmektedir [48].



Karotenoitler de; tıpkı α -tokoferoller gibi iki peroksil radikali ile reaksiyona girebilirler [1].



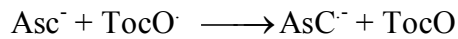
1.1.8.1.6. C Vitamini (Askorbik asit)



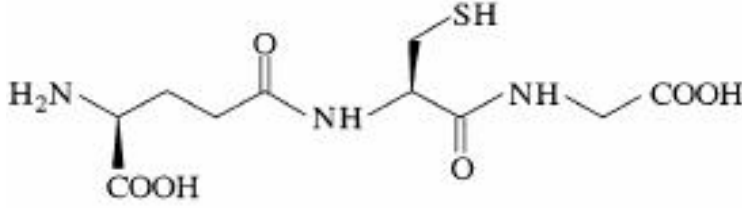
L - Askorbik asit

Şekil 1.3. C vitamininin yapısı

Kapalı formülü $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ olan, kollajenin prolin ve lizin birimlerinin hidroksilasyon reaksiyonlarında koenzim olarak görev alan, suda çözülebilen ve özellikle yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunan, ısıtılmaya dayanıksız, dondurulmaya dayanıklı bir ketolaktondur [8, 49, 50]. Kolay bir şekilde ince bağırsaklardan emilir. C vitamini süperoksit ve hidroksil radikalleriyle kolaylıkla reaksiyona girerek antioksidan vitamin görevini yapar. Ayrıca safra asitlerinin sentezi ve demirin Emilimi, yara iyileşmelerinde etkili olma, balık, margarin, süt gibi yağ ihtiva eden yiyecekleri oksidatif bozulmaya karşı koruma ve askorbat radikali oluşturarak radikalik tokoferollerin yenilenmesini sağlar [51].



1.1.8.1.7. Glutasyon (GSH)



Şekil 1.4. Glutasyonun (GSH) yapısı

Glutasyon (γ -glutamilsistein glisin), organizmada tiyol grubu içeren, düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir [52, 53]. Antioksidan olarak hücre içinde görev almasının yanı sıra, DNA ve protein sentezleri, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi gibi fonksiyonları da vardır [54-56].

Hücre için en önemli antioksidan molekülü redükte glutasyon (GSH)'dur. Özellikle ksenobiyotiklerin zehirleştirilmesi, aminoasitlerin transportu, proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte halde tutulması, bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim görevi görür [57-59]. Glutasyon peroksidaz enzimi tarafından redükte formdaki glutasyon (GSH) okside glutasyon (GSSG) formuna dönüşürken, hidrojen peroksit veya lipid peroksitlerin detoksifikasyonu gerçekleşir. NADPH'nin kullanıldığı reaksiyonla glutasyon redüktaz enzimi ile tekrar okside glutasyon (GSH) redükte glutasyon formuna çevrilir [8, 59].

1.1.8.2. Eksojen Antioksidanlar (İlaçlar)

- Ksantin oksidaz inhibitörleri
- NADPH Oksidaz inhibitörleri
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Trolox-C.

1.1.8.3. Gıda Antioksidanları

- Bütil Hidroksitoluen (BHT)
- Bütil Hidroksianisol (BHA)
- Sodyum Benzoat'tır [8].

1.1.9. Mayalarda Yer Alan Temel Antioksidan Savunma Sistemleri

Maya hücreleri oksidatif strese maruz kaldıklarında metabolizmalarındaki antioksidan savunma sisitemleriyle karşı koyarlar. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)’da bulunan antioksidan savunma sistemleri şunlardır:

Maya savunma enzimleri ve kimyasallar

Görevleri

Enzimler

Glutasyon redüktaz	Yükseltgenmiş glutatyonun indirgenmesi
Cu/Zn süperoksit dismutaz	Süperoksit anyonun uzaklaştırılması (sitoplâzma)
Mn süperoksit dismutaz	Süperoksit anyonun uzaklaştırılması (mitokondri)
Katalaz A	Hidrojen peroksitin parçalanması (peroksizom)
Katalaz T	Hidrojen peroksitin parçalanması (sitoplâzma)
Sitokrom c peroksidaz	Hidrojen peroksitin indirgenmesi

Kimyasallar

Glutasyon	Oksijen içermeyen radikallerin uzaklaştırılması
Metallotiyonein	Süperoksit ve hidroksil radikallerinin uzaklaştırılması

gibi bir çok savunma mekanizmasıyla karşılık verir [29].

1.1.10. Mayalar Hakkında Genel Bilgi

Mayalar mantarlar âleminde yer almakta olup yaklaşık 1500 türünün olduğu bildirilmektedir [60-62].

Maya hücresi proteinler, karbonhidratlar, yağlar ve inorganik maddelerden oluşmaktadır. Maya hücresinin büyük bir kısmı proteinlerden oluşturmaktadır [63]. Depo karbondidratları ve hücre duvarı karbonhidratları olmak üzere iki çeşit karbonhidrat içermektedir [64]. Maya hücresi; diğer organik madde gruplarına göre yağları daha az içermektedir. Yağ miktarı; maya hücresinin türüne ve besi ortamına göre değişmektedir [63]. Ayrıca maya hücresi, kalsiyum, fosfor, potasyum gibi bazı inorganik maddeleri de içermektedir [64].

Maya hücreleri yağda çözünen vitaminler bakımından fakir olduğu halde B vitaminlerini fazla miktarda ihtiva etmektedir [65].

1.1.11. Mayaların Kullanım Alanları

Mayalar en fazla alkol üretimi, ekmek yapımında, turşuların yapımında, vitaminler, gliserol, lipidlerin ve proteinlerin üretiminde kullanılmaktadır [66-69]. Ayrıca gıda, kimya, ilaç ve zirai alanlarda da kullanılmaktadır [68, 70].

Maya endüstrisi en önemli fermantasyon endüstrisidir. Son zamanlarda, mayalardan tıp alanında yararlanılmaktadır. Özellikle mikrobiyoloji, moleküler genetik gibi birçok ana bilim dalında kullanılan organizmalardandır. Mikroorganizmaların kullanılarak zararlı maddeleri temizleme işlemi çalışmalarında da mayalar kullanılmaktadır. Özellikle toksik ağır metal giderimi bunlardan biridir [71].

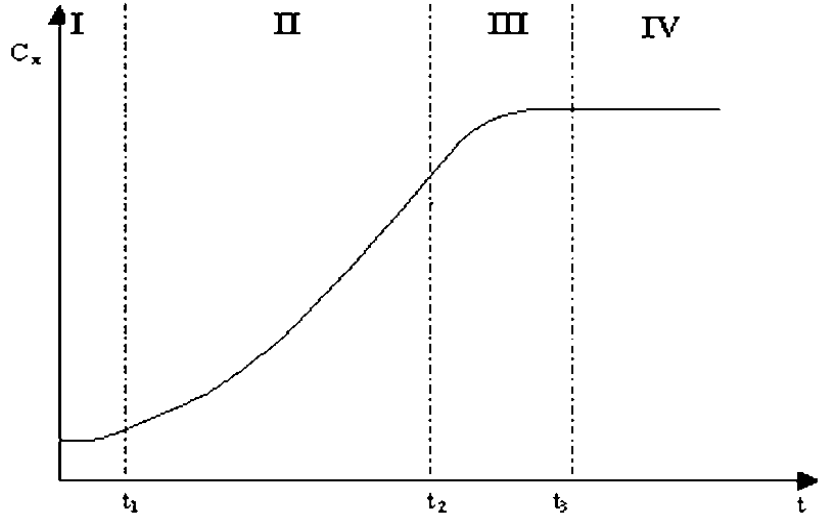
1.1.12. Mayaların Mikrobiyal Özellikleri

Mayaların büyüebilmesi için: sıcaklık, su, pH, mevcut O₂ ve besin maddelerinin bulunması gibi birçok faktör gereklidir. Mayanın optimum büyüme sıcaklığı 24-48 °C arasında değişmektedir. Mikroorganizmaların metabolik aktivitesi için su gereklidir. Mayaların büyümesinde diğer önemli bir faktör de pH'dır. Mayaların çoğu 3-10 arasındaki pH değerlerini tolere edebilir [72].

Mayalar tek hücreli mantarlar olup tomurcuklanma yoluyla çoğalırlar. Anaerobik koşullarda bile mayalar rahatlıkla gelişebilirler. Bakteriler mayalardan daha hızlı ürerler. Bazı mantarlarda olduğu gibi, mayalar da asidik koşullara dayanıklıdır [73].

1.1.13. Mikroorganizmaların Çoğalma Kinetiği

Mayaların besi ortamı, karbonhidratları, suda çözülmüş azotlu bileşikleri ve madensel tuzları içerirse maya hücreleri çoğalmaya başlar. Uygun pH, sıcaklık, oksijen miktarı v.b. koşullar sağlanırsa mikroorganizmaların çoğalmaları çeşitli evrelerden geçer. Bu evreler, gecikme fazı, üstel faz, yavaşlama fazı ve durgunluk fazı olarak adlandırılır. Bu evreler Şekil 1.5'de gösterilmektedir.



Şekil 1.5. Mikroorganizma çoğalma kinetiği

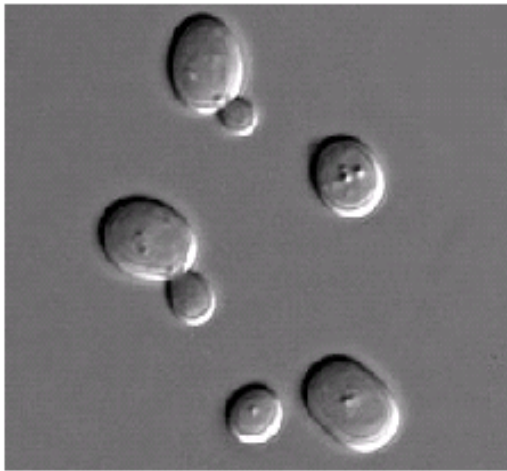
I.faza gecikme fazı adı verilmektedir. Bu fazda besi ortamına eklenen maya hücreleri, ortama uyum süreci içerisinde. Bu fazda mikroorganizma derişiminde artış gözlenmez. Bu fazın sonlarına doğru derişim ve canlı hücre sayısında artış başlamaktadır.

Üstel fazda (II), maya hücreleri ortama uyumu tamamlamıştır. Bu canlı hücre sayısında ve ürün üretiminde sürekli bir artış gözlenmektedir.

Yavaşlama fazında (III), maya hücreleri yaşlanmıştır. Bu fazda da canlı hücre sayısı artışı devam etmekte ancak canlı hücre artışı hızı üstel fazdan çok daha düşüktür.

Durgunluk fazına (IV) ulaşıldığında, maya hücrelerinin bölünmesi ve ölme hızları birbirine yakın olduğu için bu fazda canlı hücre üretimi olamaz [74, 75].

1.1.14. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)' nın Yapısı

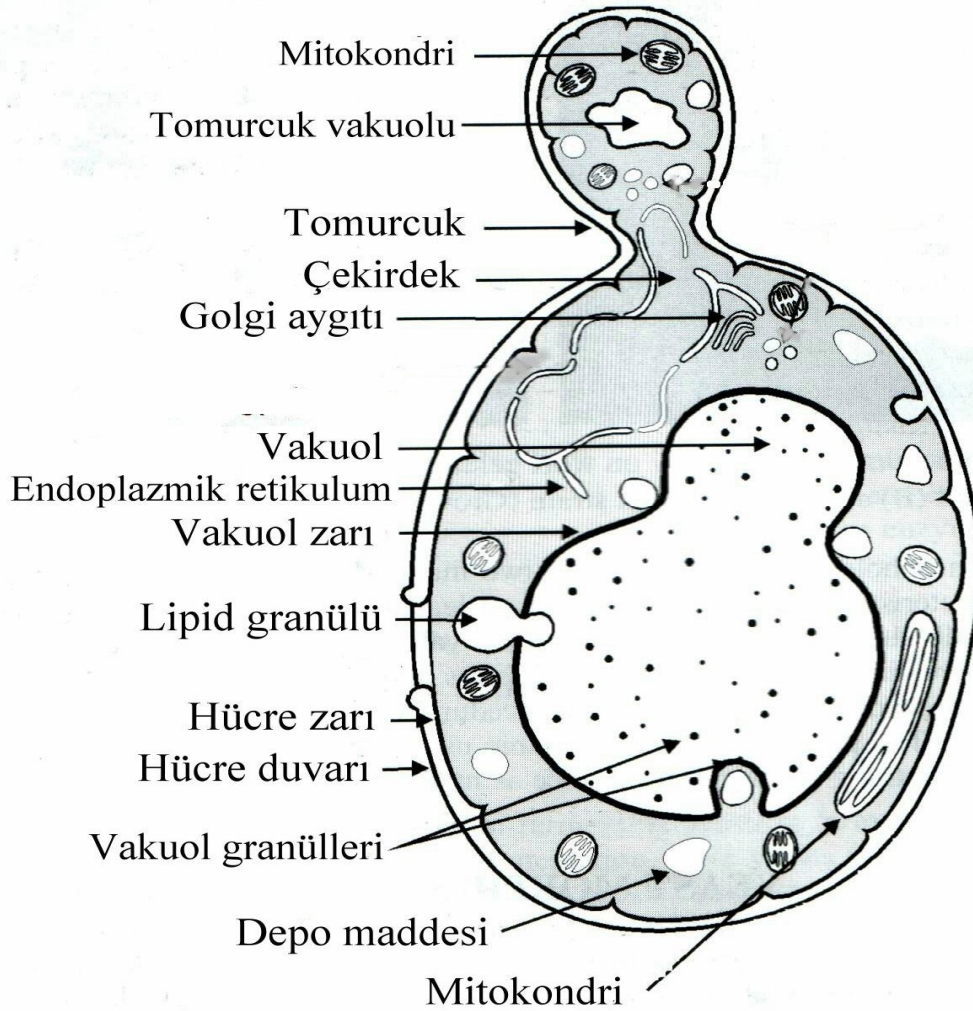


<u>Alem</u>	<u>Fungi</u>
<u>Bölüm</u>	: Ascomycota
<u>Alt Bölüm</u>	: Saccharomycotina
<u>Sınıf</u>	: Saccharomycetes
<u>Takım</u>	: Saccharomycetales
<u>Famİlya</u>	: Saccharomycetaceae
<u>Cins</u>	: <i>Saccharomyces</i>
<u>Tür</u>	: <i>S. cerevisiae</i>
<u>Bilimsel Sınıflandırma</u>	
<u>Binominal Adı</u>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Şekil 1.6. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)' nın yapısı (Meyen ex E.C. Hansen)

En iyi tanınan maya ekmek veya bira mayası olarak adlandırılan *Saccharomyces cerevisiae*'dir [76]. “*Saccharomyces*” sözcüğü şeker mantarı anlamına gelmektedir. “*Cerevisiae*” ise “biradan” demektir. Ayrıca *Saccharomyces cerevisiae* üst fermantasyon mayası ve gıdasal maya olarak da adlandırılmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae*, tomurcuklanarak çoğalan bir maya türüdür. Koyu kabuklu meyvelerin kabuklarındaki beyaz tabakada yer alır [77].

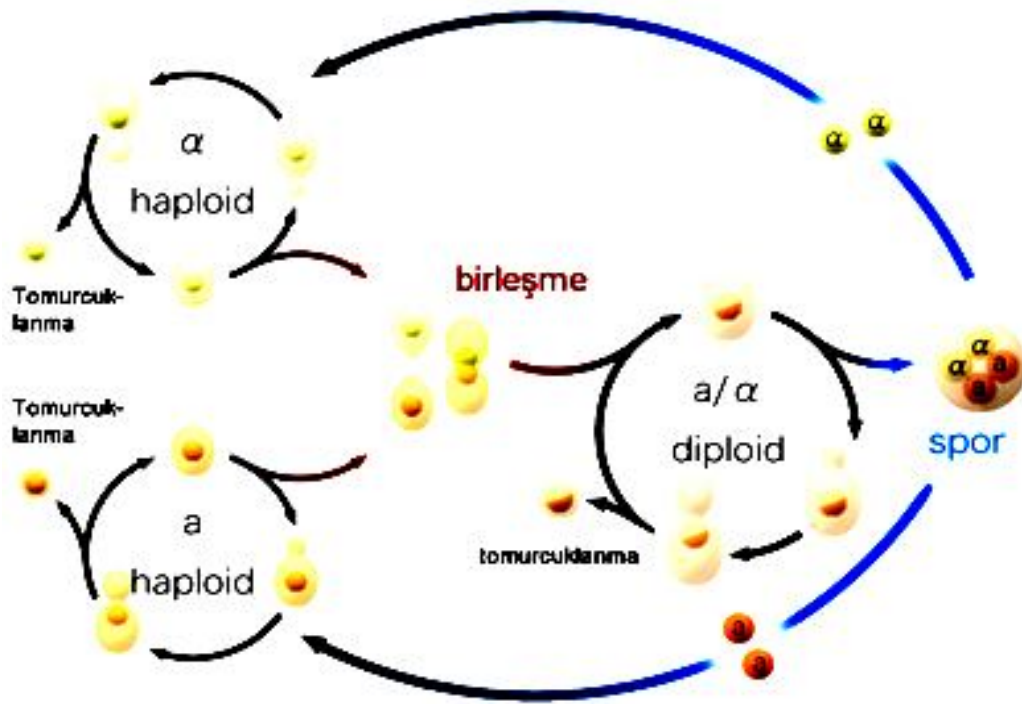
Maya (*S. cerevisiae*) hücresi elips şeklindedir. Hücrelerinin büyüklüğü $5 \times 10 \mu$ civarındadır ve hücre duvarı, hücre zarı ve sitoplazma denilen genel kısımlardan meydana gelmiştir [29]. *S. cerevisiae*, ökaryotik bir organizma olup aerob'tur. Ancak fakültatif anaerob'tur [78]. Maya hücresinin yapısı Şekil 1.7'de verilmiştir [79].



Şekil 1.7. Maya hücresinin yapısı

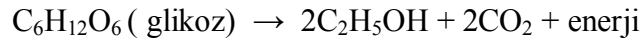
1.1.15. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)' nın Yaşam Döngüsü

Maya hücreleri haploit ve diploit olmak üzere iki farklı biçimde varlıklarını sürdürebilirler. Haploit hücreler mitoz büyümeden ibaret basit bir yaşam döngüsüne sahiptirler ve yüksek stresli ortamda genelde ölürlür. Diploit hücrelerde mitoz büyümeden oluşan yaşam döngüsüne sahiptir. Ancak stres halinde sporlanıp mayoz bölünmeye girerler, çeşitli haploit sporlar oluştururlar ve bu sporlar çiftlenip yeniden bir diploit hücre oluştururlar [80].



Şekil 1.8. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)' nın yaşam döngüsü

Saccharomyces cerevisiae hücreleri glikoz fermantasyonu sonucu enerji elde ederler. Bu reaksiyon şöyledir;



Oksijen yokluğunda fermantatif mayalar enerji elde etmek için karbondioksit ve etanole çevirirler. Biracılık ve şarapçılıkta ortaya çıkan etanol şişelenir, ekmek yapımında ise etanol buharlaştırılır. Oluşan karbondioksit gazı ekmeği kabartır. Bu gaz hamurun kabarıp artmasına neden olur [81].

1.1.16. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) İle İlgili Yapılmış Bazı Çalışmalar

Saccharomyces cerevisiae yiyecek ve ilaç endüstrisinde önemli rollere sahiptir. Ayrıca vitaminler, aminoasitler, β -glukan gibi önemli maddeleri de içerirler [82].

Maya hücrelerinin (*Saccharomyces cerevisiae*) vitamin, protein, karbonhidrat, yağ ve mineral bakımından zengin olduğu için kozmetik alanında da çok faydalı olabileceğini ileri sürmüşlerdir [83].

Ağır metallerin çevresel su kaynaklarından uzaklaştırılması fiziksel ve kimyasal süreç gerektirdiğinden mayalara olan ilgi artmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* ile ağır metal giderimi ve metal toleransı incelenmiştir. Bu amaçla *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin Cu (II) iyonu giderim yetenekleri araştırılmış ve çok kısa bir sürede bu maya hücrelerinin Cu (II) iyonunu biyosorbe ettikleri saptanmıştır [84].

Saccharomyces cerevisiae kullanıldığı fermantasyonda glutasyonu en iyi şekilde ekstrakte etmede etanol konsantrasyonunun ilişkisi olup olmadığı araştırılmış ve en iyi ekstraksiyon yöntemleri saptanmıştır [85]. Ayrıca *Saccharomyces cerevisiae* tarafından glutasyon üretimi [86] ve glutasyon üretiminde kültür koşullarının etkileri [87], *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinde bulunan glutasyonun hücre dışına en yüksek seviyede salınım yolları üzerine çalışmalar yapmışlardır [88].

Maya hücrelerinden faydalanılarak askorbik asit (C vitamini) sentezlemişlerdir [89]. Ayrıca mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) selenyum bileşiklerinin ve vitamin A ile vitamin E'nin koruyucu etkileri üzerine araştırmalar yapılmıştır [90].

Saccharomyces cerevisiae kefir tanesinden izole edilmiş mayalardandır [91]. Fermente gıda ve içeceklerin üretiminde en fazla kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*'nin laktik asit bakterilerinin gelişimini, istenmeyen mikroorganizmaların gelişiminin engellenmesi ve enzimlerin üretimi gibi çok önemli etkilerinin olduğu bildirilmiştir [92].

Saccharomyces cerevisiae ve *Saccharomyces boulardii* mayalarının son zamanlarda insan ve hayvanlarda probiyotik olarak kullanıldığı belirtilmiştir [93, 94].

GSH I geni kusurlu olan (glutasyon sentezleme yetenekleri olmayan) maya hücrelerinin üremelerinin devamı için ortama dışarıdan glutasyon ilavesinin gerekli olduğunu vurgulamışlardır [95].

S. cerevisiae'de yapılan birçok çalışmalarla, enzimlerin H_2O_2 'ya karşı oksidatif stres cevabı araştırılmıştır [96]. Ayrıca *S. cerevisiae*'de antioksidan cevabı oluşturan enzimlerden süperoksit dismutazı (SOD) ve katalazı şifreleyen genlerde mutasyonlar

yapılmış ve glutatyon düzeyleri de azaltılarak maya hücrelerinin peroksinitrit ve nitrit oksid maddelerine karşı verdikleri oksidatif stres cevabı araştırılmıştır [97].

Ayrıca maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'nın metal stresine karşı verdiği cevap mekanizmaları incelenmiştir. Cd(II) stresine maruz bırakılan maya hücrelerinin bu stres karşısında hücresel cevabını proteom analizi ile belirlemişlerdir. Araştırmada, *S. cerevisiae* hücrelerinin ağır metal stresi karşısında 54 proteinin sentezini arttırırken, 43 proteinin sentezini azalttığı bildirilmiştir [98].

1.1.17. Metal ile Mikroorganizma Arasındaki Etkileşim Mekanizması (Biyosorpsiyon)

Biyosorpsiyon veya biyoadsorpsiyon olarak adlandırılan işlem; metallerin biyokütle ile hareketsizleştirilmesi işlemidir. Bu işlemin temelinde metal ile hücre yüzeyindeki fonksiyonel gruplar arasındaki fizikokimyasal etkileşimler yer almaktadır. Bu yöntem fiziksel veya kimyasal adsorpsiyon, iyon değişimi, kompleksleştirme, şelat oluşumu ve çökelme işlemlerinden oluşmaktadır. Özellikle biyokütlenin hücre duvarlarının yapısında polisakkaritler, proteinler ve yağlar vardır. Dolayısıyla karboksilat, hidroksil, sülfat, fosfat ve amino gibi metal iyonlarıyla bağ yapabilen çeşitli fonksiyonel grupları yapısında bulundurulur. Metal iyonları bu gruplarla bağlar yaparak tutunurlar [99].

1.1.18. Biyosorpsiyonu Etkileyen Faktörler

Sıcaklık, biyokütle miktarı, pH, karıştırma hızı gibi faktörler biyosorpsiyon işlemini etkiler [99].

1.1.18.1. pH

Biyosorpsiyonun meydana geldiği çözeltinin pH'sı önemlidir. Çünkü Hidrojen (H^+) ve hidroksil (OH^-) iyonlarının kuvvetli bir şekilde adsorbe oldukları halde diğer iyonların adsorpsiyonu çözeltinin pH'ına bağlıdır [100].

1.1.18.2. Sıcaklık

Biyosorpsiyon işleminde sıcaklık önemli bir parametredir. Enerjiye bağlı mekanizmalardan dolayı mikrobiyal hücrelerle metal biyosorpsiyonunda sıcaklık önemlidir [99, 100].

1.1.18.3. Biyokütle Miktarı

Biyosorpsiyon işlemine etki eden diğer önemli parametre biyokütlenin miktarıdır. Genel olarak sabit bir başlangıç metal konsantrasyonunda çözelti ortamındaki biyokütle miktarının artması ile biyosorpsiyon da artmaktadır [101].

1.1.18.4. Karıştırma Hızı

Ağır metal biyosorpsiyonuna etki eden diğer bir faktör ise; prosesin gerçekleştiği ortamdaki karıştırma hızıdır. Adsorpsiyon hızı sistemin karıştırma hızına bağlı olarak ya film difüzyonu ya da por difüzyonu ile kontrol edilmektedir [100].

1.1.19. Ağır Metal ve Toksik Metal Kavramları

Atom ağırlığı 56'dan daha büyük olan yada 5 g/mL'den daha fazla yoğunluğa sahip olan, küçük konsantrasyonlarda bile toksik etki yapabilen elementlere ağır metal denilmektedir [102]. Bu elementler besin zincirinde birikerek insan sağlığını tehdit etmektedir [103-105].

1.1.20. Krom

1.1.20.1. Kromun Kimyasal Özellikleri ve Doğada Bulunuşu

Krom, VI B grubunda yer alan, atom numarası 24, kütle numarası 52.01 olan metalik bir elementtir. 0, +2, +3 ve +6 oksidasyon durumlarında bulunabilir. Biyolojik sistemlerde üç değerlikli krom (Cr^{+3}) bileşiklerinin fonksiyonu bulunmaktadır [106-108].

1.1.20.2. Krom Kaynakları ve Krom İhtiyacı

Öğütülmemiş tahıl ürünleri, baklagiller ve baharatların Cr içeriğinin yüksek, et, sebze ve meyvaların çoğunun ve sütün Cr içeriğinin düşük olduğu bildirilmiştir [107]. Günlük alınması gereken Cr miktarının yetişkin insanlarda 50-200 µg civarındadır [108].

1.1.20.3. Kromun Metabolizması ve Biyolojik Fonksiyonları

Basit diffüzyon dışında bir yolla krom ince bağırsakların üst bölümünden emilir [106, 109, 110]. Kan glikoz düzeyinin artışıyla birlikte hücrede insüline duyarlı transferin reseptörlerini uyarmaktadır. Bu reseptörler Cr ile yüklü transferrini bağlamaktadır. Bu

reseptör endositoz yoluyla hücreye girerek ortamın asitliğinin etkisiyle metalden ayrılır [111-113].

Kromun üç değerlikli formu memeliler için esansiyeldir [106]. Krom lipid metabolizmasının sürdürülebilmesi için gereklidir. Dokulardaki ve kan lipid seviyesinin ayarlanmasında rol alır [106, 114]. Ayrıca kromun, serum trigliserit, total kolesterol, LDL, VLDL ve serbest yağ asidi seviyelerini düşürdüğü, HDL düzeyini arttırdığı saptanmıştır [115, 116]. Dolayısıyla krom karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarını etkiler [110].

Kromun glikoz tolerans faktör (GTF)'ün yapısına katılıp, insülinle etkileşerek sindirilmiş karbonhidratların dağıtımına katkıda bulunur [106, 109].

1.1.20.4. Krom Yetersizliği ve Toksisitesi

Altı değerlikli krom bileşikleri toksiktir ve deri, sindirim sistemi ve akciğerler için korozif özellik gösterirler. Laboratuvar çalışmaları sayesinde Cr (VI)'nın bronş sisteminde kansere neden olduğu tespit edilmiştir [117]. Ayrıca krom toksisitesinde; Cr'un oksidasyon durumu ve çözünürlüğü önemlidir. Kromun saf metal halinin toksik olmayıp, Cr⁺³'ün yüksek konsantrasyonlarının toksik olabileceği bildirilmiştir. Günde Cr alımının 1 mg'a kadar zararlı olmadığı bildirilmiştir [118].

Metabolizmada Cr eksikliğinin serum glikoz, laktat ve trigliserit düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir [119].

1.1.21. Amaç

Günümüzde mayalama olayları krom kaplarda yapılmaktadır. Krom toksik metallerden olduğu için kuvvetli oksidan etkisi ile hücreleri parçalayıp zarara uğratabilir. Aynı zamanda krom oksidatif strese de yol açabilir. Bu nedenle üretilen maya hücrelerinin bir kısmına krom III klorür tuzu katılarak stres oluşturulacaktır. Stres oluşturulan bu mayalara antioksidan özelliği ispatlanan C vitamininden değişik konsantrasyonlarda katılarak; mayaların malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH), yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), antioksidan vitaminlerin (A, E, C vitamini) miktarları ve antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rd) ile süperoksit dismutaz (SOD) enzimlerinin aktiviteleri ölçülecektir. Bu ölçülecek parametrelerden;

1) Krom III klorür tuzuna maruz kalan mayaların enzimatik ve non enzimatik antioksidanlara etkileri araştırılacak,

- 2) Krom III klorür tuzuna maruz kalan mayalara değişik konsantrasyonlarda C vitamini katılması sonucu mayaların enzimatik ve non enzimatik antioksidanları araştırılacak,
- 3) Kontrol grubu dahil tüm oluşturulacak uygulama gruplarının hepsinde MDA ile GSH/GSSG stres faktörleri hesaplanarak değerlendirilmesi yapılacak,
- 4) HPLC’de ölçülen GSH ve GSSG miktarlarındaki değişim ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rd) aktiviteleri arasında bir ilişki olup, olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Maya Kùltürü (*Saccharomyces cerevisiae*)’nün Temini

Araştırmada Krom (Cr^{+3})’ un toksik etkisini araştırmak üzere maya *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve İçerikleri

Saccharomyces cerevisiae cinsi mayaların geliştirilmesinde Malt Extract Broth (MEB) sıvı besiyeri, mayaların ekim ve sayım işlemi için Malt Extract Agar (MEA) kullanılmış olup, bileşimleri aşağıda verilmiştir.

Malt Extract Broth (MEB) Sıvı Besiyeri:

<u>Bileşimi</u>	<u>gram/litre</u>
Malt extract	17,0
Mycological peptone	3,0
pH:5,4± 0,2	

Malt Extract Agar (MEA) Sıvı Besiyeri:

<u>Bileşimi</u>	<u>gram/litre</u>
Malt extract	30,0
Mycological peptone	5,0
Agar No. 2	15,0
pH: 5,4± 0,2	

Besiyeri bileşimindeki maddeler distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121°C’de 15 dakika süreyle steril edilmiştir. pH ayarları için 1 M HCl ve 1 M NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Bütün çalışmalarımızda steril cam malzeme ve steril su kullanılmıştır.

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların temin edildiği firmalar karşılarında belirtilmiştir.

- GSH-Rd (Sigma)
- GSH (Merck)

- NaN_3 (Merck)
- NADPH (Applichem)
- H_2O_2 (Merck)
- Na_2HPO_4 (Merck)
- NaCl (Merck)
- SOD standartı (Merck)
- Metanol (Sigma)
- Etanol (Sigma)
- n-Hegzan (Merck)
- Lizozom enzim standartı (Sigma)
- A vitamini standartı (Merck)
- E vitamini standartı (Merck)
- C vitamini standartı (Merck)
- 1,1,3,3- Tetra etoksi propan (Sigma)
- $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Alfa Aesar)
- Na_2CO_3 (Sigma)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma)
- KH_2PO_4 (Merck)
- NaEDTA (Merck)
- TRIS-Base (Merck)
- TRIS-Asid (Sigma)
- FAD (Fluka)
- GSSG (Sigma)
- $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- H_3PO_4 (Merck)
- HClO_4 (Merck)
- Ksantin (Sigma)
- N.B.T. (Sigma)
- Sığır Serum Albümin Standartı (BSA) (Sigma)
- Folin-Ciocalteu Reaktifi (Merck)
- Ksantin Oksidaz (Sigma)

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma)
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Nitro Blue Tetrazolium (Sigma)
- NaOH (Sigma)
- HCl (Sigma)

2.1.4. Kullanılan Alet ve Cihazlar

- Ultrasantrifüj : Beckman optima-L-70 K ultracentrifuge
- Spektrofotometre : Secomam S. 750
- pH metre : Jenway 3010 pH Meter
- Magnetik karıştırıcı : ARE Heating magnetic stirrer
- Hassas terazi : Chyo JL-189
- Karıştırıcı : NM 110 Vorteks
- Otomatik pipet : Eppendorf 50-1000 μL
- HPLC : CE 1100 Series Merck Hitachi UV Detector L-4000
- HPLC kolonları : Inertsil ODS-3 (4,6 $\times$ 250 mm, 5 μm)
Supelcosil LC-18 kolonu (25 cm $\times$ 4,6 mm, 5 μm)
Inertsil ODS-4 (4,6 $\times$ 150 mm, 5 μm)
- Otoklav : Eryiğit model ERS 2000 D Sterilizatör
- Çalkalamalı etüv : Gerhardt-Laboshake

2.1.5. Deneyde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

- **% 0,9'luk NaCl İzotonik Tuz Çözeltisinin Hazırlanışı**

% 0,9'luk NaCl izotonik tuz çözeltisini hazırlamak için 9 gr NaCl tartılarak 1000 mL'ye steril su ile tamamlandı.

- **Cr^{+3} Çözeltisinin Hazırlanması**

200 ppm 250 mL stok Cr^{+3} çözeltisini hazırlamak için, 0,256 g $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartıldı. 250 mL'ye steril su ile tamamlandı. Toplam 120 mL maya örnekleri hazırlanmak üzere Cr^{+3} stok çözeltisinden gerekli hacimlerde eklenildi.

- **C Vitamini Çözeltisinin Hazırlanması**

200 ppm 100 mL C vitamini stok çözeltisini hazırlamak için, C vitamini standardından 20 mg tartılarak steril su ile 100 mL'ye tamamlandı. Toplam 120 mL maya örnekleri hazırlanmak üzere C vitamini stok çözeltisinden gerekli hacimlerde eklendi.

- **Lizozom Enziminin Hazırlanışı**

46400 Unite/mg Lizozom enziminden 20 mg tartıldı ve pH'ı 7,38 olarak hazırlanan fosfat tamponundan 1,5 mL eklenerek enzimin iyice çözünmesi sağlandı. Böylece 13333,3 ppm enzim kaynağı hazırlanmış oldu. Bu enzim kaynağından tüplerdeki örneklerle (çökeleklere) 2 damla eklendi (0,1 mL).

2.1.6. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) Kültürünün Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma *Saccharomyces cerevisiae* olup, çalışma süresince *Saccharomyces cerevisiae* mikroorganizmasını içeren kuru maya örneği +4°C'de saklandı. Mikroorganizma kültürünün hazırlanması, ekimi ve mikroorganizma üzerine etkisi araştırılacak kimyasalların eklenmesi ve inkübasyonu da Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapıldı. Bütün kültürler 30°C'de çalkalamalı etüvde (Gerhardt-Laboshake) 150 rpm'de inkübe edildi [120]. Maya örneğinden 200 mg tartılarak 10 mL Malt Extract Broth (MEB) içeren tüpe ekim yapıldı. 30°C'de 24 saat bekletilerek ön zenginleştirme işlemi yapıldı. Zenginleştirilmiş maya örneğinden 1 mL alınarak 100 mL MEB içeren erlene aşılama yapıldı ve etüvde 30°C'de 12 saat inkübasyona bırakıldı. Maya kültürü hazırlanmış oldu. Maya örneğinin hazırlanması [84]'e göre yapıldı.

2.1.7. Maya Örneklerinde Seyreltme İşlemi ve Ekimleri

Seyreltme işlemi için % 0,9'luk NaCl izotonik tuz çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 9'ar mL cam tüplere alındı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika süreyle steril edildi. Maya örneklerinden de 1 mL alınarak cam tüplere konuldu. Böylece 10 kat seyreltme işlemi yapılmış oldu. Bütün maya örnekleri 10^6 seyreltildi. Seyreltilmiş örneklerden 1 mL alınarak üç tane petri kabına 20 mL Malt Ekstract Agar (MEA) kullanılarak ekim yapıldı. Örneklerdeki toplam hücre sayısı 10^7 hücre/mL olarak hesaplandı.

2.1.8. Deney Düzenekinin Hazırlanması

Saf olarak üretilen maya örnekleri; kontrol, uygulama I, uygulama II, uygulama III, uygulama IV, uygulama V, uygulama VI, uygulama VII ve uygulama VIII grubu olmak üzere dokuz gruba ayrıldı.

<u>Grup 1 (kontrol)</u>	= maya örneği + su
<u>Grup 2 (uygulama I)</u>	= maya örneği + 10 ppm krom III klorür tuzu+ su,
<u>Grup 3 (uygulama II)</u>	= maya örneği + 10 ppm krom III klorür tuzu +10 ppm C vitamini + su,
<u>Grup 4 (uygulama III)</u>	= maya örneği + 10 ppm krom III klorür tuzu + 15 ppm C vitamini + su,
<u>Grup 5 (uygulama IV)</u>	= maya örneği + 10 ppm krom III klorür tuzu + 20 ppm C vitamini + su,
<u>Grup 6 (uygulama V)</u>	= maya örneği + 40 ppm krom III klorür tuzu + su
<u>Grup 7 (uygulama VI)</u>	= maya örneği + 40 ppm krom III klorür tuzu + 10 ppm C vitamini + su,
<u>Grup 8 (uygulama VII)</u>	= maya örneği + 40 ppm krom III klorür tuzu + 15 ppm C vitamini + su,
<u>Grup 9 (uygulama VIII)</u>	= maya örneği + 40 ppm krom III klorür tuzu + 20 ppm C vitamini + su

katılarak 500 mL’lik erlenlerde 120 mL’lik numuneler hazırlandı. Örneklerin hepsi pH 4’e ayarlandı. Her maya örneğinde; A, E, C vitaminleri, MDA, GSH ve GSSG miktarları ile Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd) ve Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri belirlendi. Her bir örnekteki parametreler üç paralel olarak incelendi.

2.2. Metot

Tarafımızdan üretilerek dokuz gruba ayrılmış olan maya örneklerindeki A, E, C vitaminleri ve MDA miktarları ile indirgenmiş glutasyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) miktarları High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ile belirlendi. Glutasyon Peroksidaz (GSH-P_x) Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd), ve Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimlerinin aktiviteleri de spektrofotometre ile belirlendi.

2.2.1. Ham Özüt Hazırlanması

Sıvı besi ortamındaki hücrelerden ham özüt hazırlanmasında Jakubowski [121], tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Kontrol grubu ve Cr^{+3} uygulanmış deney grubundaki hücreler, 4500 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre çökeltisi, besi ortamı kalıntılarından arındırılmak üzere 2 mL steril saf su ile 2 kez yıkandı. Daha sonra pH’ı 7,38 olan fosfat tamponuyla sulandırılmış Lizozom enziminden hücre çökeltisine 2 damla eklenerek 5 dk vorteksledi. 1,5 mL deiyonize su ile süspanse edildi. Her bir örnek üzerine asit ile yıkanmış 1g cam boncuk (0,25-0,30 mm çapında) eklendikten sonra tekrar vorteksledi ve ultrasonik su banyosunda 15 dk bekletildi. Örnekler 10 dk santrifüjlendi. Üst sıvıdan 1’er mL numune tüplerine aktarıldı. Elde edilen ham özütler deneylerde kullanılmak üzere -20 °C’da saklandı.

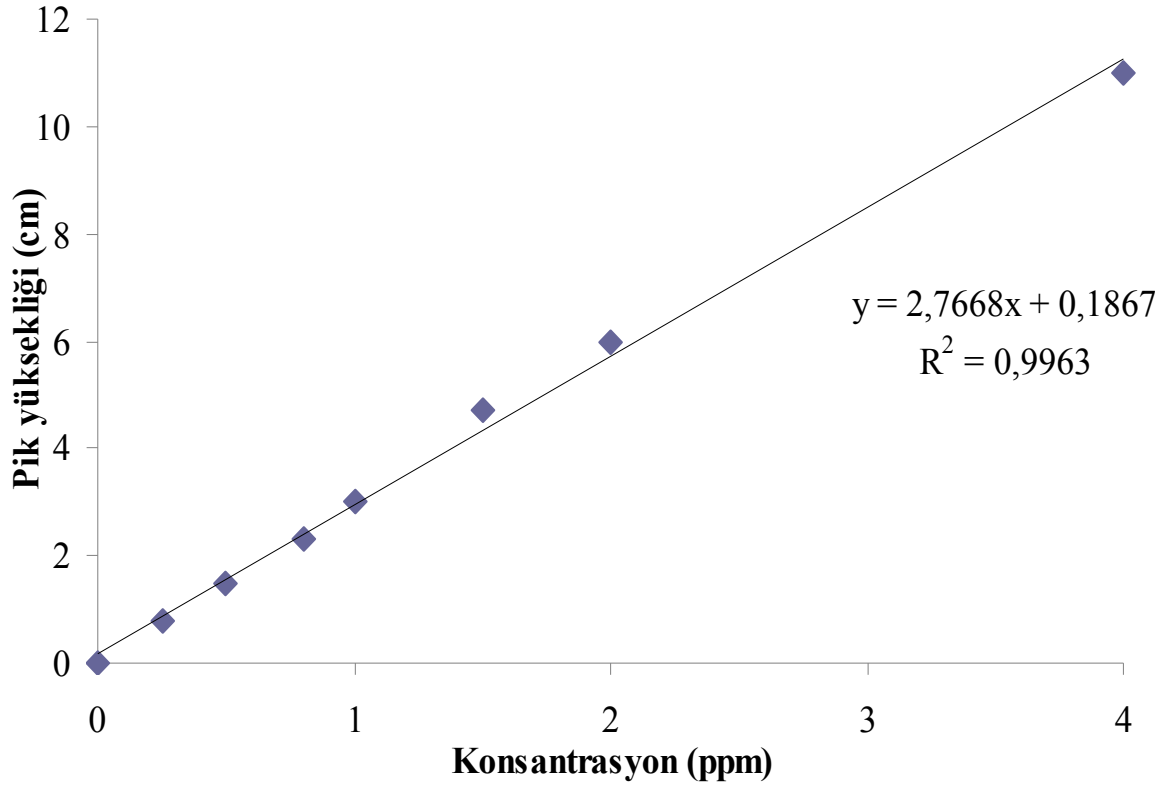
2.2.2. A ve E Vitamini Analizi

Maya özütlerinden 1 mL alınarak üzerine 2 mL Etanol:Sülfürik asit (99:1) karışımından ilave edildi. Proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Daha sonra vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 4500 devirde 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüjlenen örnekler üzerine 0,3 mL n-hekzan ilave edildi. Hekzan ilavesiyle ortamdaki yağda çözünen vitaminler hekzan fazına ekstrakte edildi. Tüpler vortekste karıştırılarak tekrar santrifüjlendi. Santrifüj sonunda hekzan fazı dikkatli bir şekilde ayrılarak cam tüpe alındı. Örnek üzerine tekrar 0,3 mL n-hekzan ilave edilerek karıştırılıp santrifüjlendi ve n-hekzan fazı cam tüpteki hekzan fazı ile birleştirildi. Ekstrakte edilen hekzan fazı azot gazı ile dikkatlice ortamdan uzaklaştırıldı. Hekzanı uzaklaştırılmış olan cam tüpteki kalıntı 0,10 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiden 20 µL alınıp HPLC’ye enjekte edildi. Her bir örnek için aynı işlemler yapıldı. HPLC’de mobil faz olarak Metanol:Su (98:2) karışımı kullanıldı. Maya örneklerindeki A vitaminleri (Retinol) Inertsil ODS-3 (4,6×250 mm, 5µm) kolonu ile mobil fazın akış hızı 0,9 mL/dk’ya ayarlanarak, 326 nm’de 4.dk’da tayin edildi. E vitamini (α -Tokoferol) miktarları SUPELCOSIL LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5µm) kolonunda 296 nm’de akış hızı 0,9 mL/dk’ya ayarlanarak 10. dk’da belirlendi [122-124].

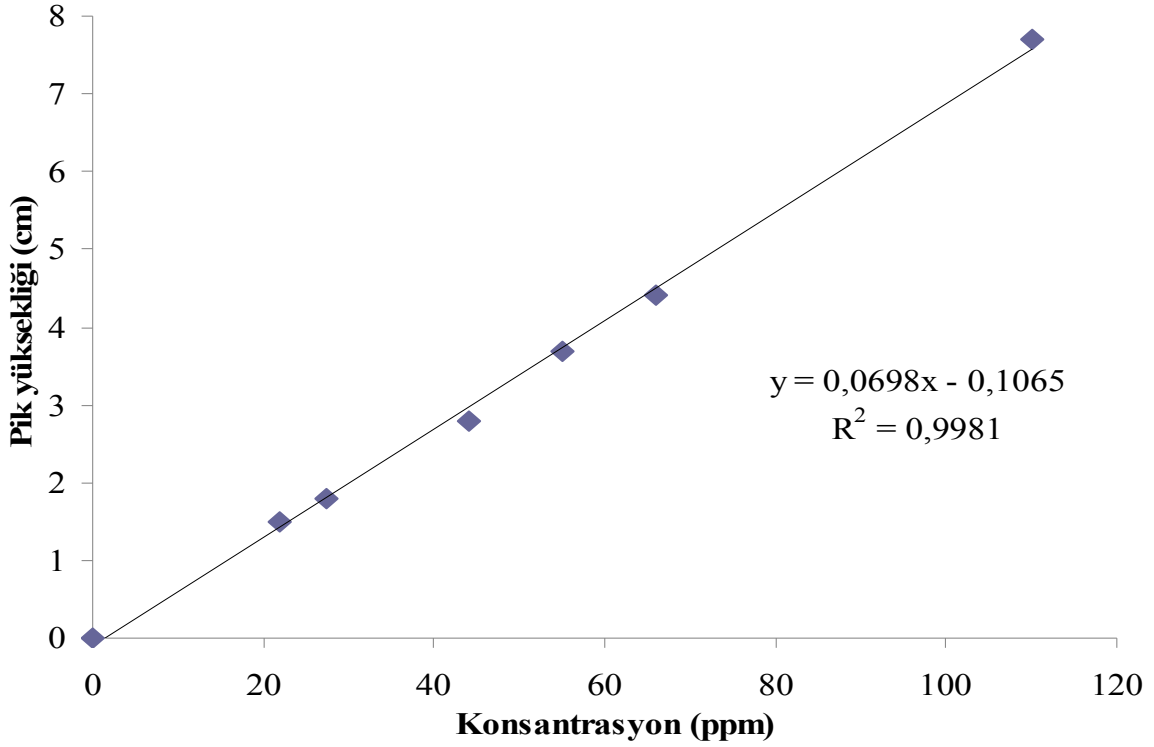
Standart A ve E Vitamini Çözeltilerinin Hazırlanması

Örneklerdeki A vitamini miktarlarının hesaplanması için, 8 mg A vitamini standartı tartılarak 10 mL’lik balonjojeye konuldu. 10 mL’ye metanolle tamamlanarak 800 ppm stok A vitamini standart stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok A vitamini çözeltisinden uygun

seyreltmeler ($C_1V_1 = C_2V_2$ formülü kullanılarak) ile değişik konsantrasyonlarda A vitamini çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin HPLC’de pik yükseklikleri belirlendi. Daha sonra konsantrasyona karşı pik yükseklikleri grafiğe alınarak A vitaminin çalışma grafiği oluşturuldu (Şekil 2.1). A vitamini çalışma grafiğinin oluşturulmasında belirtilen işlemler E vitamini içinde gerçekleştirilerek Şekil 2.2’de verilen E vitamininin çalışma grafiği çizildi. Çalışma grafiklerinden faydalanılarak örneklerdeki vitamin miktarları hesaplandı.



Şekil 2.1. A vitamini çalışma grafiği ve doğru denklemi



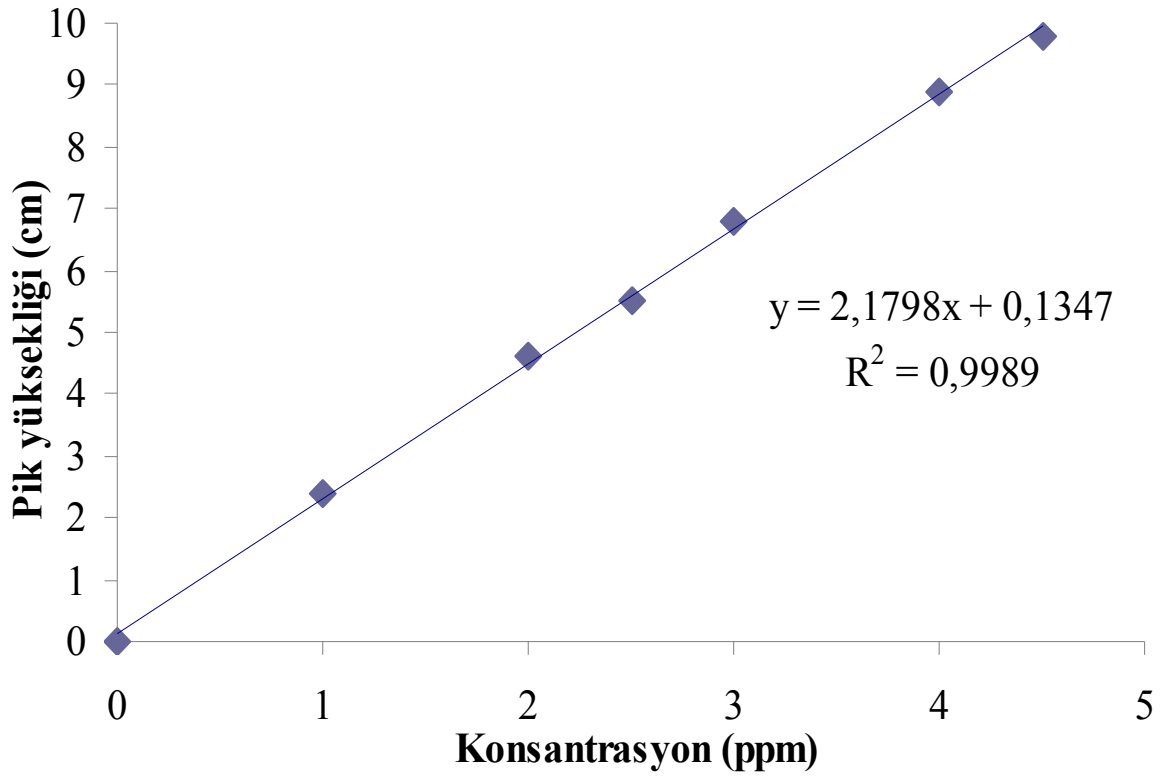
Şekil 2.2. E vitamini çalışma grafiği ve doğru denklemi

2.2.3. C Vitamini Analizi

Maya özüt örneklerinden 1 mL alınarak üzerine 0,5 M HClO₄'den 0,5 mL ilave edilerek vortekslenildi. Daha sonra vortekslenen bu karışım 4500 devir/dk'da 5 dk santrifüjlenerek proteinler çöktürüldü. Santrifüjlenen örneğin üzerindeki berrak kısımdan dikkatlice 20 µL alınarak HPLC'ye enjekte edildi [125]. HPLC'de hareketli faz olarak: 3,7 mM KH₂PO₄ (pH=4), akış hızı: 0,8 mL/dk ve 245 nm'lik dalgaboyunda, Inertsil ODS-4 (5 µm, 4,6×150 mm) kolonu kullanılarak 3,5. dk'da maya örneklerindeki C vitamini miktarları tayin edildi [126].

Standart C Vitamini Çözeltilerinin Hazırlanması

C vitamini standartından 10 mg tartılarak 10 ml'lik balonjojeye konuldu. 10 ml'ye saf su ile tamamlanarak 1000 ppm stok C vitamini çözeltisi hazırlandı. C vitamini stok çözeltisinden uygun seyreltmeler ($C_1V_1 = C_2V_2$ formülü kullanılarak) ile değişik konsantrasyonlarda C vitamini çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin HPLC'de pik yükseklikleri belirlendi. Daha sonra konsantrasyona karşı pik yükseklikleri grafiğe alınarak Şekil 2.3'de verilmiş olan C vitaminin çalışma grafiği çizildi. Örneklerdeki C vitamini miktarlarının hesaplanmasında çalışma grafiğinden faydalanıldı.



Şekil 2.3. C vitamini çalışma grafiği ve doğru denklemi

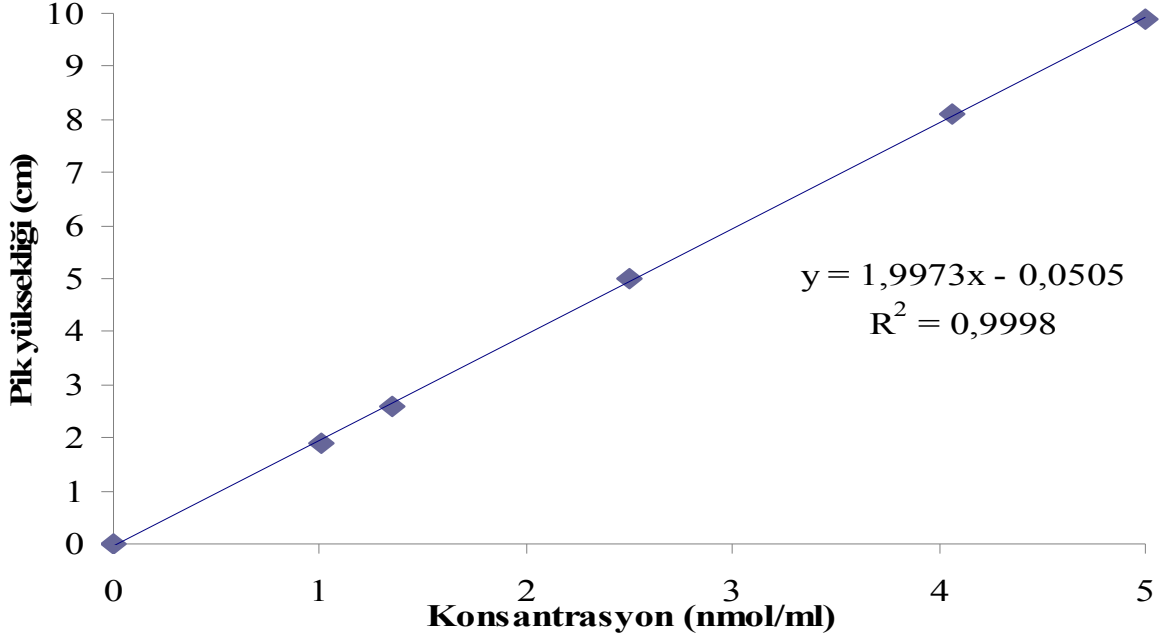
2.2.4. Malondialdehit (MDA) Analizi

Maya özüt örneklerinden 1 mL alınarak üzerine 0,5 M HClO₄'den 0,5 mL ilave edildi ve karışım iyice vortekslendi. Daha sonra bu karışım 4500 devir/dk'da 5 dk santrifüjlenerek proteinleri çöktürüldü. Santrifüjlenen süzütünün üst kısmından dikkatlice 20 µL alınarak HPLC'ye enjekte edildi. HPLC'de Inertsil ODS-4 (5 µm, 4,6×150 mm) kolonunda, 30 mM KH₂PO₄ ve metanol karışımı (%65-%35), pH:4'e H₃PO₄ ile ayarlanmış mobil faz kullanıldı. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk'ya ayarlanarak 254 nm'de 3,5. dk'da miktarları belirlendi. Örnekler 1:10 oranında seyreltildiği için seyreltme faktörü ile çarpıldı [127].

Standart MDA Çözeltilerinin Hazırlanması

10 mL'lik balonjojeye 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP)'dan 10 µL alınarak 0,1 M HCl ile toplam hacim 10 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti ağzı kapaklı bir plastik tüpe alınarak su banyosunda 100 °C'de 5 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda soğuk suya daldırılarak iyice soğutuldu. Soğutulan çözeltilerden de 100 mL'lik balonjojeye 1 mL alınarak saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı. Bu şekilde 40,6 nmol/mL (2,92 ppm) stok MDA çözeltisi hazırlanmış oldu. Bu stok çözeltilerden uygun seyreltmeler ($C_1V_1 = C_2V_2$

formülü kullanılarak) ile değişik konsantrasyonlarda MDA çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin HPLC’de pik yükseklikleri belirlendi. Daha sonra konsantrasyona karşı pik yükseklikleri grafiğe alınarak Şekil 2.4’de verilmiş olan MDA çalışma grafiği oluşturuldu. Örneklerdeki MDA miktarlarının hesaplanmasında çalışma grafiğinden faydalanıldı.



Şekil 2.4. MDA çalışma grafiği ve doğru denklemi

2.2.5. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyon Analizi

GSH ve GSSG miktarlarının belirlenmesi için maya süpernatant örneklerinden, 1 mL alınıp her birinin üzerine 0,5 M HClO₄’den 0,5 mL ilave edilerek vortekslendi. Karışım 4500 devirde 5 dk santüförlenerek proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Santrifüjlennen süzütünün üst kısmından dikkatlice 20 µL alınarak HPLC’ye enjekte edildi. HPLC’de SUPELCO Analytical EXSIL 100-5ODS (5 µm, 25cm x 4,6 mm) kolonu ve mobil faz olarak da çözücü olarak % 0,1 H₃PO₄ kullanılarak hazırlanmış olan 50 mM NaClO₄ çözeltisi kullanıldı. Mobil fazın akış hızı 0,9 mL/dk ayarlanarak 215 nm’de 6,1. dk’da indirgenmiş glutasyon (GSH) ve 23. dk’da yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) miktarları tayin edildi [128].

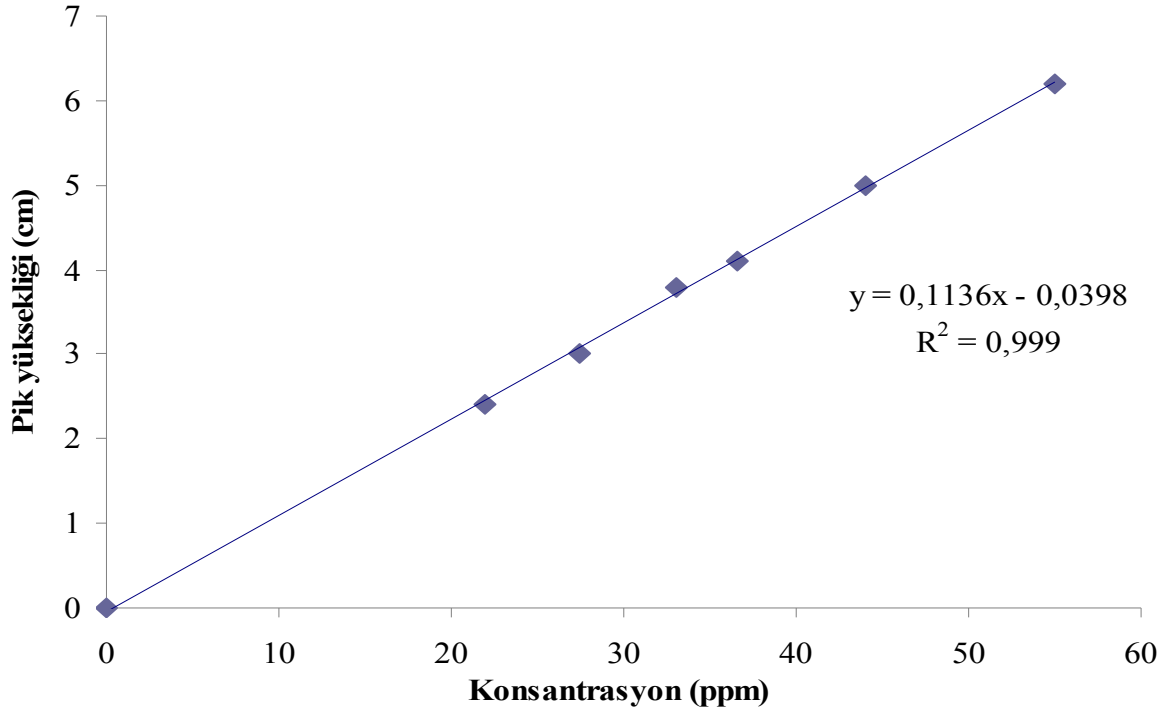
Standart İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

İndirgenmiş glutasyon (GSH)’dan 9 mg tartılarak 10 mL’lik balonjojeye alındı ve üzerine 0,5 M HClO₄’den 1 mL ilave edilerek çözüldü. Daha sonra saf su ile toplam hacmi

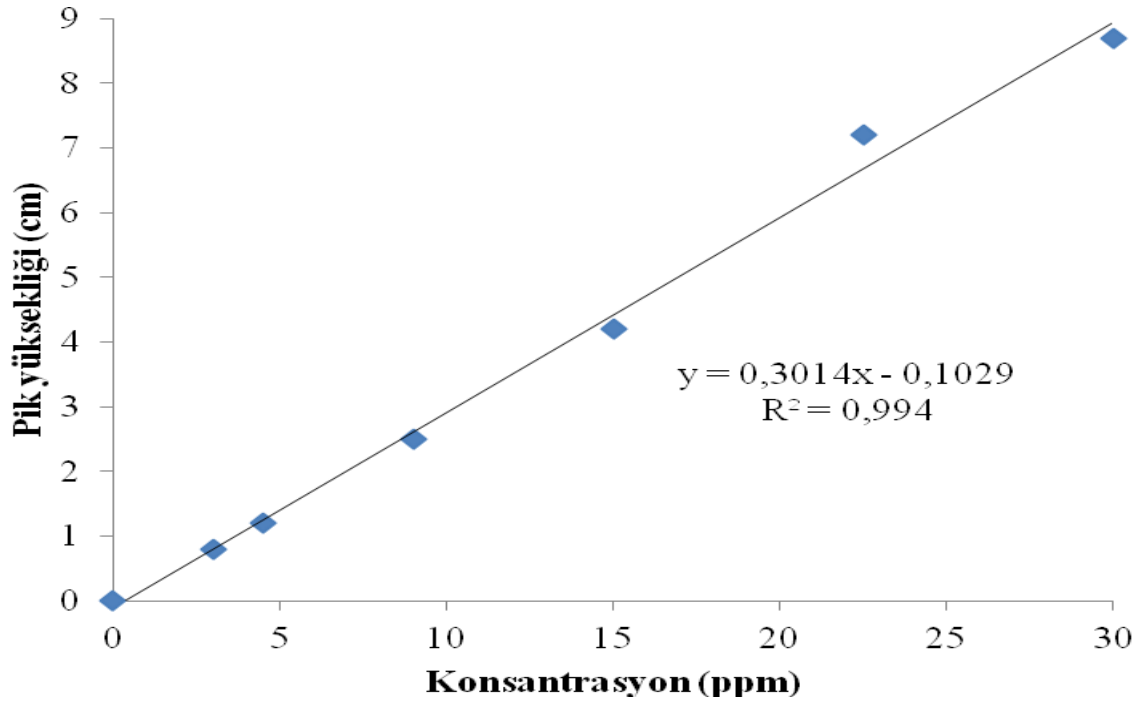
10 mL'ye tamamlanarak, 900 ppm indirgenmiş glutatyon çözeltisi hazırlandı. Bu 900 ppm stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak değişik konsantrasyonlarda indirgenmiş glutatyon çözeltileri hazırlandı.

Standart stok yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) çözeltisini hazırlamak için; 10 mL'lik balonjojeye 11 mg yükseltgenmiş glutatyon ve üzerine 0,5 M HClO₄'den 1 mL ilave edilerek çözüldü. Daha sonra saf su ile toplam hacmi 10 mL'ye tamamlanarak, 1100 µg/mL yükseltgenmiş glutatyon çözeltisi hazırlandı. Bu 1100 ppm stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak değişik konsantrasyonlarda yükseltgenmiş glutatyon çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözeltilerin HPLC'de pik yükseklikleri belirlendi. Bu pik yüksekliklerine karşı konsantrasyonlar grafiğe alınarak, çalışma grafikleri çizilip, doğru denklemleri oluşturuldu. Yükseltgenmiş ve indirgenmiş glutatyonlara ait çalışma grafikleri sırası ile Şekil 2.5 ve Şekil 2.6'da verilmiştir.

Her çalışmada yeni bir çalışma grafiği çizilerek o çalışmanın indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon verileri o günkü çalışma grafiğinin doğru denkleminde hesaplandı.



Şekil 2.5. Yükseltgenmiş glutatyon çalışma grafiği ve doğru denklemi



Şekil 2.6. İndirgenmiş glutatyon çalışma grafiği ve doğru denklemi

2.2.6. Ham Özütteki Total Protein Derişiminin Tayini

Protein tayini Lowry [129], metoduna göre yapıldı. Bu metot proteinlerin alkali bakır sülfat ilavesiyle, fosfotungstik asit ile mavi renkli kompleks oluşturması temeline dayanmaktadır. Oluşan bu renkli bileşiğin ise spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek kantitatif olarak protein miktarı belirlenir. Proteinlerin çoğunda tirozin veya triptofan veya her iki aminoasit eşit oranlarda bulunmaktadır. Bu aminoasitler, fosfotungstik-fosfo molibdik asidi (Folin-Ciocalteu) indirgeyerek mavi renk verirler. Bu yöntem ile proteinler önce alkali ortamda bakır iyonu ile reaksiyona girerek bakır-protein kompleksini oluşturur, daha sonra ortama Folin-Ciocalteu çözeltisi eklendiğinde bakır-protein kompleksi, tirozin ve triptofan kökleriyle birleşir. Bunun için içerikleri bildirilen A, B ve C çözeltileri hazırlanmıştır.

- **Çözelti A:** 20 g Na_2CO_3 ve 4g NaOH saf suda birlikte çözülüp son hacim 1 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- **Çözelti B:** 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, %1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözülüp son hacim aynı çözelti ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- **Çözelti C:** 50 mL A çözeltisi ile 1 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır (Kullanılacağı zaman hazırlanmasına dikkat edilmiştir).

- **Folin-Ciocalteu çözeltisi:** Folin-Ciocalteu saf su ile 1:1 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
- **Standart protein çözeltisi:** 1 mL’inde 0,25 mg sığır albümini olacak şekilde % 0,9’luk NaCl (serum fizyolojik) çözeltisiyle hazırlanmıştır.

Standart protein eğrisini çizimi: 6 adet deney tüpü alınarak tüplere sırasıyla standart protein çözeltisinden (0,25 mg/mL); 0, 20, 100, 200, 500, 1000 µl eklenip serum fizyolojik ile 1 mL’ye tamamlanmıştır. Bu tüplerin protein derişimleri sırasıyla 0; 0,005; 0,025; 0,05; 0,125; 0,25 mg/mL’ye karşılık gelmektedir. Hacmi 1 mL’ye tamamlanmış standart çözeltiler ile 1 mL maya örnekleri içeren her tüpe 5 mL C çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her tüpe 1:1 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisinden 0,5 mL eklenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında bekletilip tüp içeriklerinin absorbansları köre karşı 750 nm’de okunmuştur. Bu değerler derişime karşı grafiğe alınmış, örneklerin protein içerikleri aynı yöntemle standart protein eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.2.7. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Analiz Yöntemi

Prensip: GSH-Px H_2O_2 varlığında indirgenmiş glutayonun (GSH) yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini kataliz eder. H_2O_2 ’in bulunduğu ortamda GSH-Px’in oluşturduğu GSSG, GSH-Rd ve NADPH yardımıyla GSH’a indirgenir.



GSH-Px aktivitesi NADPH’ın NADP’ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm’de okunmasıyla ölçülür [130].

Deneyde Kullanılan Reaktifler

GSH (150 mM)	: 50 mg GSH 1 mL tamponda çözüldü.
NaN ₃ (1M)	: 65 mg sodyum azid 1mL tamponda çözüldü.
NADPH (3 mM)	: 10 mg NADPH 2 mL tamponda çözüldü.
GSH-Rd	: Ticari preparattan (U/mL, spesifik aktivite) direkt olarak seyreltme yapılmaksızın kullanıldı.
H ₂ O ₂ (50 mM)	: 15 µL H ₂ O ₂ alınıp hacim 5 mL ye tamponla tamamlandı.

Tampon (pH: 7,5), 50 mM fosfat tamponu = 600 mL A+ 400 mL B+ 2,08 gr EDTA'nın sodyum tuzu ile hazırlandı.

A: Na₂HPO₄, 50 mM, 7,1 gr/L **B:** KH₂PO₄ 50 mM, 6,8 gr/L

Deneyin Yapılışı

	<u>Örnek</u>	<u>Kör</u>
Fosfat tamponu (mL)	2,66	2,68
GSH (mL)	0,1	0,1
NADPH (mL)	0,1	0,1
GSH-Rd (mL)	0,01	0,01
NaN ₃ (mL)	0,01	0,01
Örnek (mL)	0,02	-

Tüpler iyice karıştırılarak oda sıcaklığında 25°C 30 dk inkübe edildi ve sürenin sonunda absorbansı okunacak her tüpe 0,1 mL H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Dalga boyu 340 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede 5 dk süre ile takip edildi. İlk absorbans-son absorbans değeri alınarak 5'e bölündü. Örneklerin pH değerleri pH=7,00'ye ayarlandıktan sonra tüm enzim analizleri yapılmıştır.

Hesaplama

ΔOD = Optik Dansite Değişimi

6,22 = 1 mM NADPH'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

V_{TOPLAM} = Toplam hacim

$V_{ÖRNEK}$ = Hemolizat hacmi

$$\Delta OD / dak = \frac{\text{İlk Absorbans} - \text{Son Absorbans}}{5} \quad (2.3)$$

$$GSH - Px \text{ Aktivitesi} (U / mL) = \frac{\Delta OD / dak}{6,22} \times \frac{V_{TOPLAM}}{V_{ÖRNEK}} \quad (2.4)$$

$$GSH - Px \text{ Spesifik Aktivitesi} (U / mg \text{ protein}) = \frac{GSH - Px \text{ Aktivitesi} (U / mL)}{\text{Protein Miktarı} (mg / mL)} \quad (2.5)$$

2.2.8. Glutatyon Redüktaz (GSH-Rd) Analiz Yöntemi

Prensip: Glutatyon redüktaz GSSG'nin NADPH tarafından GSH'a indirgenmesini katalize eder. Enzim aktivitesi, tepkime sırasında yükseltgenen NADPH'ın 37°C de 340 nm dalga boyunda absorbans farkı ile belirlenir [131].



Deneyde Kullanılan Reaktifler

1. 1M Tris tamponu (pH: 8,0)
Tris asit 8,8 g
Tris baz 5,4 g
EDTA 0,14 g
Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.
2. 10 µM FAD
100 mM stok FAD hazırlamak için 0,8 mg FAD saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.
Bu stok FAD çözeltisi 1:10 seyreltilerek 10 mM FAD hazırlanır.
3. 0,033 M GSSG
210 mg GSSG saf su ile 10 mL'ye tamamlanır. Kullanılacak olan miktar günlük olarak hazırlanır.
4. 2 mM NADPH
17 mg NADPH saf su ile 10 mL'ye tamamlanır. Kullanılacak olan miktar günlük olarak hazırlanır.

Denevin Yapılışı

Ayrıraçlar 1 mL'lik tüplere tablodaki gibi ilave edilir.

	<u>Kör (µL)</u>	<u>Örnek(µL)</u>
1M TRIS tamponu	50	50
Hemolizat	-	100
Saf su	790	690
10 µM FAD	100	100
	37°C de 10 dk inkübasyon	
0,033 M GSSG	100	100
	37°C de 10 dk inkübasyon	
2 mM NADPH	50	50

Hesaplama

ΔOD = Optik Dansite Değişimi

6,22 = 1 mM NADPH'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

V_{Toplam} = Toplam hacim

$V_{\text{Örnek}}$ = Hemolizat hacmi

$$\Delta OD / dak = \frac{\text{İlk Absorbans} - \text{Son Absorbans}}{5} \quad (2.7)$$

$$GSH - Rd \text{ Aktivitesi} (U / mL) = \frac{\Delta OD / dak}{6,22} \times \frac{V_{\text{TOPLAM}}}{V_{\text{ÖRNEK}}} \quad (2.8)$$

$$GSH - Rd \text{ Spesifik Aktivitesi} (U / mg \text{ protein}) = \frac{GSH - Rd \text{ Aktivitesi} (U / mL)}{\text{Protein Miktarı} (mg / mL)} \quad (2.9)$$

2.2.9. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini

SOD aktivitesi Sun [132], tarafından önerilen yöntem kullanılarak tayin edilmiştir. SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin (2.10), nitro blue tetrazolium (N.B.T) ile meydana getirdiği mavi renkli formazan boyasının 560 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Örnekte bulunan SOD, süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak (2.11) numaralı formazan reaksiyonunu inhibe eder. Dolayısıyla formazon oluşumunun inhibisyonun tayiniyle SOD miktarı indirekt olarak saptanmaktadır.



Reaktif Çözeltilisinin Bileşenleri:

- **Ksantin çözeltisi (0,3 mM):** 9,13 mg ksantin tartılarak önce birkaç damla 1N NaOH ile çözüldü. Daha sonra hacim saf su ile 200 mL' ye tamamlandı.
- **EDTA (0,6 mM):** 22,3 mg EDTA tartılarak toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.
- **NBT (150 µg/L):** 12,3 mg NBT tartılıp toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.
- **Na₂CO₃ (400 mM):** 4,24 g Na₂CO₃ alınarak toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.
- **BSA (1 g/L):** 25 mg BSA tartılarak toplam hacim 25 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.
- **Ksantin oksidaz:** (167 U/L) enziminden 48 µL alındı, 3 mL 2M buz soğukluğunda (NH₄)₂SO₄'da çözülerek buz içinde bekletilmiştir.
- **(NH₄)₂SO₄ (2M):** 2,643 g (NH₄)₂SO₄ tartılıp toplam hacim 10 mL olacak şekilde saf su içerisinde çözüldü.

- **CuCl₂.2H₂O (0,8 mM):** 13,6 mg CuCl₂.2H₂O alınarak toplam hacim 100 mL olacak şekilde saf suda çözüldü.

Reaktif Çözeltisinin Hazırlanışı (27 örneklik) : 40 mL ksantin çözeltisi, 20 mL EDTA çözeltisi, 20 mL NBT çözeltisi, 12 mL Na₂CO₃ çözeltisi ve 6 mL BSA çözeltisi alınarak karıştırıldı. Her çalışmada reaktif çözeltisi taze olarak hazırlandı.

Denevin yapılışı

	<u>Kör (mL)</u>	<u>Numune (mL)</u>
Reaktif	1,425	1,425
Örnek	-----	0,05
Ksantin oksidaz (XOD)	0,025	0,025

Karıştırılır ve oda sıcaklığında 20 dk bekletilir

CuCl₂	0,05	0,05
Örnek	0,05	-----

SOD aktivitesinin tayini için her bir örnek için iki tüp alındı. Birinci tüp kör için ikinci tüp ise örnek için kullanıldı. Kör tüpüne 1,425 mL reaktif karışımı konuldu üzerine 0,025 mL ksantin oksidaz çözeltisi ilave edildi, karıştırılarak 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda 0,05 mL CuCl₂ eklenerek reaksiyon durduruldu. Son olarak proteinden kaynaklanan absorbansın sonuçları etkilememesi için 0,05 mL örnek eklendi ve spektrofotometrede 560 nm de saf suya karşı okuma yapıldı. Örnek tüpüne yine 1,425 mL reaktif karışımı üzerine 0,05 mL örnek ve 0,025 mL ksantin oksidaz ilave edilip, 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0,05 mL bakır klorür ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve 560 nm de absorbansları okundu.

Hesaplama:

1 ünite SOD, nitroblue tetrazolium redüksiyonunu %50 inhibe eden protein miktarı olarak tanımlanmıştır.

$$\%İnhibisyon = \frac{(Absorbans\ kör - Absorbans\ numune) \times 100}{Absorbans\ kör} \quad (2.13)$$

$$Aktivite(U / mL) = \frac{\%İnhibisyon}{50 \times 0,1} \quad (2.14)$$

$$Spesifik\ aktivite(U / mg\ protein) = \frac{Aktivite(U / mL)}{Protein\ miktarı(mg / mL)} \quad (2.15)$$

2.2.10. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmadaki tüm istatistiksel değerlendirmeler SPSS 17.0 bilgisayar programı ile yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. One-Sample T testi kullanıldı. $P < 0,05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edildi.

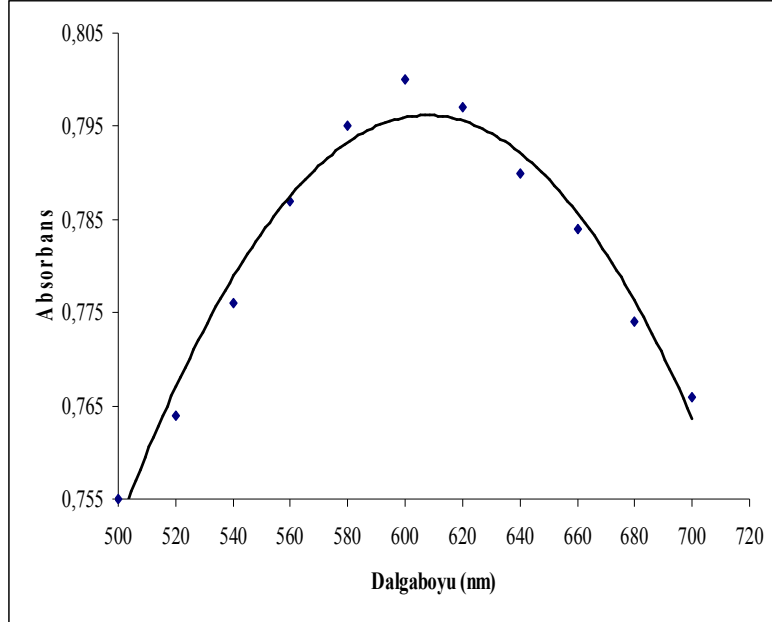
3. BULGULAR

3.1. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'nın Spektrofotometrede Sayımı

Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'nın spektrofotometrede sayımını yapmak için maya kültüründen spektrofotometrede okunacak derişimde maya kültürü hazırlandı. Kör olarak besi ortamı Malt Extract Broth (MEB) kullanıldı. Spektrofotometrede en yüksek tanecik sayısını ölçebilecek dalga boyunun saptanması için, aynı maya örneğinin çeşitli dalga boylarında absorbansları ölçüldü. En uygun dalga boyunun 600 nm olduğu belirlendi.

Tablo 3.1. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'nın çeşitli dalgaboylarındaki absorbans değerleri

Dalgaboyu	Absorbans
500	0,755
520	0,764
540	0,776
560	0,787
580	0,795
600	0,800
620	0,797
640	0,790
660	0,784
680	0,774
700	0,766



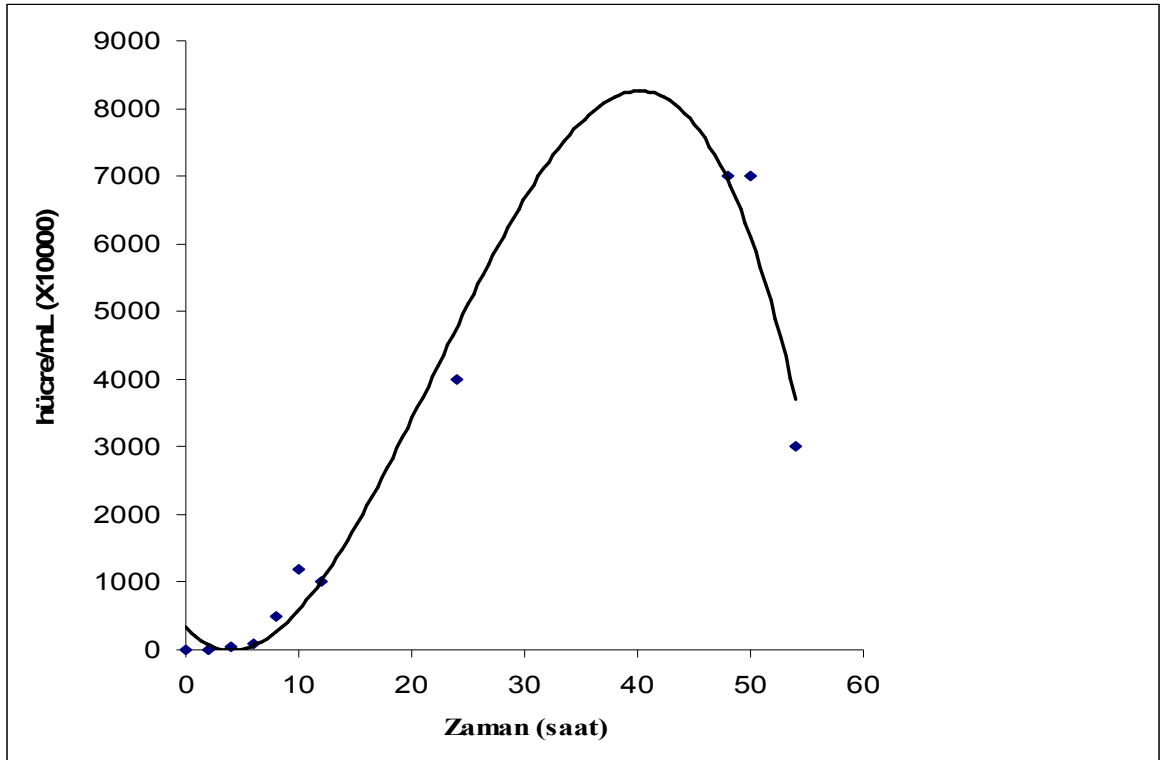
Şekil 3.1. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'nın çeşitli dalgaboylarındaki absorbans değerleri

3.2. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'nın Üreme Eğrisi

Oksidatif stres uygulaması, maya kültürünün hücre sayısı 10^7 hücre/mL değerine ulaştığında gerçekleştirileceği için, kültürün üreme eğrisi çizildi. Öncelikle kültür 2 saat aralıklarla takip edilerek hem spektrofotometrede 600 nm'de hem de petri kaplarına ekim yapılarak mikroorganizma sayım işlemi gerçekleştirildi. Maya kültürünün hücre/mL sayısı olarak belirlendi. Tablo 3.2'deki verilerden yararlanılarak çizilen üreme eğrisi Şekil 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)’nin 600 nm’de süreye bağlı olarak, absorbans değerlerine karşılık gelen tanecik sayıları

Zaman	Absorbans	Hücre sayısı/mL
0.saat	0,108	2×10^4
2.saat	0,144	3×10^4
4.saat	0,200	5×10^5
6.saat	0,252	9×10^5
8.saat	0,300	5×10^6
10.saat	0,418	12×10^6
12.saat	0,662	1×10^7
24.saat	0,730	4×10^7
48.saat	0,824	7×10^7
50.saat	0,824	7×10^7
54.saat	0,712	3×10^7



Şekil 3.2. *Saccharomyces cerevisiae* kültürlerinde zamana bağlı üremenin izlenmesi

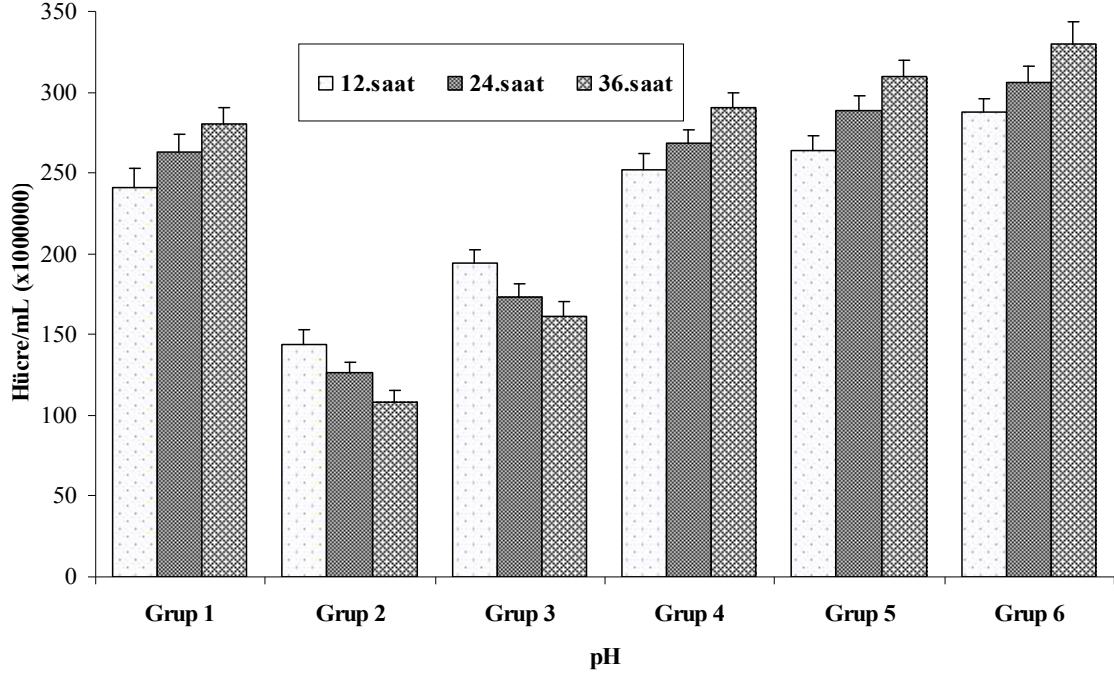
3.3. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'ya Uygulanacak Uygun pH'ın Belirlenmesi

Literatürde *S. cerevisiae* mayasının optimum çoğalma pH değeri 3-7 olarak geniş bir aralık şeklinde verilmiştir [133]. Çalışmamızdaki uygun pH değerini belirlemek için maya kültürümüzden aynı miktarda (6 mL) olmak şartıyla beş tane erlene örnekler alındı. 200 ppm stok Cr^{+3} çözeltisinden uygun seyreltmeler ($C_1V_1 = C_2V_2$ formülü kullanılarak) ile örneklerin hepsinin 10 ppm Cr^{+3} dozunda olması için 0,5 mL eklenildi. Toplam hacim 10 mL olacak şekilde steril saf su eklenildi. Örneklerin pH'ı 3, 4, 5, 6, 7 olacak şekilde ayarlanarak 30 °C'deki çalkalamalı etüve bırakıldı. pH ayarları için 1 M HCl ve 1 M NaOH çözeltileri kullanıldı. 12. saat, 24. saat ve 36. saatteki maya kültürleri 10^6 seyreltilerek 3 tane petri kabına Malt Extract Ağar (MEA) kullanılarak ekildi. Mikroorganizmanın sayımı yapıldı. Mililitredeki tanecik sayıları belirlendi (cfu/mL). Metal-mikroorganizma etkileşiminde pH önemli bir parametredir. Metal alımının pH'a bağlı olması sorpsiyon ortamının yüzeyindeki protonlar ve metal katyonları arasındaki rekabetle ilgilidir. Hücre yüzeyleriyle metal arasındaki bu farklı kimyasal etkileşimler sonucunda metal iyonları için çeşitli pH'larda farklı tutma kapasiteleri olabilmektedir [100]. Krom metalinin mayadaki toksik etkisini araştırmada pH'ın etkisi araştırıldı. pH 3.0 ve 4.0'te kromun mayada toksik etki yaptığı belirlendi (Tablo 3.3 ve Şekil 3.3). Çalışmamızda 10 ve 40 ppm krom konsantrasyonlarında çalışılacağı ve maya mikroorganizmasının yağda çözünen vitaminler (A, D, E ve K) bakımından fakir olması nedeniyle [65] bu vitaminlerin miktarlarının ölçülebilmesi için pH=4.0'te çalışılmaya karar verildi.

Tablo 3.3. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'ya pH'ın etkisi (Tanecik sayıları ve standart sapmalar 10^6 ile çarpılmalıdır.)

Gruplar / Zaman	12. saat (a)	24. saat (b)	36. saat (c)	p
Grup1 (Başlangıç kültür)	241±11,53	263±10,82	280±10,00	c>b>a p<0,005
Grup 2 (pH=3.0 cfu/mL)	144±8,72	126±7,00	108±7,21	a>b>c p<0,05
Grup 3 (pH=4.0 cfu/mL)	194±8,72	173±8,18	161±9,64	a>b>c p<0,005
Grup 4 (pH=5.0 cfu/mL)	252±10,15	268±8,54	290±10,00	c>b>a p<0,005
Grup 5 (pH=6.0 cfu/mL)	264±9,16	289±8,54	310±10,00	c>b>a p<0,005
Grup 6 (pH=7.0 cfu/mL)	288±8,00	306±10,00	330±14,00	c>b>a p<0,005
p	6>5>4>1>3>2 p<0,005	6>5>4>1>3>2 p<0,005	6>5>4>1>3>2 p<0,005	

Not: Dikey sütunlar kontrol grubu ile diğer grupların karşılaştırılmasıdır. Yatay sütunlar grupların zamana karşı karşılaştırılmasıdır. ($p < 0,005$: ileri derecede anlamlı; $p < 0,05$: anlamlı; $p > 0,05$ anlamsız)



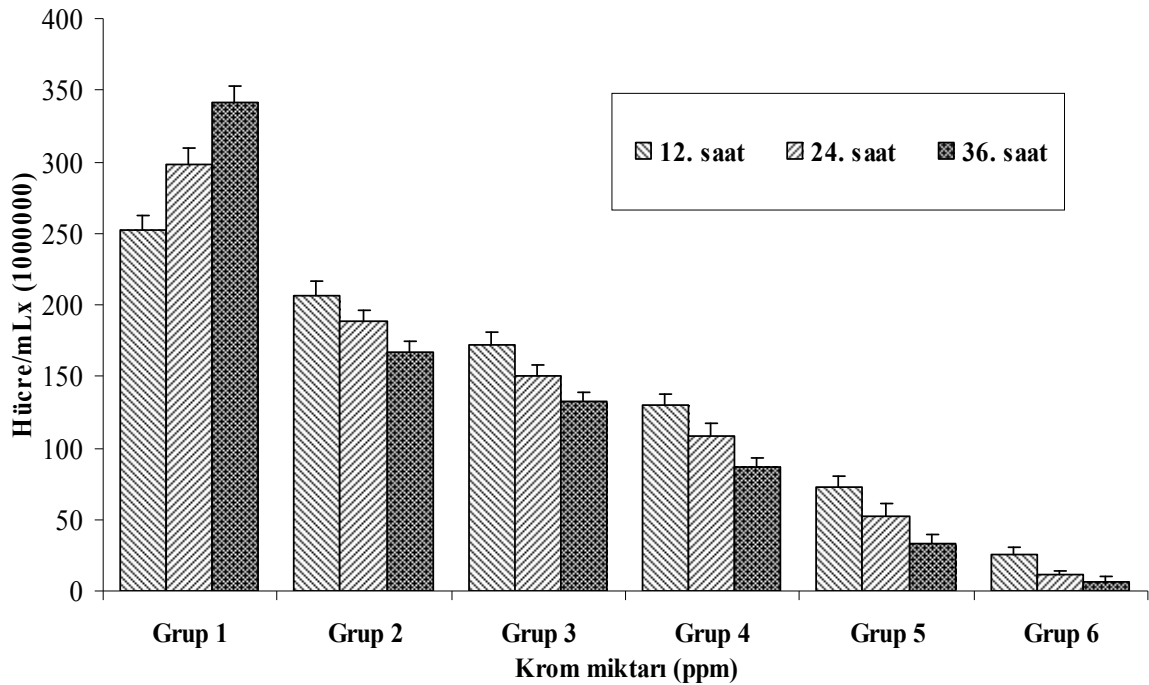
Şekil 3.3. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'ya pH'ın etkisi

3.4. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'ya Uygulanacak Cr^{+3} Dozunun Belirlenmesi

200 ppm 100 mL Cr^{+3} stok çözeltisini hazırlamak için $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ tuzundan 0,102 g tartılarak toplam hacmi 100 mL'ye steril su ile tamamlandı. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'da kromun toksik etkisini araştırmak için aynı miktar (6 mL) maya örneklerine 200 ppm stok Cr^{+3} çözeltisinden uygun seyreltmeler ($C_1V_1 = C_2V_2$ formülü kullanılarak) ile 10 ppm krom dozu için 0,5 mL, 20 ppm krom dozu için 1 mL, 30 ppm krom dozu için 1,5 mL, 40 ppm krom dozu için 2 mL ve 50 ppm krom dozu için 2,5 mL, 200 ppm stok Cr^{+3} çözeltisinden eklendi. Örneklerin toplam hacimleri steril saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Bütün örneklerin pH'ı 4.0'e ayarlanarak 30°C'deki çalkalamalı etüve bırakıldı. Başlangıç kültürdeki tanecik sayısı belirlenerek, değişik konsantrasyonlarda Cr^{+3} eklenen numunelerin 12. saat, 24. saat ve 36. saat sonunda tanecik sayılarının nasıl değiştiği gözlemlendi. Çalışmamızda maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'ya uygulanmak üzere 10 ppm Cr^{+3} ile 40 ppm Cr^{+3} dozları seçildi.

Tablo 3.4. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)’ya kromun etkisi (Tanecik sayıları ve standart sapmalar 10^6 ile çarpılmalıdır.)

Gruplar / Zaman	12. saat a	24. saat b	36. saat c	p
Grup 1 (Başlangıç kültür cfu/mL)	252±10,00	298±11,14	342±11,13	a<b<c p<0,05
Grup 2 (10 ppm Cr ⁺³ cfu/mL)	206±10,60	188±8,00	167±7,55	a>b>c p<0,005
Grup 3 (20 ppm Cr ⁺³ cfu/mL)	172±9,16	150±8,00	132±7,21	a>b>c p<0,05
Grup 4 (30 ppm Cr ⁺³ cfu/mL)	130±7,21	108±9,16	86±7,21	a>b>c p<0,05
Grup 5 (40 ppm Cr ⁺³ cfu/mL)	72±8,00	52±9,29	33±6,25	a>b>c p<0,05
Grup 6 (50 ppm Cr ⁺³ cfu/mL)	25±5,00	12±2,64	7±2,64	a>b>c p>0,05
p	1>2-6 p<0,05	1>2-6 p<0,05	1>2-6 p<0,05	



Şekil 3.4. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)’ya kromun etkisi

3.5. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)’ya Uygulanacak C Vitamini Dozlarının Belirlenmesi

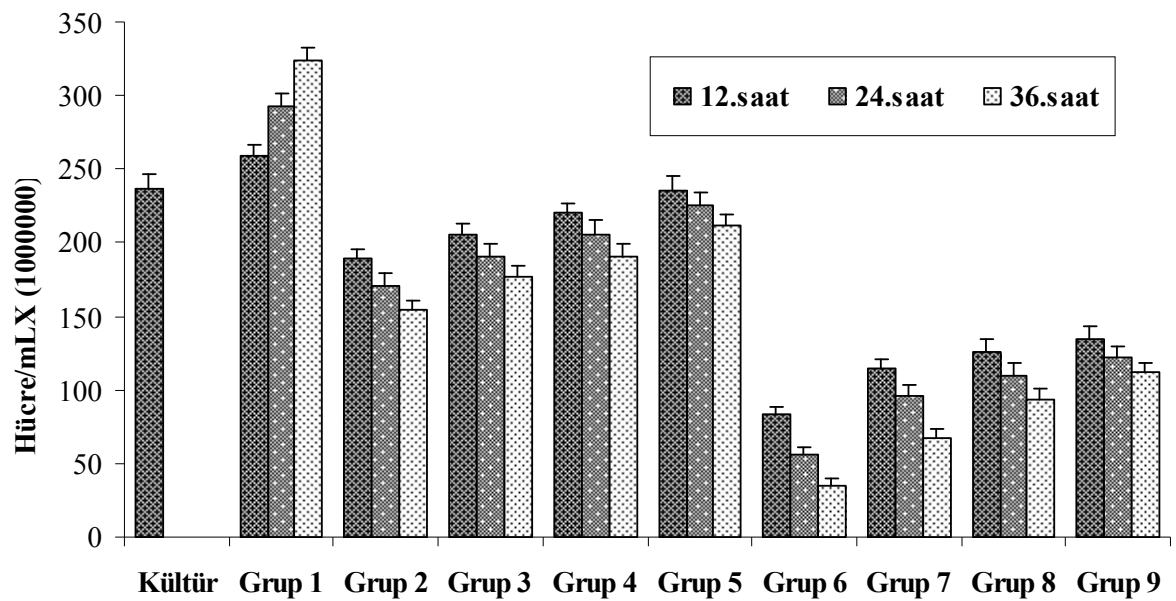
Kwolek-Mirek [134], maya (*Saccharomyces cerevisiae*) hücrelerini Akrilamid’e maruz bırakarak SOD (Süperoksit Dismutaz) enzim aktivitesini ölçmüşlerdir. Ayrıca ortama 5, 10 ve 20 mM Askorbat ekleyerek SOD (Süperoksit Dismutaz) enzim aktivitesinin nasıl değiştiği incelemişlerdir. Çalışmamızda 10 ve 40 ppm krom (Cr⁺³) dozuna maruz bırakılan maya örneklerimizin bazılarına 10, 15 ve 20 ppm konsantrasyonlarda C vitamini eklendi. Öncelikle 200 ppm C vitamini stok çözeltisi hazırlandı. 120 mL maya örnekleri hazırlamak

için; maya örneklerimizin bir kısmına 200 ppm C vitamini stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak ($C_1V_1 = C_2V_2$ formülü kullanılarak), 10 ppm C vitamini için 6 mL, 15 ppm C vitamini için 9 mL ve 20 ppm C vitamini için 12 mL stok C vitamini çözeltisinden eklenildi [134]. Kromun toksik etkilerine karşı C vitamininin antioksidan parametreler üzerine etkileri araştırıldı.

3.6. C Vitamini, Glutasyon (GSH, GSSG) ve MDA Analizlerinin İncelendiği Maya Örneklerindeki Tanecik Sayıları

Tablo 3.5. C vitamini, Glutasyon (GSH, GSSG) ve MDA ölçümlerindeki tanecik sayıları (Tanecik sayıları ve standart sapmalar 10^6 ile çarpılmalıdır.)

Gruplar / Zaman Başlangıç kültür (237±9,85) (cfu/mL)	12. saat (cfu/mL) a	24. saat (cfu/mL) b	36. saat (cfu/mL) c	p
Grup 1 (Kontrol grubu)	259±7,55	293±9,00	324±8,72	c>b>a p<0,005
Grup 2 (10 ppm krom)	189±7,00	171±8,54	155±5,57	a>b>c p<0,005
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	206±7,21	191±8,54	177±7,55	a>b>c p<0,005
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	220±7,21	206±8,89	190±9,16	a>b>c p<0,005
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	235±10,00	226±8,72	212±7,21	a>b>c p<0,005
Grup 6 (40 ppm krom)	83±5,57	56±5,57	35±5,00	a>b>c p<0,05
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	114±7,21	96±7,21	67±6,24	a>b>c p<0,05
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	126±8,00	110±8,00	94±7,21	a>b>c p<0,05
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	134±8,71	122±8,00	112±6,00	a>b>c p<0,005
p	1>2,5>6,9 p<0,005	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	

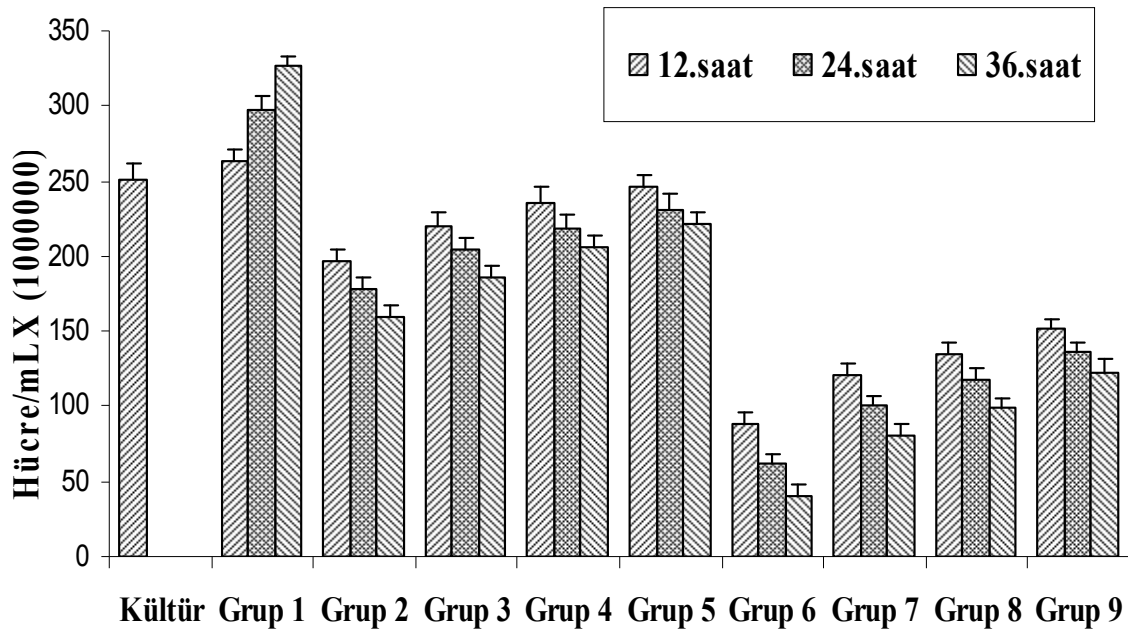


Şekil 3.5. C vitamini, Glutasyon (GSH, GSSG) ve MDA ölçümlerindeki tanecik sayıları

3.7. Maya Örneklerindeki A ve E Vitaminleri, Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd), Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Total Protein Analizlerindeki Tanecik Sayıları

Tablo 3.6. Zamana bağlı olarak gruplardaki tanecik sayıları (Tanecik sayıları ve standart sapmalar 10^6 ile çarpılmalıdır).

Gruplar / Zaman	12. saat (cfu/mL) a	24. saat (cfu/mL) b	36. saat (cfu/mL) c	p
Başlangıç kültür (251±10,15) (cfu/mL)				
Grup 1 (Kontrol grubu)	264±7,21	298±8,00	326±7,21	c>b>a p<0,005
Grup 2 (10 ppm krom)	196±8,00	178±7,21	160±8,00	a>b>c p<0,005
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	220±9,16	204±8,89	186±7,21	a>b>c p<0,005
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	236±9,64	218±9,16	206±7,55	a>b>c p<0,005
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	247±7,00	231±10,15	221±8,54	a>b>c p<0,005
Grup 6 (40 ppm krom)	88±7,55	62±6,00	41±6,58	a>b>c p<0,05
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	121±7,00	100±7,21	81±6,56	a>b>c p<0,05
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	135±7,55	118±8,00	99±6,24	a>b>c p<0,05
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	151±6,56	136±6,00	123±7,94	a>b>c p<0,005
p	1>2,5>6,9 p<0,005	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	



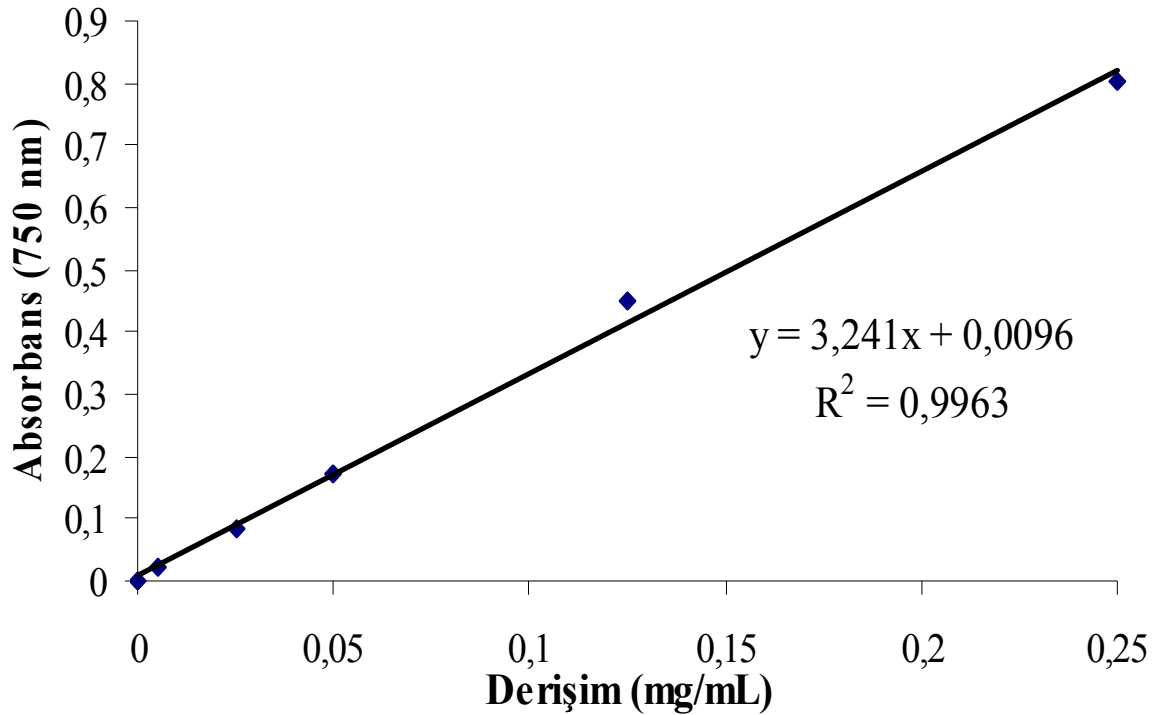
Şekil 3.6. Zamana bağlı olarak gruplardaki tanecik sayıları sayıları

3.8. Protein Tayini

Örneklerdeki protein miktarları Lowry [129], metoduna göre hesaplanmıştır. Protein miktarlarının hesaplanması amacıyla değişik konsantrasyonlarda hazırlanan sığır serum albumini (BSA) çözeltileri kullanılarak absorbans değerleri belirlenmiştir (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Sığır serum albumin standart (BSA) protein eğrisi değerleri

Derişim (mg/mL)	Absorbans (750 nm)
0,005	0,022
0,025	0,086
0,050	0,170
0,125	0,452
0,250	0,802

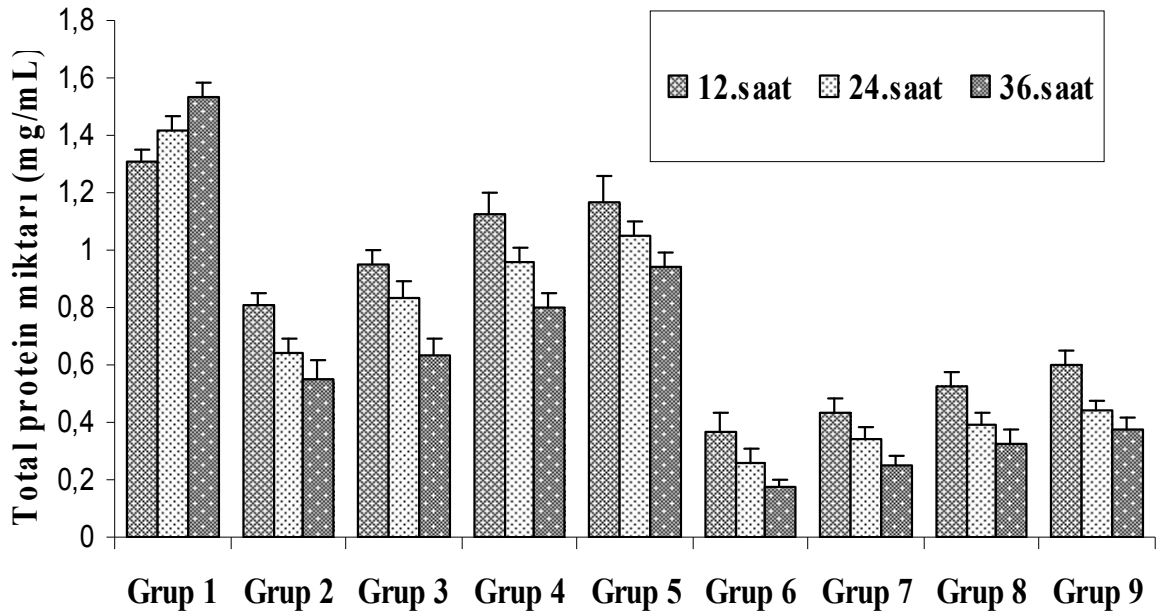


Şekil 3.7. Sığır serum albumin standart (BSA) protein eğrisi

Tablo 3.7'deki verilere göre oluşturulan standart (BSA) protein eğrisi Şekil 3.7'de görülmektedir. Protein miktarları Şekil 3.7'deki standart protein çalışma grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Örneklerin total protein miktarları (mg/mL) olarak aşağıdaki Tablo 3.8' ile Şekil 3.8'de belirtilmiştir.

Tablo 3.8. Maya örneklerindeki total protein miktarları

Gruplar / Zaman	12. saat (mg/mL) a	24. saat (mg/mL) b	36. saat (mg/mL) c	p
Grup 1 (Kontrol grubu)	1,31±0,04	1,41±0,05	1,53±0,05	c>b>a p<0,005
Grup 2 (10 ppm krom)	0,81±0,04	0,64±0,05	0,55±0,07	a>b>c p<0,05
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	0,95±0,05	0,83±0,06	0,63±0,06	a>b>c p<0,05
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	1,12±0,08	0,96±0,05	0,80±0,05	a>b>c p<0,05
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	1,17±0,09	1,05±0,05	0,94±0,05	a>b>c p<0,005
Grup 6 (40 ppm krom)	0,37±0,06	0,26±0,05	0,17±0,03	a>b>c p<0,05
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	0,44±0,05	0,35±0,04	0,25±0,04	a>b>c p<0,05
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	0,53±0,05	0,39±0,04	0,33±0,05	a>b>c p<0,05
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	0,60±0,05	0,44±0,03	0,38±0,04	a>b>c p<0,05
p	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	



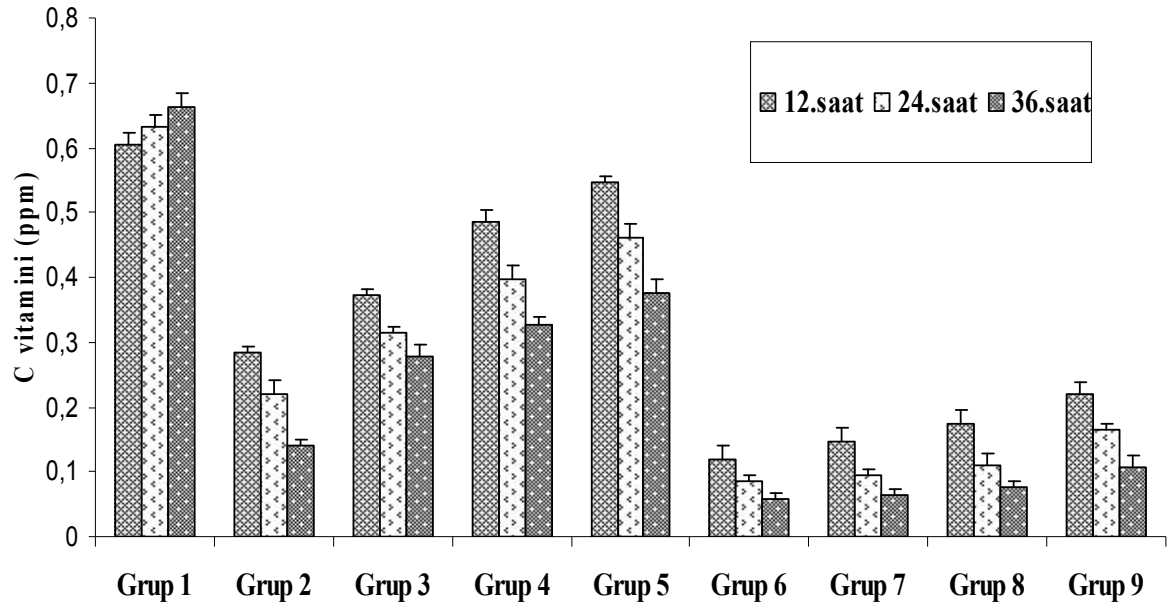
Şekil 3.8. Maya örneklerindeki total protein miktarları

3.9. Maya Örneklerindeki C Vitamini Sonuçları

Maya örneklerindeki C vitamini (Askorbik asit) miktarları aşağıdaki Tablo 3.9 ile Şekil 3.9'da gösterilmiştir.

Tablo 3.9. Maya örneklerindeki C vitamini miktarları

Gruplar / Zaman	12. saat ppm (µg/g)	24. saat ppm (µg/g)	36. saat ppm (µg/g)	p
Grup 1 (Kontrol grubu)	0,60±0,02	0,63±0,02	0,66±0,02	c>b>a p<0,005
Grup 2 (10 ppm krom)	0,28±0,01	0,22±0,02	0,14±0,01	a>b>c p<0,05
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	0,37±0,01	0,31±0,01	0,28±0,02	a>b>c p<0,05
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	0,48±0,02	0,40±0,02	0,33±0,01	a>b>c p<0,05
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	0,55±0,01	0,46±0,02	0,38±0,02	a>b>c p<0,05
Grup 6 (40 ppm krom)	0,12±0,02	0,09±0,01	0,06±0,01	a>b>c p>0,05
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	0,15±0,02	0,09±0,01	0,06±0,01	a>b>c p>0,05
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	0,17±0,02	0,11±0,02	0,08±0,01	a>b>c p>0,05
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	0,22±0,02	0,16±0,01	0,11±0,02	a>b>c p>0,05
p	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p>0,05	1>2,5>6,9 p>0,05	



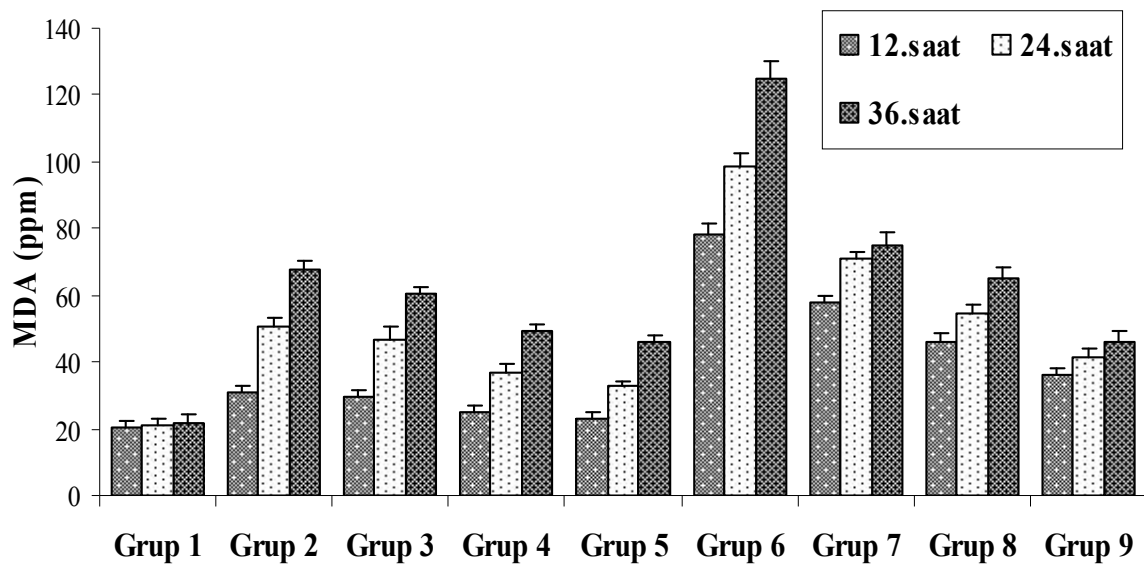
Şekil 3.9. Maya örneklerindeki C vitamini miktarları

3.10. Maya Örneklerindeki Malondialdehit (MDA) Miktarları

Dokuz gruba ayrılarak incelenen maya örneklerindeki Malondialdehit (MDA) miktarları aşağıdaki Tablo 3.10 ile Şekil 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.10. Maya örneklerindeki Malondialdehit (MDA) miktarları

Gruplar / Zaman	12. saat (ppm) a	24. saat (ppm) b	36. saat (ppm) c	p
Grup 1 (Kontrol grubu)	20,47±1,66	21,04±1,90	21,90±2,71	c>b>a p<0,005
Grup 2 (10 ppm krom)	32,20±1,80	50,58±2,70	67,75±2,64	c>b>a p<0,05
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	29,57±1,66	46,82±3,52	60,66±1,87	c>b>a p<0,05
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	24,95±1,90	36,89±2,55	49,26±1,88	c>b>a p<0,05
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	22,76±2,08	32,56±1,68	45,73±2,39	c>b>a p<0,05
Grup 6 (40 ppm krom)	78,30±3,05	98,68±4,18	125,21±5,14	c>b>a p<0,05
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	58,02 ±1,97	70,66±2,44	75,23±3,60	c>b>a p<0,05
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	46,30±2,65	54,58±2,31	64,81±3,29	c>b>a p<0,05
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	36,02±2,14	41,42±2,90	46,11±3,28	c>b>a p<0,005
p	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	



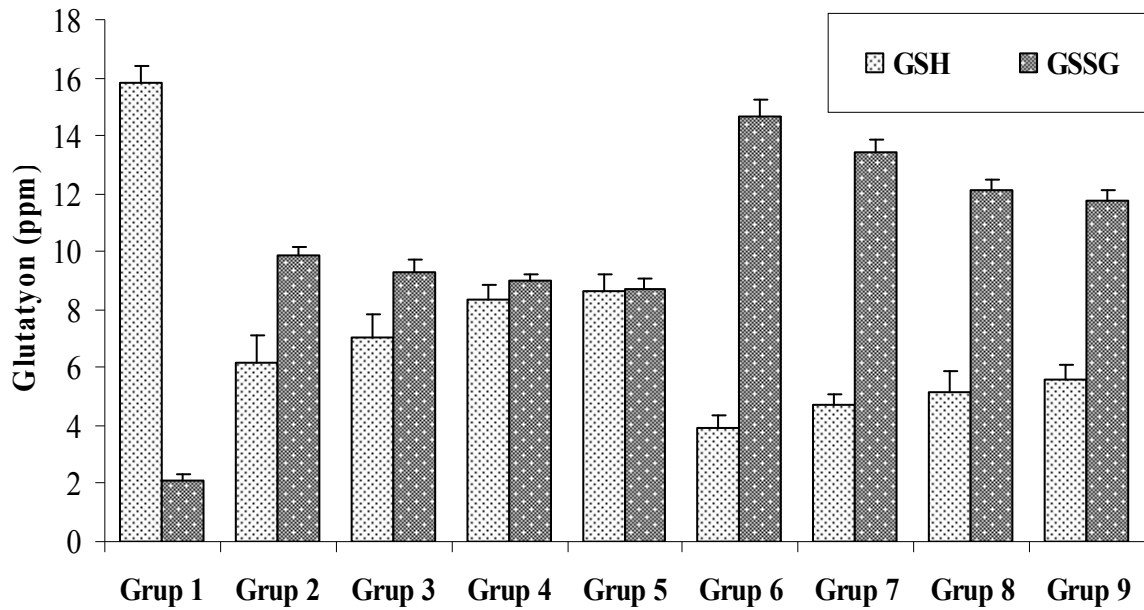
Şekil 3.10. Maya örneklerindeki MDA miktarları

3.11. Maya Örneklerindeki Glutasyon (GSH-GSSG) Miktarları

Dokuz gruba ayrılan maya örneklerinin Redükte Glutasyon (GSH), Okside Glutasyon (GSSG) miktarları ile GSH/GSSG oranları aşağıdaki tablolarda 12. saat, 24. saat ve 36. saat şeklinde verilmiştir.

Tablo 3.11. 12. Saatteki maya örneklerinin Glutasyon (GSH-GSSG) miktarları ile GSH/GSSG oranları

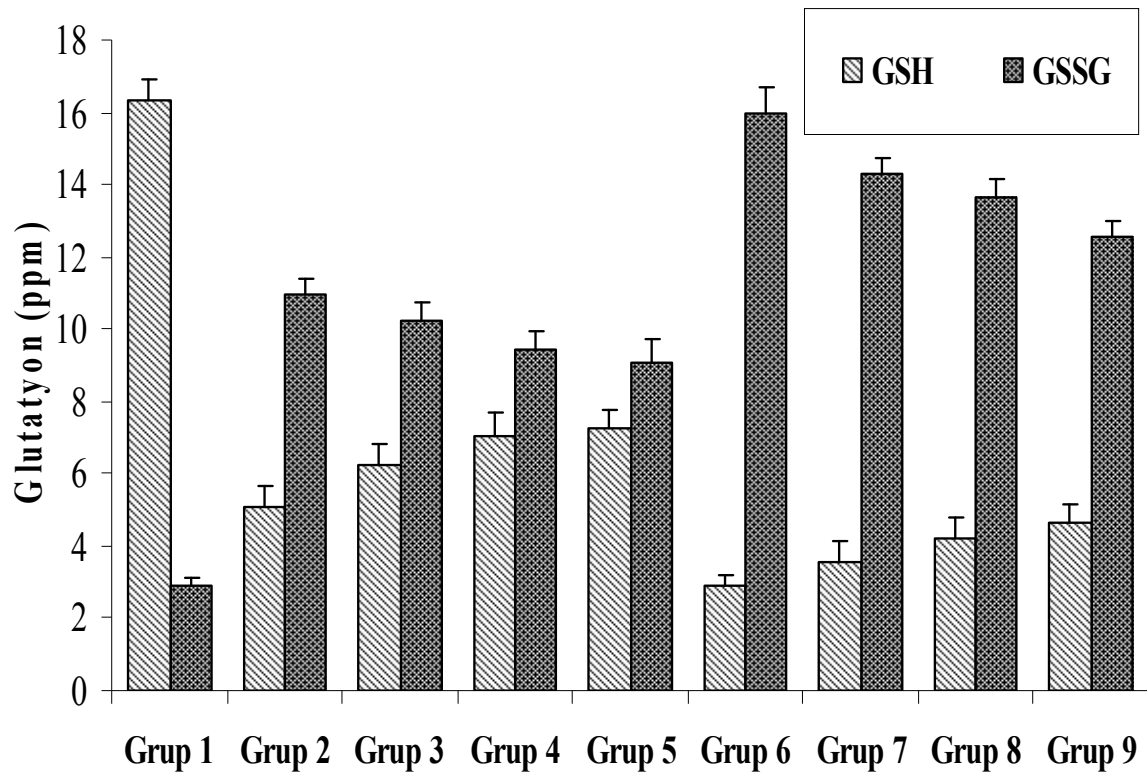
Gruplar / Zaman	12. saat (ppm)		12.saat (ppm)
	GSH	GSSG	GSH/GSSG
Grup 1 (Kontrol grubu)	15,84±0,57	2,12±0,21	7,48
Grup 2 (10 ppm krom)	6,18±0,91	9,85±0,32	0,63
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	7,05±0,78	9,29±0,44	0,76
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	8,36±0,49	8,99±0,20	0,93
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	8,62±0,61	8,69±0,40	0,99
Grup 6 (40 ppm krom)	3,90±0,45	14,66±0,57	0,27
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	4,71±0,37	13,44±0,41	0,35
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	5,14±0,72	12,09±0,43	0,43
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	5,58±0,52	11,73±0,43	0,48
p	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	2,3>6,7 p<0,05



Şekil 3.11. 12. saatteki maya örneklerinin GSH ve GSSG değerleri

Tablo 3.12. 24. Saatteki maya örneklerinin Glutasyon (GSH-GSSG) miktarları ile GSH/GSSG oranları

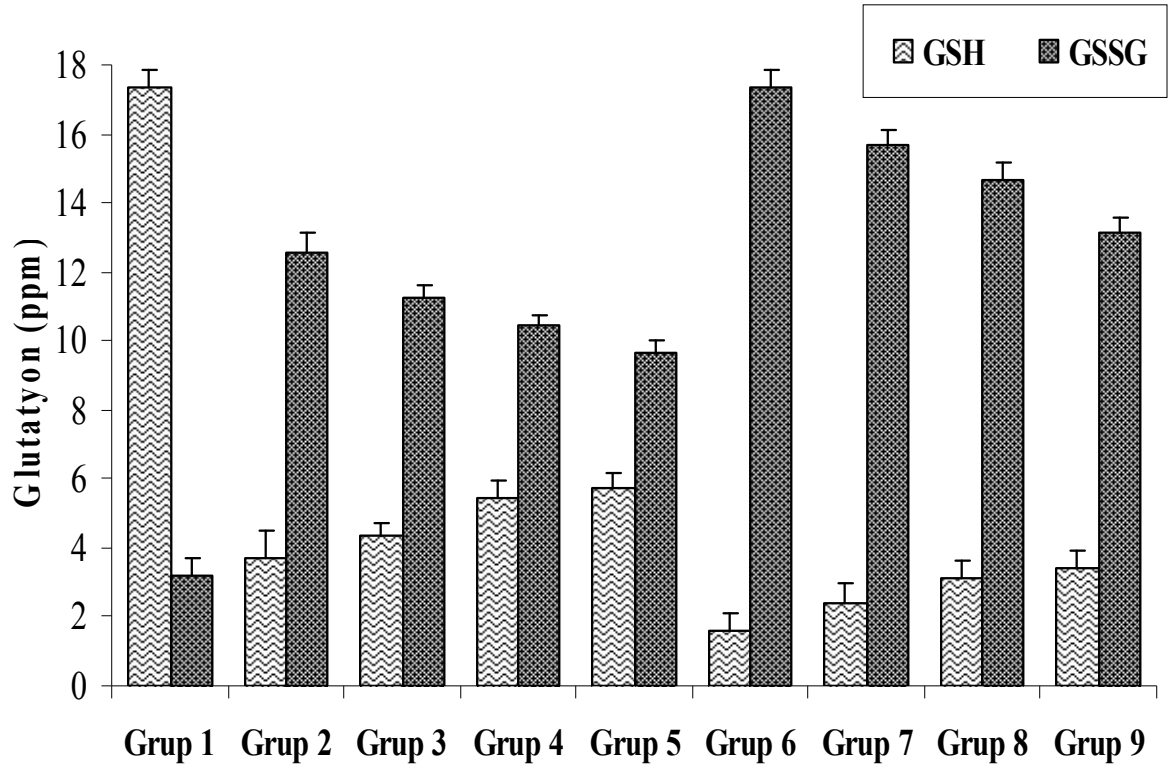
Gruplar / Zaman	24. saat (ppm)		24. saat (ppm)
	GSH	GSSG	GSH/GSSG
Grup 1 (Kontrol grubu)	16,36±0,58	2,89±0,23	5,65
Grup 2 (10 ppm krom)	5,08±0,56	10,93±0,50	0,47
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	6,26±0,55	10,23±0,54	0,61
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	7,04±0,66	9,44±0,49	0,75
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	7,29±0,45	9,05±0,65	0,81
Grup 6 (40 ppm krom)	2,89±0,32	15,93±0,76	0,18
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	3,59±0,52	14,27±0,46	0,25
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	4,22±0,59	13,67±0,50	0,31
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	4,62±0,55	12,58±0,45	0,38
p	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	2,3>6,7 p<0,05



Şekil 3.12. 24. saatteki maya örneklerinin GSH ve GSSG değerleri

Tablo 3.13. 36. Saatteki maya örneklerinin Glutasyon (GSH-GSSG) miktarları ile GSH/GSSG oranları

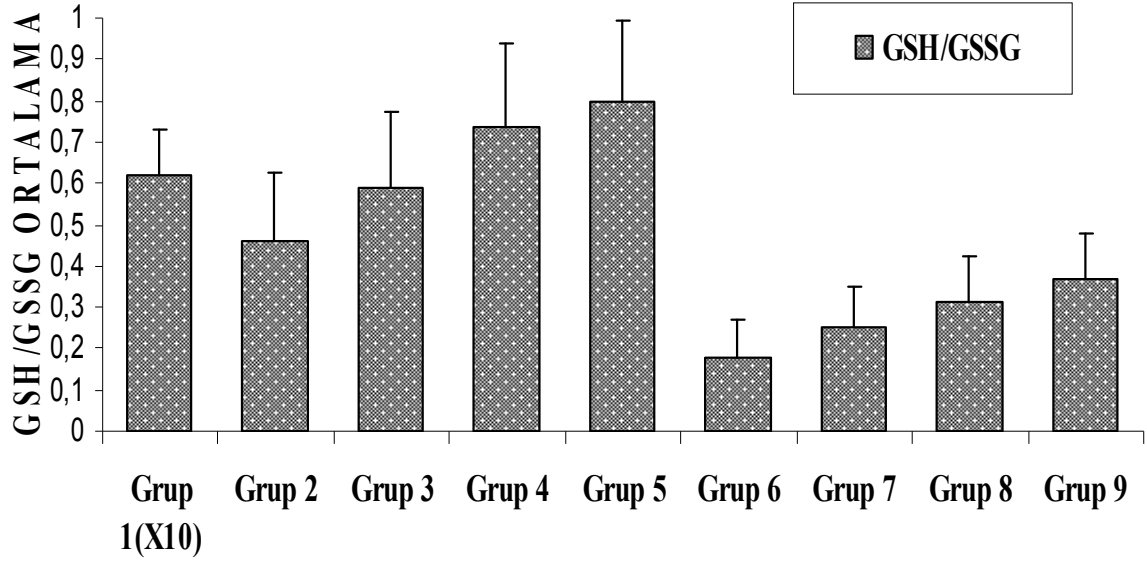
Gruplar / Zaman	36. saat (ppm)		36. saat (ppm)
	GSH	GSSG	GSH/GSSG
Grup 1 (Kontrol grubu)	17,34±0,55	3,18±0,49	5,45
Grup 2 (10 ppm krom)	3,72±0,82	12,58±0,59	0,30
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	4,37±0,38	11,29±0,33	0,39
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	5,48±0,49	10,44±0,33	0,53
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	5,72±0,45	9,62±0,41	0,60
Grup 6 (40 ppm krom)	1,60±0,48	17,33±0,55	0,09
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	2,39±0,62	15,65±0,47	0,15
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	3,09±0,55	14,68±0,46	0,21
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	3,42±0,48	13,15±0,45	0,26
p	1>2,5>6,9 p>0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	2,3>6,7 p>0,05



Şekil 3.13. 36. saatteki maya örneklerinin GSH ve GSSG değerleri

Tablo 3.14. Maya örneklerindeki GSH/GSSG oranının ortalama sonuçları

Gruplar	GSH/GSSG
Grup 1 x(10)	0,62±0,11
Grup 2	0,46±0,17
Grup 3	0,59±0,19
Grup 4	0,73±0,20
Grup 5	0,80±0,20
Grup 6	0,18±0,09
Grup 7	0,25±0,10
Grup 8	0,32±0,11
Grup 9	0,37±0,13
p	2,3>6,7 p<0,05



Şekil 3.14. 12, 24 ve 36. saatteki maya örneklerindeki GSH / GSSG oranının ortalama değerleri

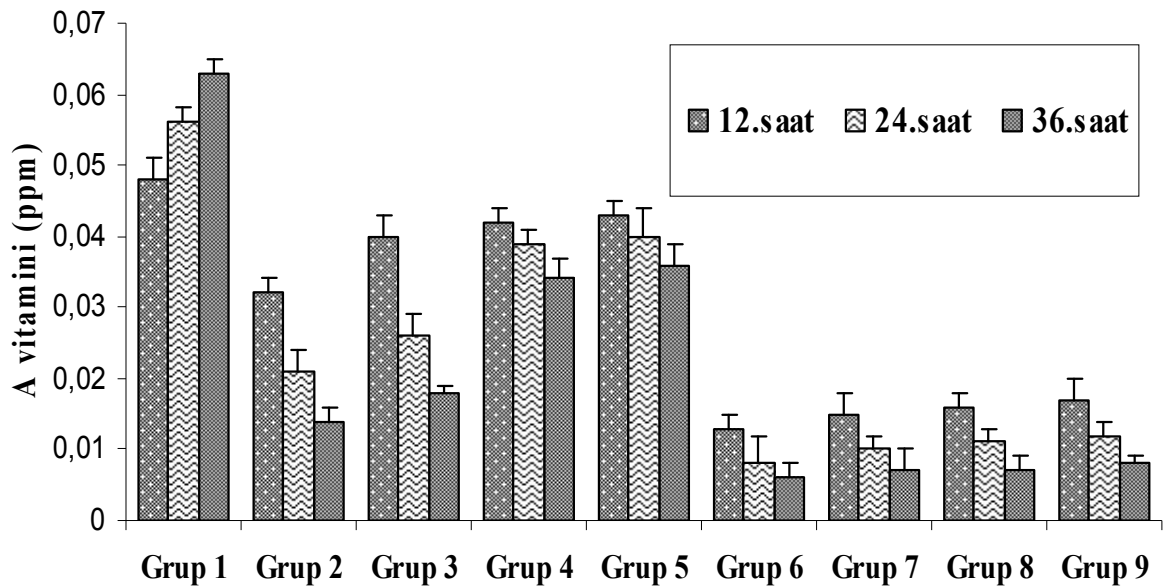
3.12. Maya Örneklerindeki A ve E Vitamini Değerleri

3.12.1. A Vitamini Değerleri

Zamana göre maya örneklerindeki A vitamini miktarları Tablo 3.15’de ve Şekil 3.15’de gösterilmiştir.

Tablo 3.15. Maya örneklerindeki A vitamini miktarları

Gruplar / Zaman	12. saat (ppm)	24. saat (ppm)	36. saat (ppm)	p
Grup 1 (Kontrol grubu)	0,048±0,003	0,056±0,002	0,063±0,002	c>b>a p>0,05
Grup 2 (10 ppm krom)	0,032±0,002	0,021±0,003	0,014±0,002	a>b>c p<0,05
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	0,040±0,003	0,026±0,003	0,018±0,001	a>b>c p>0,05
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	0,042±0,002	0,039±0,002	0,034±0,003	a>b>c p<0,05
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	0,043±0,002	0,040±0,004	0,036±0,003	a>b>c p<0,05
Grup 6 (40 ppm krom)	0,013±0,002	0,008±0,004	0,006±0,002	a>b>c p<0,005
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	0,015±0,003	0,010±0,002	0,007±0,003	a>b>c p<0,005
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	0,016±0,002	0,011±0,002	0,007±0,002	a>b>c p<0,005
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	0,017±0,003	0,012±0,002	0,008±0,001	a>b>c p<0,005
p	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p>0,05	



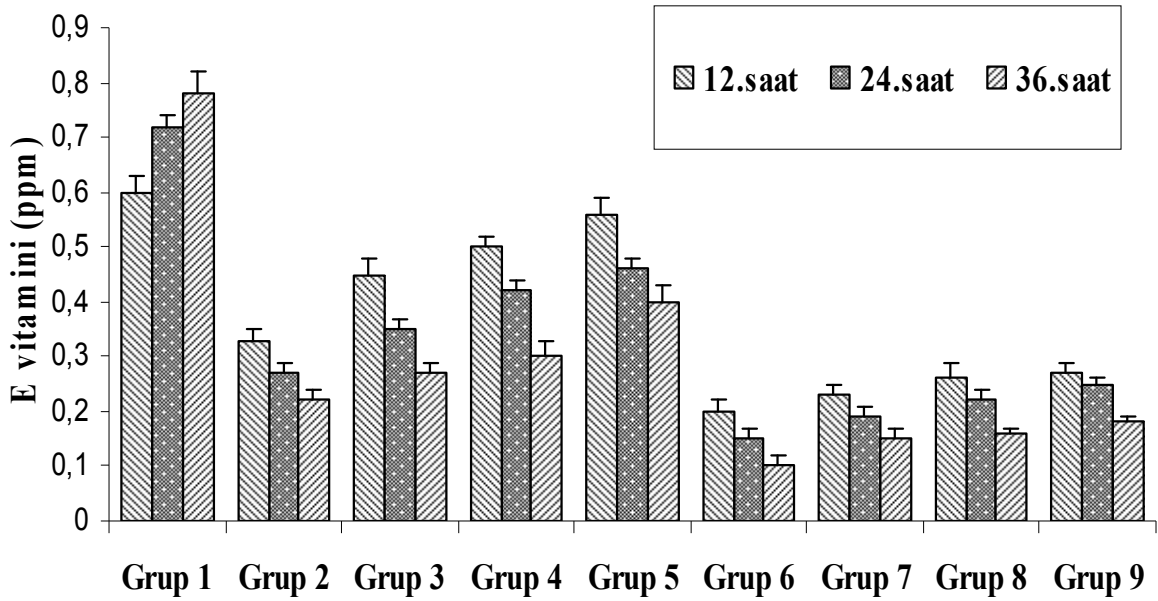
Şekil 3.15. Maya örneklerindeki A vitamini miktarları

3.12.2. E Vitamini Değerleri

Zamana bağlı olarak maya örneklerindeki E vitamini miktarları aşağıdaki Tablo 3.16 ile Şekil 3.16’da belirtilmiştir.

Tablo 3.16. Maya örneklerindeki E vitamini miktarları

Gruplar / Zaman	12. saat (ppm)	24. saat (ppm)	36. saat (ppm)	p
Grup 1 (Kontrol grubu)	0,60±0,03	0,72±0,02	0,78±0,04	c>b>a p<0,05
Grup 2 (10 ppm krom)	0,33±0,02	0,27±0,02	0,22±0,02	a>b>c p<0,05
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	0,45±0,03	0,35±0,02	0,27±0,02	a>b>c p<0,05
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	0,50±0,02	0,42±0,02	0,30±0,03	a>b>c p<0,05
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	0,56±0,03	0,46±0,02	0,40±0,03	a>b>c p<0,05
Grup 6 (40 ppm krom)	0,20±0,02	0,15±0,02	0,10±0,02	a>b>c p>0,05
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	0,23±0,02	0,19±0,02	0,15±0,02	a>b>c p<0,05
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	0,26±0,03	0,22±0,01	0,16±0,01	a>b>c p<0,05
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	0,27±0,02	0,25±0,02	0,18±0,01	a>b>c p<0,05
p	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p>0,05	



Şekil 3.16. Maya örneklerindeki E vitamini miktarları

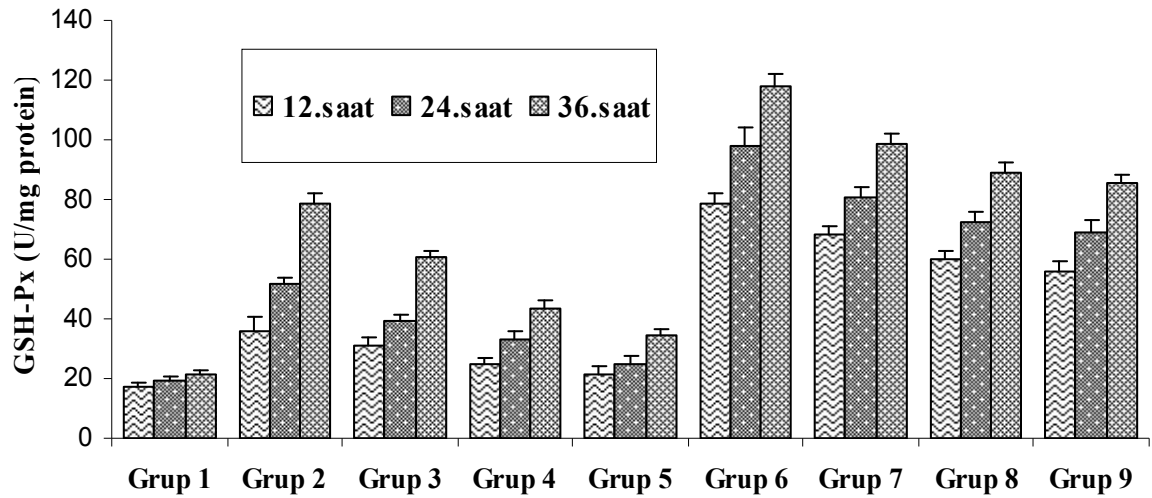
3.13. Maya Örneklerindeki Antioksidan Enzimlerin Aktivite Değerleri

Çalışmalarımızda maya örneklerimizdeki antioksidan enzimlerden Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) enzimi, Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd) enzimi ile Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi aktivite değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar ise aşağıdaki Tablo 3.17, Tablo 3.18, Tablo 3.19 ile Şekil 3.17, Şekil 3.18 ve Şekil 3.19’da verilmiştir.

3.13.1. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzimi Aktivite Değerleri

Tablo 3.17. Maya örneklerindeki Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) enzimi aktivite değerleri

Gruplar / Zaman	12. saat (U/mg protein)	24. saat (U/mg protein)	36. saat (U/mg protein)	p
Grup 1 (Kontrol grubu)	16,97±1,35	19,02±1,46	21,51±1,15	c>b>a p<0,005
Grup 2 (10 ppm krom)	36,05±4,89	51,55±2,13	78,43±3,83	c>b>a p<0,05
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	31,02±2,44	39,25±2,19	60,47±2,18	c>b>a p<0,05
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	24,85±2,28	32,83±3,25	43,45±3,02	c>b>a p<0,05
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	21,20±2,64	25,10±2,60	34,73±2,04	c>b>a p<0,05
Grup 6 (40 ppm krom)	78,94±3,06	98,11±5,72	117,90±4,45	c>b>a p<0,05
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	68,06±2,67	80,65±3,16	98,55±3,25	c>b>a p<0,05
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	59,69±3,25	72,14±3,58	89,12±2,99	c>b>a p<0,05
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	56,14±3,51	69,15±3,81	85,59±2,89	c>b>a p<0,05
p	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	1>2,5>6,9 p<0,05	

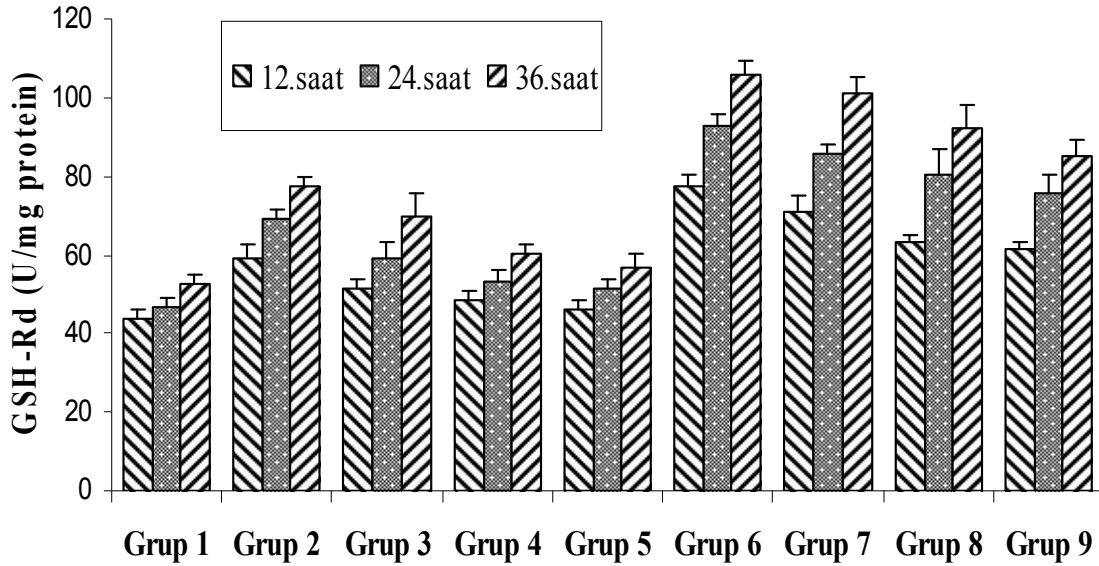


Şekil 3.17. Maya örneklerindeki GSH-Px enzimi aktivite değerleri

3.13.2. Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd) Enzimi Aktivite Değerleri

Tablo 3.18. Maya örneklerindeki Glutasyon Redüktaz (GSH-Rd) enzimi aktivite değerleri

Gruplar / Zaman	12.saat (U/mg protein)	24. saat (U/mg protein)	36. saat (U/mg protein)	p
Grup 1 (Kontrol grubu)	43,54±2,40	46,77±2,19	56,62±2,49	c>b>a p<0,005
Grup 2 (10 ppm krom)	59,00±3,50	69,20±2,28	77,42±2,51	c>b>a p<0,05
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	51,63±2,28	59,09±4,30	69,72±5,99	c>b>a p<0,05
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	48,60±2,13	52,99±3,01	60,59±2,19	c>b>a p<0,005
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	45,84±2,37	51,20±2,55	56,63±3,57	c>b>a p<0,005
Grup 6 (40 ppm krom)	77,66±2,62	93,06±2,87	105,86± 3,54	c>b>a p<0,05
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	70,82±4,19	85,79±2,45	101,27±4,15	c>b>a p<0,05
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	63,02±2,14	80,24±6,37	92,37±5,53	c>b>a p<0,05
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	61,24±2,14	75,84±4,47	84,95±4,48	c>b>a p<0,05
p	1>2,5>6,9 p<0,005	1>2,5>6,9 p<0,005	1>2,5>6,9 p<0,005	

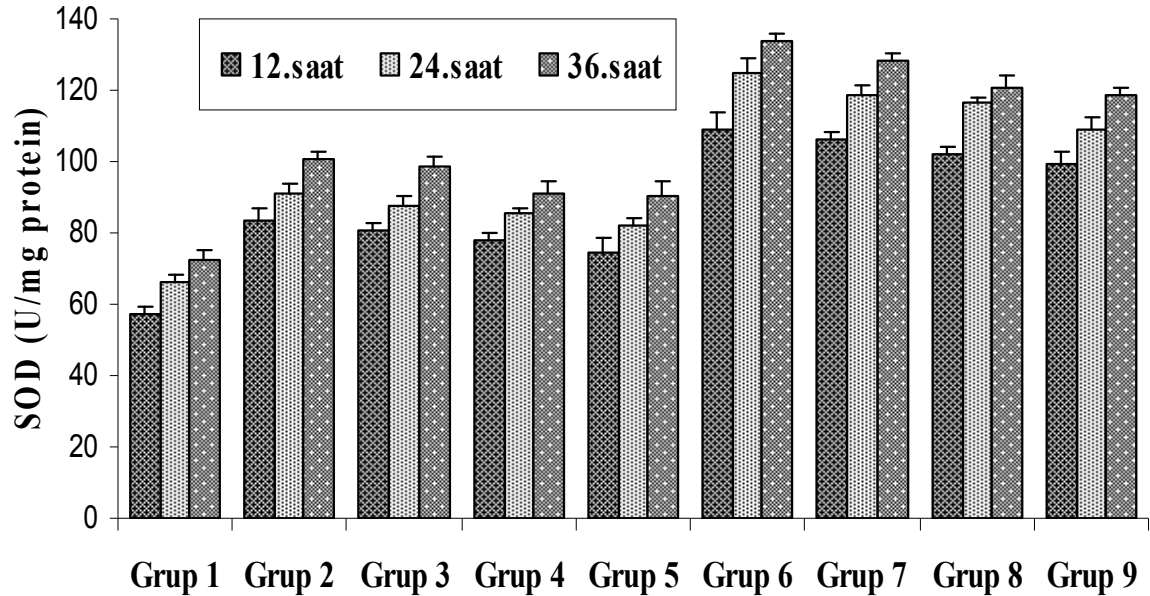


Şekil 3.18. Maya örneklerindeki GSH-Rd enzimi aktivite değerleri

3.13.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzimi Aktivite Değerleri

Tablo 3.19. Maya örneklerindeki Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi aktivite değerleri

Gruplar / Zaman	12.saat (U/mg protein)	24. saat (U/mg protein)	36. saat (U/mg protein)	p
Grup 1 (Kontrol grubu)	57,46±2,03	66,17±2,26	72,70±2,63	c>b>a p<0,005
Grup 2 (10 ppm krom)	83,17±3,57	91,18±2,30	100,35±2,22	c>b>a p<0,005
Grup 3 (10 ppm krom+10 ppm Cvit)	80,72±2,30	87,61±2,89	98,50±2,95	c>b>a p<0,005
Grup 4 (10 ppm krom+15 ppm Cvit)	77,66±2,31	85,30±1,76	91,03±3,12	c>b>a p<0,005
Grup 5 (10 ppm krom+20 ppm Cvit)	74,39±3,94	82,29±1,81	90,43±3,95	c>b>a p<0,005
Grup 6 (40 ppm krom)	109,20±4,45	124,97±3,97	133,57±2,45	c>b>a p<0,005
Grup 7 (40 ppm krom+10 ppm Cvit)	106,09±2,13	118,81±2,80	128,15±2,46	c>b>a p<0,005
Grup 8 (40 ppm krom+15 ppm Cvit)	102,23±1,63	116,38±1,37	120,87±3,28	c>b>a p<0,005
Grup 9 (40 ppm krom+20 ppm Cvit)	99,34±3,76	109,25±3,06	118,91±2,06	c>b>a p<0,005
p	1>2,5>6,9 p<0,005	1>2,5>6,9 p<0,005	1>2,5>6,9 p<0,005	



Şekil 3.19. Maya örneklerindeki SOD enzimi aktivite değerleri

4. TARTIŞMA

Aerob ve çoğu anaerob mikroorganizmalar için metaller, temel minerallerdir. Özellikle krom; protein, yağ ve karbonhidrat metabolizması için gerekli mikro besindir [135]. Krom eksikliği tip-2 diyabet ve kardiyovasküler gibi birçok hastalığa yol açar [136]. Bazı metaller suda düşük konsantrasyonlarda olsalar bile insanlarda bazı hastalıklara, hatta ölümlere neden olurlar. Eser miktarda bile tehlikeli olabilen toksik ağır metaller Cu, Cr, Pb, Ag, Mn, Hg, Zn gibi elementlerdir [137]. Metalleri insan vücudu işleyemediği için metaller çeşitli organlarda birikmektedir [138]. Krom canlılar için gerekli eser elementlerden biri olup, fazla miktarlarda alındığında toksik olabilir ayrıca krom (VI), krom (III)'e göre daha toksiktir [139, 140]. Kromdan etkilenen diğer bir canlı grubu mikroorganizmalardır. Bu canlılar, enzimatik detoksifikasyon veya düşük hücre içi konsantrasyonları korumakla, hücre içinde metal-bağlayıcı polimerleri sentezlemesiyle, metalleri hücre yüzeyine bağlamayla ya da hücre yüzeyindeki çözünmez metal komplekslerinin presipitasyonunu içeren mekanizmalarla toksik ağır metal stresini tolere edebilmektedirler [141].

Bu çalışmada, mikroorganizma (*Saccharomyces cerevisiae*) üreme ortamlarına 10 ve 40 ppm gibi farklı dozlarda Cr^{+3} çözeltisinden eklendi. Ayrıca bu üreme ortamlarına antioksidan bir vitamin olan C vitamininden 10, 15 ve 20 ppm olmak üzere üç farklı dozda ilave edildi. Maya mikroorganizmasının 12. saat, 24. saat ve 36. saatteki hücre sayıları (cfu/mL), A, E ve C vitamin düzeyleri, Glutasyon (GSH, GSSG), Malondialdehit (MDA) miktarları belirlendi. Ayrıca GSH-Px (Glutasyon Peroksidaz), GSH-Rd (Glutasyon Redüktaz), SOD (Süperoksit Dismutaz) enzim aktivite değerleri ile maya (*Saccharomyces cerevisiae*) total protein miktarları belirlendi.

Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'ya kromun etkisini araştırmak amacıyla spektrofotometre ile yapılan çalışmalardaki dalgaboyu taramasında 600 nm'de maksimum absorbens yaptığı tespit edildi (Tablo 3.1 ve Şekil 3.1). Tespit edilen bu dalga boyunun literatürlerle uyumlu olduğu görüldü [142-144].

Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'nın üreme süresini belirlemek için 0. saat ile 54. saatler arasında 600 nm'de absorbens ölçümleri yapılarak tanecik sayıları (cfu/mL) belirlenmiştir (Tablo 3.2 ve Şekil 3.2). Tüm bu sonuçlardan, mayanın 48. saattaki absorbens ve tanecik sayısının maksimum düzeye ulaştığı ondan sonraki saatlerde ise azalmaya başladığı gözlenmiştir. Bütün çalışmalarımız maya mikroorganizmasının üstel

fazındaki üremesi esnasında alınan kültürlerle yapılmıştır. Canlı hücre sayısının maksimum seviyede olduğu bu evrede, krom-maya etkileşiminin araştırılması amaçlanmıştır.

Metal-mikroorganizma (biyosorpsiyon) prosesinde pH en önemli faktördür. Solüsyon kimyasına, biyokütledeki fonksiyonel grupların aktivitesine, yüzey yüküne ve metalik iyonların rekabetine etki eder [145-150]. Mayaya pH etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneylerde pH'ın biyosorpsiyonda çok önemli bir etken olduğu anlaşılmıştır. Düşük pH değerine sahip çözeltilerde ortamda bulunan yüksek orandaki protonlar ile metal iyonları biyosorbent üzerindeki etkin gruplara bağlanmak için yarışmakta ve bu da hücre-metal arasındaki etkileşimi azaltmaktadır. Ancak çözeltinin pH değeri arttıkça protonların azalması ile metal iyonları biyosorbent üzerindeki etkin gruplara daha fazla bağlanmaktadır. Ortamın pH değeri giderek artarsa ortamdaki OH⁻ iyon konsantrasyonu da artmakta ve dolayısıyla metal iyonları çökmektedir [84]. Başta başlangıç kültürü olmak üzere 3-7 arasında değişik pH'larda maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'nın 12. saat, 24. saat ve 36. saattaki tanecik sayıları (cfu/mL) incelenmiştir. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ile Cr (III) iyonları arasındaki toksik etkileşimin pH 3.0 ve 4.0'te olduğu ancak pH değeri arttıkça mayanın kromun toksik etkisinden etkilenmediği gözlenmiştir. Bunun nedeninin yüksek pH değerlerinde Cr (III) iyonlarının Cr(OH)₃ şeklinde çökmesinden kaynaklanabileceğini söyleyebiliriz. Böylece ortamdaki krom konsantrasyonu azaldığı için kromun toksik etkisi de azalmıştır. Bu yüzden pH 3.0 ve 4.0 değerlerinde mikroorganizma sayısı zamana bağlı olarak azalırken (p<0,05), pH 5.0, 6.0 ve 7.0 değerlerinde mikroorganizma sayısı zamana bağlı olarak artmıştır (p<0,005) (Tablo 3.3 ve Şekil 3.3).

10 ve 40 ppm krom dozu uygulanan bu çalışmada, pH 3.0'de mikroorganizma sayısının zamana bağlı olarak daha fazla azaldığı ve bazı parametrelerin (A ve E vitaminlerinin) ölçümlerinin yapılabilmesi için bu çalışmada optimum pH değeri 4.0 olarak belirlenmiştir.

Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'ya farklı dozlarda (10-50 ppm arasında) uygulanan Cr⁺³'ün mayaların 12, 24 ve 36. saatlardaki üreme yani tanecik sayılarının (cfu/mL) değişimleri Tablo 3.4 ve Şekil 3.4'de görülmektedir. Tablo ve Şekilden de görüleceği üzere üç farklı sürede de 50 ppm Cr⁺³'ün lethal doz olduğu görülmektedir. Cr⁺³'ün mayada ki net etkisini belirlemek için 10 ppm ve 40 ppm olmak üzere iki farklı Cr⁺³ dozu seçilmiştir. Bundan sonraki tüm çalışmalarda bu iki Cr⁺³ dozu kullanılmıştır.

İki farklı dozda krom (10 ve 40 ppm olmak üzere) uygulanan maya (*Saccharomyces cerevisiae*) örneklerinin zamana bağlı olarak tanecik sayılarına üç farklı dozda (10, 15 ve

20 ppm olmak üzere) C vitamini çözeltisinin katılmasının etkileri Tablo 3.5-6 ve Şekil 3.5-6'de görülmektedir. Dokuz farklı gruba ayrılmış maya örneklerinin 12, 24 ve 36. saatteki tanecik sayıları (cfu/mL) incelendiğinde, kontrol grubuna göre kromun iki farklı dozunun (10 ve 40 ppm) uygulandığı maya örneklerinin tanecik sayılarında azalmalar ($p<0,005$) olmuştur. Fakat ortama farklı dozlarda C vitamini eklenmesiyle doza bağlı olarak tanecik sayısının da arttığı ($p<0,005$) belirlenmiştir. Ayrıca kontrol grubunda zamana bağlı olarak maya üretiminde artış ($p<0,005$) gözlenmiş iken, diğer gruplarda zamana bağlı olarak azalmaların ($p<0,05$) olduğu tespit edilmiştir.

H₂O₂ ile stres oluşturulmuş *Schizosaccharomyces Pombe* mayasında yapılan araştırmada *S. pombe* hücrelerinde canlılık oranlarının, H₂O₂ derişimi ters orantılı olduğu rapor edilmiştir [151]. Yine H₂O₂ ile stres oluşturulmuş *S. pombe* kültürlerinde bazı guruplara E vitamini analogu olan Trolox verilmiş, kültürlerin canlı hücre sayılarında trolox verilenlerin canlı hücre sayısının fazla olduğu bildirilmiştir. Trolox'un H₂O₂ stresini önlediği belirtilmiştir [152]. Bulgularımızın literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

Dokuz farklı gruba ayrılmış maya kültürlerinde tanecik sayısının belirlenmesine ilaveten kültürlerin total protein analizleri de yapılmış sonuçları ise Tablo 3.8 ve Şekil 3.8'de gösterilmiştir. İki farklı dozda krom (10 ve 40 ppm olmak üzere) uygulanan maya (*Saccharomyces cerevisiae*) örneklerine 10, 15 ve 20 ppm olmak üzere üç farklı dozda C vitamini eklenmiştir. Bu kültürlerin total protein miktarları karşılaştırıldığında; kontrol grubunda zamana bağlı olarak protein miktarlarında artış ($p<0,005$) gözlenirken, diğer gruplarda zamana bağlı olarak azalmalar ($p<0,05$) saptanmıştır. Ayrıca kromun her iki dozunda da ortama katılan C vitamininin miktarına bağlı olarak protein miktarlarında da artışların olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, *S. cerevisiae*'de oksidatif stresin spesifik olarak protein hasarına neden olduğu bildirilmiştir [153]. Diğer bir maya türü olan *Schizosaccharomyces Pombe*'de H₂O₂ ile stres oluşturulmuş gruplar ile kontrol grubunun total protein değerleri karşılaştırılmış ve stres oluşturulan grupların total protein değerlerinin kontrol grubuna göre azaldığı saptanmıştır [151]. *Schizosaccharomyces Pombe*'de yapılan diğer bir çalışmada, H₂O₂ ile stres oluşturulmuş grupların bazılarına Trolox eklenmiş ve total protein değerleri karşılaştırılmıştır. Trolox verilen gruplarda total protein değerlerinin kontrol grubuna göre daha az düştüğü bildirilmiştir [152]. Ayrıca mikroorganizma

üremesinin çok olduğu (tanecik sayısı) kültürlerde, protein miktarının fazla olduğu rapor edilmektedir [154]. Bu literatürlerle bulgularımızın uyum içinde olduğu görülmektedir.

İnsan plazmasında ve hücre zarında bulunup, zarı geçebilen antioksidanlardan biri askorbik asittir. Düşük moleküler ağırlıklı, suda çözünen bu antioksidan hücrelerin redoks durumunun devamı ve kollojen sentezi için gereklidir. Peroksitler ve süperoksit gibi reaktif oksijen türlerini indirger. Antioksidan olarak esas görevi lipit hidroperoksitlerin oluşumunu engellemektir [155]. Ayrıca C vitamini iyi bir singlet oksijen temizleyicisidir ve serbest radikalleri süpürücü etkisiyle ortadan kaldırır [156, 157]. CrO₃ verilen farelerin dokularındaki askorbik asit miktarlarının kontrol grubuna göre düşük olduğu bildirilmiştir [158].

Besi ortamlarına iki farklı dozda krom (10 ve 40 ppm) uygulanan maya (*Saccharomyces cerevisiae*) kültürlerinin ortamına, üç farklı dozda C vitamini (10, 15 ve 20 ppm olmak üzere) katılmasıyla, zamana bağlı olarak mayaların C vitamini miktarlarındaki değişim Tablo 3.9 ve Şekil 3.9'da gösterilmiştir. Kontrol grubunda zamana bağlı olarak C vitamini miktarlarında artış ($p<0,005$) gözlenirken, diğer tüm grupların zamana bağlı olarak C vitamini miktarlarında azalmalar ($p<0,05$) gözlenmiştir. Aynı zaman aralığında kromun dozuna bağlı olarak C vitamini miktarlarında azalma ($p>0,05$) gözlenmiş fakat ortama katılan C vitamininin dozuna paralel olarak aynı süreler içerisinde gruplar arasında C vitamini miktarlarında artışların ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir. Burada ortama katılan C vitamininin antioksidan etkisinden dolayı, antioksidan sistemlerin etkilenme dereceleri de azalmıştır. Ayrıca ortama C vitamini katılması ve Maya (*S. cerevisiae*)'ların C vitamini sentezleme yeteneklerinin olmasından dolayı [89], mayalardaki C vitamini artışının olması beklenen bir sonuçtur. Artan krom dozuna karşılık C vitamini miktarlarındaki azalma ise; kromun oluşturduğu serbest radikallerin C vitamini ile zararsız hale getirilirken, bir kısım C vitamininin harcanmış olabileceği ile açıklanabilir.

Kromun en önemli özelliklerinden biri, değerlik değiştirip yok olmamasıdır. Bu yüzden kromun serbest radikal uyarımı ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır [159-161]. Balık dokularında ve kanında yapılan araştırmalar, krom iyonlarının oksidatif strese yol açtığını göstermektedir [162, 163].

Stres sonucu oluşan serbest radikaller membranların yapısında bulunan doymamış yağ asitlerine etki ederek, lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Oluşan lipit peroksitler hızlıca parçalanarak, MDA (Malondialdehit) adı verilen reaktif karbon bileşiklerini

oluşturmaktadırlar [26, 164]. Vücuttaki serbest radikal oluşumunu arttıran maddelerin, vitamin seviyelerini düşürdüğü, bunun aksine lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesini arttırdığı literatür çalışmalarında açıklanmıştır [165]. *S.cerevisiae*'nın yabani ırklarına 2,0 mM ve 4,0 mM H₂O₂ uygulanmış ve lipid peroksidasyon düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu bildirilmiştir [166].

İki farklı dozda krom uygulanan Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) kültürlerine üç farklı dozda C vitamini çözeltilerinin katılmasıyla, zamana bağlı olarak mayaların MDA miktarlarına etkileri Tablo 3.10 ve Şekil 3.10'da görülmektedir. Kontrol grubunda zamana bağlı olarak MDA miktarlarında artış ($p<0.005$) gözlenmiş iken, diğer tüm grupların zamana bağlı olarak MDA miktarlarında da artışların ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Aynı zaman aralığında kromun dozuna bağlı olarak MDA miktarlarında artmalar ($p<0.05$), ortama katılan C vitaminin dozuna paralel olarak da aynı süreler içerisinde gruplar arasında MDA miktarlarında azalmaların ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu maya örneğinde zamana bağlı olarak MDA miktarlarında artışın olması, maya hücrelerinin çoğalması sırasındaki stresten kaynaklanmış olabilir. Kromun artan dozuna bağlı olarak MDA miktarlarındaki artma, kromun oksidatif stres oluşturarak serbest radikal artışına sebep olmasıyla açıklanır iken, artan C vitamini dozuna bağlı olarak MDA miktarlarındaki azalmalar ise, C vitaminin serbest radikal oluşumunu önlemesi ile açıklanabilir.

İki farklı dozda krom uygulanan maya (*Saccharomyces cerevisiae*) kültürlerine, üç farklı dozda (10, 15 ve 20 ppm) C vitamini çözeltisinin katılmasının zamana bağlı olarak mayaların GSH ve GSSG miktarları ile GSH/GSSG oranlarına etkileri Tablo 3.11 ve Şekil 3.11, Tablo 3.12 ve Şekil 3.12, Tablo 3.13 ve Şekil 3.13'de görülmektedir.

Onikinci saatte kontrol grubuna göre diğer gruplarda GSH miktarlarında azalma ($p<0,05$), GSSG miktarlarında ise artma ($p<0,05$) olduğu görülmektedir. Kromun doz artışına bağlı olarak GSH miktarlarında azalma ($p<0,05$), GSSG miktarlarında ise artış ($p<0,05$) olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde ortama artan dozlarda C vitamini ilavesi durumunda GSH miktarlarında artış ($p<0,05$), GSSG miktarlarında ise azalma ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir. GSH/GSSG oranı ise kontrol grubunda yüksek iken diğer gruplarda oldukça düşük değerde olduğu ($p<0,05$), krom dozunun bu oranı düşürdüğü, artan C vitamini dozunun ise bu oranı kısmen artırdığı belirlenmiştir (Tablo 3.11 ve Şekil 3.11).

Zamana bağlı olarak 12 ve 24. saatteki sonuçlar birbirini desteklemektedir. Kontrol grubuna göre diğer gruplarda GSH miktarlarında azalma ($p<0,05$), GSSG miktarlarında ise

artma ($p<0,05$) olduğu görülmektedir. Kromun doz artışına bağlı olarak GSH miktarlarında azalma ($p<0,05$), GSSG miktarlarında ise artış ($p<0,05$) olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde ortama artan dozlarda C vitamini ilavesi durumunda GSH miktarlarında artış ($p<0,05$), GSSG miktarlarında ise azalma ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir. GSH/GSSG oranının ise; kontrol grubunda yüksek iken diğer gruplarda oldukça düşük ($p<0,05$) olduğu, krom dozunun bu oranı düşürdüğü, artan C vitamini dozunun ise bu oranı kısmen artırdığı belirlenmiştir (Tablo 3.12 ve Şekil 3.12). 12.saat ile 24. saatteki GSH ve GSSG miktarları karşılaştırıldığında, zamanla kültürlerdeki GSH miktarlarının azaldığı, GSSG miktarlarının ise artmaya devam ettiği gözlenmiştir.

36. saatte ise; tıpkı 12. ve 24. saatteki sonuçlar gibi, kontrol grubuna göre diğer gruplarda GSH miktarlarında azalma ($p>0,05$), GSSG miktarlarında ise artma ($p<0,05$) olduğu görülmektedir. Kromun doz artışına bağlı olarak GSH miktarlarında azalma ($p>0,05$), GSSG miktarlarında ise artış ($p<0,05$) olduğu görülmüştür (Tablo 3.13 ve Şekil 3.13).

Bulgularımızın aksine Jamnik [167], NaCl stresine maruz bırakılan maya hücrelerinde yaptıkları araştırmada glutatyon miktarının (GSH) kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir. Bu durum ise maya mikroorganizmasının farklı stres koşullarına karşı verdiği farklı cevap mekanizmalarıyla açıklanabilir.

Mayaların besi ortamlarına artan dozlarda C vitamini ilavesi durumunda ise; GSH miktarlarında artış ($p>0,05$) gözlenirken, GSSG miktarlarında azalma ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir. GSH/GSSG oranının ise; kontrol grubunda yüksek iken diğer gruplarda oldukça düşük değerde olduğu ($p>0,05$), krom dozunun bu oranı düşürdüğü, artan C vitamini dozunun da yine bu oranı kısmen artırdığı belirlenmiştir (Tablo 3.14 ve Şekil 3.14).

S.cerevisiae'de H_2O_2 'in oluşturduğu oksidatif strese karşı cevapta hücre içi glutatyon düzeyinin rolü araştırılmıştır. GSH-I (γ -glutamilsistein sentetaz) inhibisyonu sonucunda H_2O_2 'ye duyarlılığın arttığı ve H_2O_2 'ye karşı oluşturulan uyumluluk cevabının baskılandığı görülmüştür [168]. Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) mikroorganizması oksidatif stres kaynaklı toksik madde olan Akrolein'e maruz bırakılmış ve Akrolein'in maya hücrelerine verdiği zararın glutatyon tarafından azaltıldığı bildirilmiştir [169].

Özellikle *S. cerevisiae*'de glutatyonun, oksidatif strese karşı korumada önemli bir molekül olduğu belirtilmiş ve artan H_2O_2 derişimlerinin Glutatyon (GSH) düzeyini

düşürdüğü gözlenmiştir [170] . Yine *S. cerevisiae* 'ya 4,0 mM konsantrasyonunda H₂O₂ uygulamasıyla GSH düzeyinin azaldığını bildiren benzer bulgular elde edilmiştir [171]. Sonuçlarımızın literatürlerle uyumlu olduğu görülmektedir.

Glutasyonun redoks dengesi, indirgenmiş ve oksitlenmiş düzeylerinin oranına (GSH/GSSG) bağlıdır. Bazal düzeyde GSH/GSSG oranı 100'ün üzerindedir. Ancak oksidatif stres durumlarında bu oran 1-10 arasında değişmektedir [172].

Glutasyon redoks dengesine (GSH/GSSG) bakıldığında, besi ortamlarına krom ilave edilen mayalardaki bu oranın kontrol grubuna göre düşük olduğu görülmüştür. Krom stresine uğramış mayalarda bu oran, zamana bağlı olarak azalmalar şeklinde devam etmiştir. C vitamini eklenen mayalarda bu oranın daha fazla olduğu ve zamana bağlı olarak azalmaların daha yavaş olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.11-13 ve Tablo 3.11-13). Maya numunelerindeki MDA miktarları ile maya GSH/GSSG oranındaki azalma miktarlarından kromun mayada oksidatif strese neden olduğu, oluşan bu stresi kısmen de olsa C vitaminin önlediği ileri sürülebilir.

Morel ve Barauki'e [173] göre, oksidatif strese cevapta GSH miktarlarında azalma ve GSSG miktarlarında artma olabilir. Bulgularımızdaki GSH/GSSG oranı da literatüre uygunluk sağlamaktadır.

Karotenoidlerin, lipid peroksidasyonunda ortaya çıkan radikalleri önleme ve aktif oksijen türlerini durdurma gibi fonksiyonları vardır [48]. A vitamininin antioksidan etkisinin yanında, hücre ve intrasellüler zar dayanıklılığının sağlanması, epitel dokunun bütünlüğünün sürdürülmesi ve glikoprotein sentezi gibi daha birçok görevi vardır [155]. Ayrıca A ve C vitaminleri singlet oksijen temizleyicileri olup, diğer oksijen radikallerine karşı da koruyucu etki yaparlar [156].

İki farklı dozda krom uygulanan Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) kültürlerine üç farklı dozda C vitamini çözeltisinin katılmasıyla, zamana bağlı olarak mayaların A vitamini miktarları Tablo 3.15 ve Şekil 3.15'de görülmektedir. Kontrol grubunda zamana bağlı olarak mayaların A vitamini miktarlarında artmalar ($p>0,05$) gözlenirken, kromun artan dozuna karşılık mayaların A vitamini miktarlarında azalmalar ($p<0,05$) olduğu görülmektedir. Ortama katılan C vitamini doz artışına paralel olarak da, mayaların A vitamini miktarlarında artışların ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir.

Vitamin E radikallerin yok edilmesi, zincirin kırılması, baskılama, bozulan yapıların onarılması gibi mekanizmaların tamamını kullanarak antioksidan görevini yerine getirdiğinden antioksidan kapasitesi çok geniş ve yüksektir [174-178].

İki farklı dozda krom uygulanan maya (*Saccharomyces cerevisiae*) örneklerine üç farklı dozda C vitamini çözeltisinin eklenmesiyle mayaların E vitamini miktarları zamana bağlı olarak Tablo 3.16 ve Şekil 3.16’da görülmektedir. Kontrol grubunda zamana bağlı olarak mayaların E vitamini miktarlarında artmaların ($p<0,05$) olduğu gözlenirken, kromun artan dozuna karşılık mayaların E vitamini miktarlarında azalmaların ($p<0,05$) olduğu gözlenmiştir. Ortama katılan C vitamini doz artışına paralel olarak da, mayaların E vitamini miktarlarında artışların ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir.

H₂O₂ ile stres oluşturulmuş mikroorganizma *S. cerevisiae*’da α -tokoferol’ün koruyucu etkileri araştırılmıştır. Stres oluşturulan grupların hücre sayısının kontrol grubuna göre düşük olduğu ve α -tokoferol ilave edilen grupların tanecik sayısının stres oluşturulan grupların tanecik sayısından fazla olduğu bildirilmiştir [179]. Sonuçlarımızın kendi içerisinde ve literatürle uyumlu oldukları görülmektedir.

Serbest radikallerin yol açtığı oksidatif strese karşı antioksidan vitaminlerin yanı sıra antioksidan enzimler de görev yaparlar. Antioksidan enzimler hücre dengesinin düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahiptirler [180].

Antioksidan enzimlerin başında GSH-Px gelir. Hidrojen peroksidin yüksek konsantrasyonlarının ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinde görev yapar. Karaciğerde yüksek; kalp, akciğer ve beyinde orta; kasta düşük aktivitededir [181]. Ayrıca eritrositlerdeki GSH-Px enziminin görevi, oksidatif strese karşı en etkili antioksidan olarak görev yapmaktır. GSH-Px enzimi aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit miktarının artmasıyla şiddetli hücre hasarına yol açar [5, 182].

İki farklı dozda krom uygulanan Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) örneklerine üç farklı dozda C vitamini çözeltilerinin katılmasıyla, mayaların GSH-Px enzim aktivitesine etkileri Tablo 3.17 ve Şekil 3.17’de görülmektedir. Kontrol grubunda zamana bağlı olarak GSH-Px enzim aktivitesinde artışların olduğu ($p<0,005$) gözlenirken, diğer grupların hepsinde de zamana bağlı olarak enzim aktivitesinde artışlar gözlenmiştir. Ancak bu artışların kontrol grubundan daha fazla olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir. Krom dozunun artışına bağlı olarak gruplarda GSH-Px enzim aktivitesinde artışlar ($p<0,05$) olur iken, artan C vitamini dozuna karşılık enzim aktivitesinde azalmalar ($p<0,05$) olduğu görülmüştür.

Serbest radikal oluşumundaki artış, MDA düzeyi ve GSH-Px enzimi aktivitesinde artmaya, E vitamini düzeyinde ise azalmaya neden olur [183, 184]. Bulgularımızın literatürlerle uyumlu olduğu görülmektedir.

İki farklı dozda krom uygulanan Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) örneklerine üç farklı dozda C vitamini çözeltisinin katılmasıyla zamana bağlı olarak mayaların GSH-Rd enzim aktivite değerleri Tablo 3.18 ve Şekil 3.18’de görülmektedir. Kontrol grubunda zamana bağlı olarak GSH-Rd enzim aktivitesinde artışlar ($p<0,005$) gözlenirken, diğer grupların tümünde de zamana bağlı olarak enzim aktivitelerinde artmaların olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir. Kontrol grubunun dışındaki gruplarda artışların daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kromun doz artışına bağlı olarak, gruplardaki GSH-Rd enzim aktivitelerinde artma ($p<0,005$) olurken, C vitamini doz artışına bağlı olarak GSH-Rd enzim aktivitelerinde azalmaların ($p<0,005$) olduğu belirlenmiştir. GSH-Rd enzimini, GSH-Px enzimi ile birlikte glutasyon redoks döngüsünde hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasını sağlar [185]. Sonuçlarımızda krom stresine maruz bırakılan gruplarda hem GSH-Px, hemde GSH-Rd enzim aktivitelerinde artışların olduğu ($p<0,05$) gözlenmiştir. Ancak ilave edilen C vitamininin dozuna paralel olarak bu iki enzim aktivitesinde azalmaların ($p<0,05$) olduğu gözlenmiştir. GSH-Px ile GSH-Rd enzim aktivitelerindeki artışların ve ortamda bulunan GSH ile GSSG’nin birbirine dönüşümlerinin düzenli bir şekilde devam ettiği bulgularımızda görülmektedir.

Lushchak [186], akvaryum sularına 1 ve 10 mg/L dozunda Cr (III) ilave ederek akvaryum balıklarının beyinlerinde yaptıkları incelemede, kromun dozuna bağlı olarak GSH-Rd enziminin aktivitesinin azaldığını rapor etmişlerdir. Bunun aksine çeşitli dozlarda Dietilditiokarbamat (DDC) maddesine maruz bırakılan *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin GSH-Rd enziminin aktivitesinin doz miktarına bağlı olarak arttığını bildirmişlerdir [187]. Bulgularımız Lushchak’ın [186] aksine, Lushchak’ın [187] maya (*Saccharomyces cerevisiae*)’da yaptıkları çalışmanın sonuçları ile uyumludur.

Süperoksit Dismutaz (SOD) enzimi, molekül ağırlığı 17-85 k DA aralığında olan, süperoksit radikallerinin dismutasyonunu sağlayarak moleküler oksijen ve H_2O_2 ’e katalize eden metalloenzimdir. SOD enzimi oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunur. SOD enzimi, aerobik organizmaları süperoksitin zararlı etkisine karşı koruma ve oksijen toksisitesini önlemede etkindir. SOD katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir [188-191].

SOD mutantları kullanılarak, oksidatif stres parametrelerine bakılan bir çalışmada SOD-1 delesyonlu suşlar kullanılarak, hücre içi oksidasyon düzeyi, lipid peroksidasyonu, glutatyon metabolizması incelenmiş ve hücrenin redoks dengesinde sorun olduğu belirtilmiştir [192]. Bu çalışmalara ek olarak maya hücrelerinde H_2O_2 'e karşı lipoik asidin koruyucu etkileri incelenmiş, koruyucu etkinin daha iyi anlaşılabilmesi için Süperoksit Dismutaz geni delesyonlu bazı maya suşları kullanıldığında, lipoik asidin mitotik bölünme sayısını ve canlılık oranlarını artırdığı ispatlanmıştır [193]. İyonize radyasyon uygulanmış *S. cerevisiae* hücrelerinde SOD enziminin koruyucu etkileri araştırılmıştır. İyonize radyasyon uygulanmış yabani tip ve SOD geni delesyonlu suşlar arasında karşılaştırmalar yapılmış ve canlılık oranları ile protein karbonil düzeyleri arasında belirgin farklılıklar gözlenmiştir [194].

Çalışmamızda iki farklı dozda krom uygulanan Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) örneklerine üç farklı dozda C vitamini (10, 15 ve 20 ppm) çözeltisinin katılmasıyla zamana bağlı olarak mayaların SOD enzim aktiviteleri Tablo 3.19 ve Şekil 3.19'da gösterilmiştir. Kontrol grubunda zamana bağlı olarak SOD enzim aktivitesinde artışlar ($p<0,005$) gözlenirken, diğer grupların tümünde de zamana bağlı olarak enzim aktivitelerinde artmaların ($p<0,005$) olduğu gözlenmiştir. Krom dozunun artışına bağlı olarak grupların SOD enzim aktivitelerinde artmalar ($p<0,005$), artan C vitamini dozuna karşılık SOD enzim aktivitelerinde ise azalmaların ($p<0,005$) olduğu belirlenmiştir.

Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'da CuZn-SOD enzimi eksikliğinin replikasyon ömrünün kısılmasına yol açtığı ve mayaya askorbat eklenmesiyle mayanın replikasyon ömrünün arttığı bildirilmiştir. Askorbatın bu görevi CuZn-SOD enzim aktivitesini artırarak gerçekleştirdiği rapor edilmiştir [195-197].

Ayrıca *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri hiperosmotik basınca ve 0,2 mM H_2O_2 dozuna maruz bırakılmış, her iki koşulda da SOD enzimi aktivitelerinin kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir [198]. Bulgularımızın belirtilmiş olan literatürlerle uyumlu olduğu görülmektedir.

Oksidatif stresin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla oksidasyon-antioksidasyon mekanizmalarını aydınlatma ve çözümler üretmeye yönelik pek çok araştırma yürütülmektedir. Özellikle başta insan olmak üzere, çeşitli canlı sistemlerinde bu mekanizmalar çok önemlidir. Maya hücreleri ile memeli hücreleri büyük oranda

benzerdirler [199]. Bu sebeple oksidatif stresin yol açtığı yaşlanma [200], apoptosis [201] ve çeşitli hastalıkları [202] aydınlatma çalışmalarında önemlidir.

Çalışmamızda krom stresine karşı memeli hücreleri gibi ökaryotik bir canlı olan maya (*Saccharomyces cerevisiae*)’da oksidatif strese karşı antioksidan cevap ile bu cevaba C vitamininin etkisi araştırılmıştır. Sonuçta kromun artan dozuna karşı A, E, C vitaminleri, GSH ve GSH/GSSG oranı miktarlarında azalmalar gözlenirken, MDA, GSSG miktarları ile GSH-Px, GSH-Rd ve SOD enzim aktivitelerinde ise artışlar gözlenmiştir. Bu sonuçlardan kromun maya (*Saccharomyces cerevisiae*)’da oksidatif strese yol açtığı, ortama ilave edilen C vitaminin ise, dozuna bağlı olarak etkin bir süpürücü ve koruyucu olarak etki ettiği tespit edilmiştir. Uygulanan krom stresinin maya (*Saccharomyces cerevisiae*) metabolizmasını değişikliğe uğrattığı gözlenmiştir. Sonuç olarak; krom kaplarda mayalanma işleminin uzun süreli olmaması, aksi halde ise ortama C vitamini katılmasının daha uygun olabileceği söylenebilir. Ayrıca sonuçlarımızın ökaryotik bir canlı olan maya ve memeli hücrelerinde redoks dengesinin aydınlatılmasına yardımcı olabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- [1] **Dünder, Y., Aslan, R.,** 1999. Oksidan-antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi*, **9 (1-2)**, 32-39.
- [2] **Word, R.J., Peters, T.J.,** 1996. Free radicals. Kaplan LA, Pesce AJ editors. *Clinical chemistry*. 3th Ed. Mosby Year Book, Inc. 765-777.
- [3] **Abuja, P.M., Albertini, R.,** 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta.*, **306**, 1-17.
- [4] **Barber, D.A., Harris, S.R.,** 1994. Oxygen free radicals and antioxidants: *Areview. Am. Pharmavy.*, **34 (9)**, 26-35.
- [5] **Halliwell, B.,** 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, **344**, 721-724.
- [6] **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.,** 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, **219**, 1-14.
- [7] **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.,** 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol*, **49 (3)**, 577-587
- [8] **Akkuş, İ.,** 1995. Serbest oksijen radikalleri ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım, Konya: 1-15.
- [9] **Fridovich, I.,** 2001. Oxidative stres. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. pp. 1-5.
- [10] **Nordberg, J., Arner, E.S.J.,** 2001. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, **31 (11)**, 1287-1317.
- [11] **Kontos, H.A., Wei, E.P., Ellis, E.F., Jenkins, L.W., Povlishock, J.T., Rowe, G.T., Hess, M.L.,** 1985. Appearance of superoxideanion radical in cerebral extracellular space during increasedprostaglandin synthesis in cats. *Circ. Res.*, **57**, 142–151.

- [12] **Zimmerman, B.J., Granger, D.N.**, 1994. Mechanisms of reperfusion injury. *Am. J. Med. Sc.*, **307**, 284–292.
- [13] **McIntyre, M., Bohr, D.F., Dominiczak, A.F.**, 1999. Endothelial function in hypertension. *Hypertension*, **34**, 539–545.
- [14] **Oruç Özcan, E.**, 1998. 2,4-Diamin ve Azinfosmetilin Tilapia Nilotica’da karaciğerde antioksidan enzim aktivitelerine ve lipid peroksidasyonuna etkileri. *Doktora Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- [15] **Hinder, R.A., Stein, H.J.**, 1991. Oxygen-derived free radicals. *Arch Surg.*, **126**, 104-105.
- [16] **Gutteridge, J.M.C.**, 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chemistry*. **41**, 1819-1828.
- [17] **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.**, 1989. *Free radicals in biology and medicine*. 2th Ed. Oxford: Clarendon Pres. 125.
- [18] **Ünal, B.**, 1999. B Talasemi ve G6PD enzim eksikliğinde MDA düzeyi. *Uzmanlık Tezi*, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana.
- [19] **Basaga, H.S.**, 1990. Biochemical Aspects of Free Radicals. *Biochem. Cell Biol.* **68**, 989-998.
- [20] **Winrow, V.R., Winyard, P.G., Morris, C.J., Blake, D.R.**, 1993. Free radicals in inflammation: Second messengers and mediators of tissue destruction. *Dr MED Bull.*, **49**, 506-522.
- [21] **Simonian, N.A., Coyle, J.T.**, 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 83-106.
- [22] **Erden, M.**, 1992. Serbest radikaller . *T. Klin. Tıp Bilimleri Dergisi*, **12**, 201-207.
- [23] **Cheeseman, K.H., Slater, T.F.**, 1993. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* **49 (3)**, 479-480.

- [24] **Meram, İ., Aktaran, Ş.**, 2002. Serbest radikallerin biomoleküller üzerine etkileri. *Arşiv*, 11-299.
- [25] **Igari, T., Kaneda, H., Houriuchi, S., Onu, S.**, 1982. A remarkable increase of superoxide dismutase activity in synovial fluid of patient with rheumatoid arthritis. *Clin Orthop and Related Research*. **162**, 282-287.
- [26] **Kurutaş Belge, E., İnanç Güler, F., Kılınç, M.**, 2004. Serbest radikaller. *Arşiv*, **13**, 120-123.
- [27] **Cighetti, G., Duca, L., Bortone, L., Sala, S., Nava, I., Fiorelli, G., Cappellini, M.D.**, 2002. Oxidative status and Malondialdehyde in β -thalassaemia patients. *European Journal of Clinical Investigation*, **32**, 55-601.
- [28] **Clarkson, P.M., Thompson, H.S.**, 2000. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr*, **72**, 637-646.
- [29] **Walker, G.M.**, 1998. *Yeast physiology and biotechnology*, John Wiley & Sons, England, 0-471-964468:321.
- [30] **Hawkins, C.L., Davies, M.J.**, 1998. Degradation of hyaluronic acid, poly-and mono saccharides, and model compounds by hypochlorite: Evidence for radical intermediates and fragmentation. *Free Radical Biology and Medicine*, **24 (9)**, 1396-1410.
- [31] **Young, I.S., Woodside, J.V.**, 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, **54**, 176-186.
- [32] **Mccord, J.M., Fridovich, I.**, 1969. Superoxide dismutase. *J. Biological Chemistry*, **244 (22)**, 6049-6055.
- [33] **Fridovich, I.**, 1997. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. *J. Biological Chemistry*, **272 (30)**, 185-18525.
- [34] **Maruin, L.S., Mccord, J.M.**, 1975. Protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.*, **56**, 1319-1323.

- [35] **Kajihara, J., Enomoto, M., Katoh, K., Mitsuta, K., Konho, M.,** 1990. Relationship between the ligand structure of copper and stability of superoxide dismutase. *Agric. Biol.Chem.*, **54 (2)**, 495-499.
- [36] **Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B.,** 1988. The deoxsiriboz assay both for free radical and for site specific Hydroxyl radical production. *Biochem.*, 253-932.
- [37] **Açan, N.L., Tezcan, E.F.,** 1992. Glutasyon redüktaz. *Biyokimya Dergisi*, **17 (2)**, 67-83.
- [38] **Kutsky, R.J.,** 1981. Hand book of vitamins, mineral and hormones. 2th Ed. VMR, 157-207, New York.
- [39] **Adam, B., Yiğitoğlu, R.,** 2008. Biyokimya & Klinik biyokimya, s. 580.
- [40] **Gözükara, E.,** 2001. Biyokimya, No; 2:710.
- [41] **Özkan, A., Fışkın, K.,** 2004.Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidant enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, **14**, 52-60.
- [42] **Balcıoğlu, A.,** 1993. Nitrik oksit: Yeni biyolojik ikincil haberci. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **13**, 31-45.
- [43] **Aydın, A., Sayal, A., Işimer, A.,** 2001. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 20:75. Ankara.
- [44] **Zwart De, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M., Vermeulen, N.P.E.,** 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 202-226.
- [45] **Tadmouri, G.O., Başak, A.N.,** 2001. B–thalassemia. in Turkey; A review of the clinical epidemiological molecular and evoluinory aspects. *Hemoglobin*, **25(2)**, 227-239.
- [46] **Burtis, C.A., Ashwood, E.R.,** 2005.Vitaminler. Aslan D. Eds. *Klinik Kimyada Temel İlkeler*. Ankara: Palme Yayınları, 548-550, 332-333, 578-601.

- [47] **Sies, H., Stahl, W., Sundquist A.R.**, 1992. Antioxidant function of vitamins. Vitamin E and C, betacarotene and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, **669**, 7-20.
- [48] **Nikolai, E.P., Tatyana, V.L., Tatyana, A.K., Lowell, P.K.**, 2001. Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: Antioxidants or pro-oxidants? *Free Rad. Bio. And Med.*, **31 (3)**, 398-404.
- [49] **Tüzün, C.**, 1997. Biyokimya, 3. Baskı, Palme Yayıncılık, 151-187, Ankara.
- [50] **Emerk, K., Onat, T.**, 1997. Temel Biyokimya. 2. Baskı, Saray Medikal Yayıncılık ve Tic. Ytd. Şti., İzmir- Türkiye.
- [51] **Wolf, R., Wolf, D., Ruocco, V.**, 1998. Vitamin E: The radical protector. *J. of Eur. Academy of Derm. and Ver.*, **10**, 103-117.
- [52] **Nelson, D.L., Cox, M.M.**, 2000. *Lehninger, Principles of Biochemistry* 3rd Ed. Worth Publishing: New York, ISBN 1-57259:153-156.
- [53] **Shibata, H., Sasaki, N., Hondjoh, T., Ohishi, I., Takiuchi, M., Ishioka, K., Ahmed, M., Soliman, M., Kimura, K., Saito, M.**, 2003. Feline leptin: immunogenic and biological activities of the recombinant protein and its measurement by ELISA. *JVet Med Sci*, **65**, 1207-1211.
- [54] **Meister, A., Anderson, M.E.**, 1983. Glutathione. *Ann Rev Biochem*, **52**, 711-760.
- [55] **Meister, A.**, 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, **220**, 472- 477.
- [56] **Deneke, S.M., Fanburg, B.L.**, 1989. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*, **257**, 163-173.
- [57] **Arrick, B., Nathan, C.**, 1984. Glutathione metabolism as determinant of the therapeutic efficacy: A review. *Cancer Res*, **33**, 4224-4232.

- [58] **Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G.,** 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, **13**, 341-90.
- [59] **Sözmen, E.Y.,** 2002. Yaşlanma Biyokimyası. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY. *İnsan Biyokimyası*. Ankara : Palme Yayıncılık, 665-674.
- [60] **Verachtert, H., De Mot, R.,** 1990. Biotechnology and biocatalysis, Marcel Dekker. Inc., New York, p. 536.
- [61] **Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D.,** 2000. Yeasts: characteristics and identification, 3th Ed., Cambridge University Press, Cambridge p. 1139.
- [62] **Boekhout, T., Robert, V., Phaff, H.,** 2003. Yeast in food: beneficial and detrimental aspects. *CRC Pres, Boca Raton*, 69-121.
- [63] **Öztürk, H.,** 2003. In-vitro-studien zum Einfluss von topinamburmehl und *Saccharomyces boulardii* auf den mikrobiellen vorgagenstoffwechsel. Diss, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany, 91.
- [64] **Halasz, A., Lasztity, R.,** 1991. Use of yeast biomass in food production. *CRC Press, Boca Raton*, 14, 23, 29, 34, 39.
- [65] **Roth- Maier, D.A.,** 1979. Bierhefe-ein aktuelles Futtermittel? *Der Tierzüchter*, **31**, 107-108.
- [66] **Deak, T.,** 1995. Methods for the rapid dedection and identification of yeast in food. *Trends in Food Science Technology*, **6**, 287-292.
- [67] **Phaff, H.J., Miller, M.W., Mrak, E.M.,** 1966. The live of yeasts. Harward University Press, Cambridge, p. 186.
- [68] **Jakobsen, M., Norvhus, J.,** 1996. Yeast and their possible beneficial and p. negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy Journal*, **6**, 755-768.

- [69] **Hierro, N., Gonzalez, A., Mas, A., Guillamon, J.M.,** 2004. New PCRbased methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 792-801.
- [70] **Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S.,** 2004. Metallerin çevresel etkileri I-II, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü (Seminer çalışması 24s).
- [71] **Zouboulis, A.I., Katsoyiannis, I.A.,** 2004. Recent advances for the bioremediation of arsenic from contaminated groundwater sources. In: 6th Intern. Conf. on “*Metallurgy, Refractories and Environment*” (invited lecture), organized by T.U. Kosice (Slovakia) and Slovak Metallurgical Society in High Tatras (Slovakia), Proceedings published by the Organizers (E. Vircikova, ed.), 267-274.
- [72] **Deak, T.,** 2006. Safety and quality of fermented foods: New Developments in biopreservation, s. 195.
- [73] **Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I., King, A.D.,** 1992. Modern methods in food mycology. Elsevier, Amsterdam. Science Publishers. pp. 275–285.
- [74] **Shuler, M.L., Kargi, F.,** 1992. Bioprocess engineering basic concepts. Prentice-Hall, 479, New Jersey.
- [75] **Çelik, İ.,** 2007. Bir biyoreaktörde pH’nın iç model kontrolü (IMC). *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [76] **Barnett, J.A.,** 1992. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: A Short Review for Nontaxonomists. *Yeast*, **81**, 1-23.
- [77] http://tr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae#Kaynak.C3.A7.a.Saccharomyces_cerevisiae. 25/12/2013.
- [78] **Lewis, J.M., Young, T.W.,** 1995. *Brewing*, Chapman and Hall, London, p. 252.
- [79] **Stewart, G.G., Russell, I.,** 1998. *Brewing Science and Technology- Brewers Yeast*, The Institute of Brewing, London.

- [80] http://tr.wikipedia.org/w/index.php?title=Saccharomyces_cerevisiae&action=edit§ion=1.Saccharomyces_cerevisiae- Yaşam Döngüsü. 25/12/2013.
- [81] **Madigan, M.T., Martinko, J.M.**, 2006. Biology of microorganisms. 11 th ed. Vol. 1. Upple saddle river. NJ : Pearson education.
- [82] **Inoue, Y., Nomura, W., Takeuchi, Y., Ohdate, T., Tamasu, S., Kitaoka, A., Kiyokawa, Y., Masutani, H., Murata, K., Wakai, Y., Izawa, S., Yodoi, J.**, 2007. Efficient extraction of thioredoxin from *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol. *Appl. Environ. Microb.*, **73**, 1672-1675.
- [83] **Gaspar, L.R., Camargo, F.B., Graneti, M.D., Mara Campos, P.M.B.G.**, 2008. Evaluation of dermatological effects of cosmetic formulations containing *Saccharomyces cerevisiae* extract and vitamins. *Food and Chemical Toxicology*. **46-11**, 3493-3500.
- [84] **Çabuk, A., Akar, T., Kotluk, Z., Şaşmaz, S.**, 2007. *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile ağır metal giderimi ve metal toleransı. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **05-3**, 1-7.
- [85] **Xiong, Z.Q., Guo, M.J., Guo, Y.X., Chu, J., Zhuang, Y.P., Zhang, S.L.**, 2008. Efficient extraction of intracellular reduced glutathione from fermentation broth of *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol. *Bioresource Technology*, **100**, 1011-1014.
- [86] **Rollini, M., Musatti, A., Manzoni, M.**, 2010. Production of glutathione in extracellular form by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, **45**, 441-445.
- [87] **Santos, L.O., Gonzales, T.A., Ubeda, B.T., Alegre, R.M.**, 2007. Influence of culture conditions on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **77**, 763-769.
- [88] **Rollini, M., Manzoni, M.**, 2007. Glutathione release in extracellular form by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Biotechnology*, **131**, 196-210.

- [89] **Hancock, R.D., Galpin, J.R., Viola, R.,** 2000. Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, **186**, 245-250.
- [90] **Bronzetti, G., Cini, M., Andreoli, E., Caltavuturo, L., Panunzio, M., Croce, C.D,** 2001. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. *Mutation Research*, **496**, 105-115.
- [91] **Terzi, G.,** 2007. Kefirin bileşimi ve beslenme açısından önemi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 1-78.
- [92] **Jespersen, L.,** 2003. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEM Yeast Research*, **3**, 91-200.
- [93] **Blanguet, S., Marul-Bonnin, S., Beyssac, E., Pompon, D., Renaud, M., Alric M.,** 2001. The ‘biodrug’ concept: on innovative approach to therapy. *Trend in Biotechnology*, **19 (10)**, 393-400.
- [94] **Saegusa, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S., Hasai, T.,** 2004. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* induce interleukin-8 production from intestinal epithelial- like caco-2 cells in the presence of butyric acid. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **41**, 227-235.
- [95] **Grant, C.M., Maciver, F.H., Dawes, I.W.,** 1996. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, **29**, 511-515.
- [96] **Costa, V., Moradas-Ferreira, P.,** 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, **22**, 217-246.
- [97] **Jakubowski, W., Bilinski, T., Bartosz, G.,** 1999. Sensitivity of antioxidantdeficient yeast *Saccharomyces cerevisiae* to peroxynitrite and nitric oxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1472**, 395-398.

- [98] **Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B.**, 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 8469-8474.
- [99] **Aslan, S., Bozkurt, Z., Tekeli, A.N.**, 2007. Cu (II), Ni (II), Cd (II) ve Cr (VI) İyonlarının sulu çözeltilerden biyosorpsiyon yöntemi ile giderilmesi, *Mühendislikve Fen Bilimleri Dergisi*, **25 (2)**, 209-222.
- [100] **Müftüoğlu, B.**, 2010. Kuru aktif çamur ve *Spirulina platensis* kullanılarak Cu^{+2} biyosorpsiyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Gebze.
- [101] **Yazıcı, H.**, 2007. *Marrubium Globosum* SSP. *Globosum* bitkisi ile sulu çözeltilerden Cr ve Cu^{2+} iyonlarının biyosorpsiyonunun incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Isparta.
- [102] **Lobban, C.S., Harrison, P.J.**, 1997. *Saeweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, p. 366.
- [103] **Grimanis, A.P., Zafiropoulos, D., Vassilaki, R., Grimanis, M.**, 1978. Trace elements in the flesh and liver of two fish species from polluted and unpolluted areas in the Aegean sea. *Environ. Sci. Technol.*, **12**, 723-726.
- [104] **Adams, W.J., Kimerle, R.A., Barnett, J.W.**, 1992. Sediment quality and aquatic life assessment. *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 1865- 1875.
- [105] **Ermosele, C.O., Ermosele, I.C., Muktar, S.A., Birdling, S.A.**, 1995. Metals in fish from the upper benue river and lakes geryo and njuwa in northeastern Nigeria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**, 8-14.
- [106] **Mertz, W.**, 1969. Chromium occurrence and function in biological systems. *Physicologycal Reviews*. Walter Read Army Medical Center, Washington, 163-239.

- [107] **McDowell, L.R.**, 1992. Minerals in animal and human nutrition. *Academic Pres*, 265-293.
- [108] **Barceloux, D.G.**, 1999. Chromium. *Clin Toxicol.*, **37 (2)**, 173-194.
- [109] **Prasad, A.S.**, 1978. Chromium. trace elements and iron in human metabolism. John Wiley and Sons LTD., 3-12.
- [110] **Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamhoğlu, M., Tiftik, A.M., Başpınar, N.**, 2000. *Biyokimya* (2. Baskı). Ankara: 51-52.
- [111] **Yamamoto, A., Wada, O., Ono, T.**, 1984. Distribution and chromium-binding capacity of a low molecular-weight, chromium-binding substance in mice. *J Inorg Biochem*, **22 (2)**, 91-102.
- [112] **Borguet, F., Cornelis, R., Delanghe, J., Lambert, M.C., Lameire, N.**, 1995. Study of the chromium binding in plasma of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Chim Acta.*, **238 (1)**, 71-84.
- [113] **Vincent, J.B.**, 2000. The biochemistry of chromium. *J Nutr*, **130**, 715-718.
- [114] **Offenbacher, E.G., Pi-Sunyer, F.X.**, 1988. Chromium in human nutrition. *Ann Rev Nutr.*, **8**, 543-563.
- [115] **Bahijiri, S.M., Mira, S.A., Mufti, A.M., Ajabnoor, M.A.**, 2000. The effects of organic chromium and brewer's yeast supplementation on glucose tolerance, serum lipids and drug dosage in individuals with type 2 diabetes. *Saudi Med J.*, **21 (9)**, 831-837.
- [116] **Lucidi, R.S.**, 2005. Effect of chromium supplementation on insulin resistance and ovarian and menstrual cyclicality in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, **84 (6)**, 1755-1757.
- [117] **Walter Mertz**, 1987. 'Trace elements in human and animal nutrition. 15th Edition', Volume 1. Academic Pres.

- [118] **Anderson, R.A., Bryden, N.A., Evock-Clover, C.M., Steele, N.C.,** 1997. Beneficial effects of chromium on glucose and lipid variables in control and somatotropin-treated pigs are associated with increased tissue chromium and altered tissue copper, iron and zinc. *J Anim Sci*, **75**, 657-661.
- [119] **Uyanık, F., Eren, M., Güçlü, B.K., Şahin, N.,** 2005. Effects of dietary chromium supplementation on performance, carcass traits, serum metabolites, and tissue chromium levels of Japanese quails. *Biol Trace Elem Res*, **103**, 187-197.
- [120] **Korhan, H., Halipçi, H.N., Kertmen, M., Dıǧrak, M.,** 2012. *Saccharomyces cerevisiae* Biyokütlesi ile Remazol Navy Blue Boyar Maddesinin Biyosorpsiyonu. *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 15 (3).
- [121] **Jakubowski, W., Bartosz, G.,** 2000. 2,7-Dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure?. *Cell Biology International*, **24 (10)**, 757-760.
- [122] **Catignani, G.L.,** 1983. Simultaneous determination of retinol and α -Tocopherol in serum or plazma by liquid chromatography. *Clin. Chem.*, **29**, 708-712.
- [123] **Miller, K.W., Lorr, N.A., Yang, C.S.,** 1984. Simultaneous determination of plazma Retinol α -Tocopherol, Iycopene, α -Carotene and β -Carotene by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochem.*, **138**, 340-345.
- [124] **Çetinkaya, N., Özcan, H.,** 1991. Investigation of seasonal variations in cow serum Retinol and β -Carotene by high performance liquid chromatographic method comp. *Biochem. Physiol.*, **100 (4)**, 1003-1008.
- [125] **Cerhata, D., Bauerova, A., Ginter, E.,** 1994. Determination of Ascorbic Acid in blood serum using high-performance liquid chromatography and its correlation with spectrophotometric. *Caska-Slov-Farm.*, **43 (4)**, 166-168.

- [126] **Tavazzi, B., Lazzarino, G., Di-Pierro, D., Giardina, B.,** 1992. Malondialdehyde production and Ascorbate decrease are associated to the eperfusion of the isolated postischemic rat heart. *Free Radical Biology and Medicine*, **13 (1)**, 75-78.
- [127] **Karatas, F., Karatepe, M., Baysar A.,** 2002. Determination of free malondialdehyde in human serum by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, **311**, 76-79.
- [128] **Dawes, P., Dawes, E.,** 2000. SGE Chromatography Products Catalog, pg: 182.
- [129] **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Rondall, R.J.,** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 261-275.
- [130] **İlhan, N.,** 1998. Deneysel olarak karaciğer iskemi reperfüzyon hasarı oluşturan kobaylarda oksidan ve antioksidan sistemin incelenmesi. *Doktora Tezi*, F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- [131] **Beutler, E.,** 1984. Red cell metabolism. *A manual of biochemical methods*. 3th Ed. Grune & Stratton Orlando.72-73, 74-75, 105-106. ed, USA.
- [132] **Sun, Y., Oberley, L.W., Li, Y.,** 1988. A simple method for clinical assay of Superoxide Dismutase. *Clin. Chem.*, **34 (3)**, 497–500.
- [133] **Bailey, J.E., Ollis, D.F.,** 1986. Biochemical engineering Fundamentals. 2nd Edition, Mc Graw- Hill, Singapore.
- [134] **Kwolek-Mirek, M., Zadrag-Tecza, R., Bednarska, S., Bartosz, G.,** 2011. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* devoid of Cu, Zn-superoxide dismutase as a cellular model to study acrylamide toxicity. *Toxicology in Vitro*, **25**, 573-579.
- [135] **Mertz, W.,** 1993. Chromium in human nutrition: a review. *J. Nutr.*, **123**, 626–633.
- [136] **Anderson, R.A.,** 1995. Chromium, glucose tolerance, diabetes and lipid metabolism. *J. Adv. Med.*, **8**, 37–49.

- [137] **Uslu, O., Türkman, A.**, 1987. Su kirliliği ve kontrolü, T.C. Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları Eğitim Dizisi 1, Ankara, 1-18.
- [138] **Gavrilescu, M.**, 2004. Removal of heavy metals from environment by biosorption, Eng. Life Sci., **3**, 219-232.
- [139] **Piotrowska, A., Mlyni, K., Siwek, A., Dybala, M., Opoka, W., Poleszak, E., Nowak, G.**, 2008. Antidepressant-like effect of chromium chloride in the mouse forced swim test: involvement of glutamatergic and serotonergic receptors. *Pharmacol, Rep.*, **60**, 991–995.
- [140] **Yang, L., Chen, J.P.**, 2007. Biosorption of hexavalent chromium onto raw and chemically modified *Sargassum* sp. *Bioresource Technology*, In Press.
- [141] **Wood, J.M., Wang, H.F.**, 1985. Strategies for microbial resistance to heavy metals. In “Chemical Processes in Lakes” (V. Stumm, ed.). 81-98. Wiley, New York.
- [142] **Erol, Ö., Oldacay, S., Erdem, G.**, 2003. *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae* şuşlarının elektromanyetik alandaki üreme davranışları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, **33**, 191-196.
- [143] **Kığ, C.**, 2003. *Schizosaccharomyces pompe*’de invertaz aktivitesine ilişkin çalışmalar, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [144] **Agüloğlu, S., Niğiz, R.**, 2007. Üç farklı protetik estetik materyal üzerinde *Candida Albicans* yapışmasının karşılaştırmalı olarak incelenmesi. *Dicle Tıp Dergisi*, **34(3)**, 176-181.
- [145] **Tsezos, M., Volesky, B.**, 1982. The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 385-401.
- [146] **Friis, N., Myers-Keith, P.**, 1986. Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 21-28.

- [147] **Galun, M., Galun, E., Siegel, B.Z., Keller, P., Lehr, H., Siegel, S.M.,** 1987. Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass:kinetic and uptake parameters. *Water Air Soil Pollution*, **33**, 359-371.
- [148] **Gadd, G.M.,** 1990.Metal tolerance. In: Edwards C, ed. Microbiology of extreme environments. Milton Keynes: Open University Press, 178-210.
- [149] **Ramelow, G.J., Fralick, D., Zhao, Y.,** 1992. Factors affecting the uptake of aqueous metal ions by dried seaweed biomass. *Microbios*,**72**, 81-93.
- [150] **Veglio, F., Beolchini, F.,** 1997. Removal of metals by biosorption: A Review. *Hydrometallurgy*, **44**, 301-316.
- [151] **Pekmez, M.,** 2004. Oksidatif stresuygulanmış *Schizosaccharomyces Pombe*'de moleküler çalışmalar, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [152] **Hamad, İ.,** 2007. Oksidatif stresuygulanmış *Schizosaccharomyces Pombe*'de protein oksidasyonuna karşı doğal antioksidanların koruyucu etkisi. *Doktora Tezi*, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [153] **Cabiscol, E., Puiglat, E., Echave, P., Herrero, E., Ros, J.,** 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, **275 (35)**, 27393-27398.
- [154] **Jianlong, W., Zeyu, M., Xuan, Z.,** 2004. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to chromium stres. *Process Biochemistry*, **39**, 1231–1235.
- [155] **Sies, H., Stahl, W., Sundquist A.R.,** 1992. Antioxidant function of vitamins. Vitamin E and C, betacarotene and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, **669**, 7-20.
- [156] **Kılınç, K.,** 1985. Oksijen radikalleri, üretilmeleri, fonksiyonları, toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi*, **10**, 60-89.

- [157] **Rubowitz, A., Assia, E.I., Rosner, M., Topaz, M.**, 2003. Antioxidant protection against corneal damage by free radicals during phacoemulsification. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.*, **44** (5), 1866–1870.
- [158] **Acharya, S., Acharya, U.R.**, 1997. In vivo lipid peroxidation responses of tissues in lead-induced Swiss mice. *Ind. Health.*, **35**, 542–544.
- [159] **Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.**, 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, **12**, 1161–1208.
- [160] **Ahmad, I., Maria, V.L., Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A.**, 2006. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to β -naphthoflavone. *Mutat. Res.*, **608**, 16–28.
- [161] **Lushchak, V.I.**, 2008. Oxidative stress as a component of transition metal toxicity in fish. In: Svensson, E.P. (Ed.), *Aquatic Toxicology Research Focus*. Nova Science Publishers Inc., Hauppauge, NY, USA, pp. 1–29.
- [162] **Vsaylkiv, O.Y., Kubrak, O.I., Storey, K.B., Lushchak, V.I.**, 2010. Cytotoxicity of chromium ions may be connected with induction of oxidative stress. *Chemosphere*, **80**, 1044–1049.
- [163] **Kubrak, O.I., Lushchak, O.V., Lushchak, J.V., Torous, I.M., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I.**, 2010. Chromium effects on free radical processes in goldfish tissues: Comparison of Cr(III) and Cr(VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **152**, 360–370.
- [164] **Gonzalez, M.J., Miranda-Massari, J.R., Mora, E.M., Guzman, A., Riordan, N.H., Riordan, H.D., Casciari, J.J., Jackson, J.A., Roman-Franco, A.**, 2005. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integrative Cancer Therapies*, **4**, 32–44.

- [165] **Büyükakyüz, N., Altuğ, T., Yaltırık, M.,** 2000. Kanser profilaksisinde antioksidan maddelerden E vitamini ve selenyumun önemi. *Diş Hekimliğinde Klinik Derg.*, **12**, 136-139.
- [166] **Nguyen-nhu, N.T., Knoop, B.,** 2002. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. *Toxicology Letters*, **135**, 219-228.
- [167] **Jamnik, P., Medved, P., Raspor, P.,** 2006. Increased glutathione content in yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to NaCl. *Annals of Microbiology*, **56 (2)**, 175-178.
- [168] **Izawa, S., Inoue, Y., Kimura, A.,** 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **368**, 73-76.
- [169] **Mirek, M.K., Bednarska, S., Bartosz, G., Bilinski, T.,** 2009. Acrolein toxicity involves oxidative stress caused by glutathione depletion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Biom. Toxicol.*, **25**, 363-378.
- [170] **Stephen, D.W.S., Jameison, D.J.,** 1996. Glutathione is important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, **141**, 207-212.
- [171] **Grant, C.M., Perrone, G., Dawes, I.W.,** 1998. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **253**, 893-898.
- [172] **Som, S., Basu, S., Mukherjee, D., Deb S, Choudhury, P.R., Mukherjee, S., Chatterjee, S.N., Chatterjee, I.B.,** 1981. Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. *Metab*, **30**, 572-577.
- [173] **Morel, Y., Barauki, R.,** 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.*, **342**, 481-496.

- [174] **Freeman, B.A., James, D., Crapo, M.D.**, 1982. Free radicals and tissue damage. *Laboratory Investigation*, **5 (47)**, 412-423.
- [175] **Byung, P.Y.**, 1994. Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiological Review*, **74 (1)**, 139-172.
- [176] **Thomas, M.J.**, 1995. The role of free radicals and antioxidants. *Critical Reviews in Food and Sci. Nutrition*, **35 (1-2)**, 21-39.
- [177] **Van-Der-Meulen, J.H., McArdle, A., Jackson, M.J., Faulkner, J.A.**, 1997. Contraction-induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: the role of vitamin E. *J. Appl. Physiol*, **83 (3)**, 817-823.
- [178] **Evelson, P., Ordonez, C.P., Llesuy, S., Boveris, A.**, 1997. Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in Mouse skin exposed to UVA radiation. *J. Photochem Photobiol. B*, **38 (2-3)**, 215-219.
- [179] **Kaur, G., Alam, M.S., Athar, M.**, 2009. Cumene hydroperoxide debilitates macrophage physiology by inducing oxidative stress: Possible protection by α -tocopherol. *Chemico-Biological Interactions*, **179**, 94-102.
- [180] **Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vaseural, P.**, 1997. Antioxidant enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*, **39**, 93-110.
- [181] **Szaleczky, E., Prechl, J., Fehér, J., Somogyi, A.**, 1999. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus - a rational approach. *Postgrad Med J.*, **75**, 13-17.
- [182] **Moncada, S., Higgs, A.**, 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.*, **329**, 2002-2012.
- [183] **Bott, A.B., Gren, M.A.**, 1991. Effect of Glutathione depletion on the biodistribution of Cu (PTSM) in rats. *Int. J. Rad. Appl. Inst. B.*, **18 (18)**, 865-869.

- [184] **Novelli, E.L., Silva, A.M., Monteiro, J.P., Sacomani, L.B., Novellif, J.L.,** 1997. Free radical production by Azomethine H: Effects on pancreatic and hepatic tissues, *Free Radic. Res.*, **26** (4), 319-324.
- [185] **Sorg, O.,** 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, **327** (7), 649-662.
- [186] **Lushchak, O.V., Kubrak, O.L., Torous, I.M., Nazarchuk, T.Y., Storey, K.B., Lushchak, V.I.,** 2009. Trivalent chromium induces oxidative stress in goldfish brain. *Chemosphere*, **75** (1), 56-62.
- [187] **Lushchak, V., Semchyshyn, H., Lushchak, O., Mandryk, S.,** 2005. Diethyldithiocarbamate inhibits in vivo Cu,Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**, 1739–1744.
- [188] **Fridovich, I.,** 1973. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Biochem. Soc. Trans.*, 1: 48.
- [189] **Lavelle, F., Michelson, A., Dimitrijevic, L.,** 1973. Biological protection by Superoxide Dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55-350.
- [190] **Petkau, A., Chelack, W., Pleskach, S., Meeker, B., Brady, C.,** 1975. Radioprotection of mice by Superoxide Dismutase. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 65-886.
- [191] **Sheng, L., Zheng, X., Tong, H., Liu, S., Du, J., Liu, Q.,** 2004. Purification and characterization of cytosolic isoenzyme III of Cu, Zn- Superoxide dismutase from tobacco leaves. *Plant Science*, **167** (6), 1235-1241.
- [192] **Koerkamp, M.G., Rep, M., Bussemaker, H.J., Hardy, G.P.M.A., MuL, A., Piekarska, K., Szigartyo, C.A.K., Mattos, J.M.T., Tabak, H.F.,** 2002. Dissection of transient oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* by using DNA microarrays. *Molecular Biology of the Cell*. **13** (8), 2783-2794.

- [193] **Croce, C.D., Bronzetti, G., Cini, M., Caltavuturo, L., Poi, G.,** 2003. Protective effect of lipoic acid against hydrogen peroxide in yeast cells. *Toxicology in Vitro*, **17**, 753- 759.
- [194] **Lee, J.H., Choi, I.Y., Kil, I.S., Kim, S.Y., Yang, E.S., Park, J.W.,** 2001. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1526**, 191-198.
- [195] **Wawryn, J., Krzepilko, A., Myszk, A., Bilinski, T.,** 1999. Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. *Acta Biochim. Pol.*, **46**, 249–353.
- [196] **Swiecilo, A., Krawiec, Z., Wawryn, J., Bartosz, G., Bilinski, T.,** 2000. Effect of stress on the life span of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim. Pol.*, **47**, 355–364.
- [197] **Wawryn, J., Swiecilo, A., Bartosz, G., Bilinski, T.,** 2002. Effect of superoxide dismutases deficiency on the life span of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. An oxygen-independent role of Cu, Zn-superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1570**, 199–202.
- [198] **Lu, F., Wang, Y., Bai, D., Du, L.,** 2005. Adaptive response of *Saccharomyces cerevisiae* to hyperosmotic and oxidative stress, *Process Biochemistry*, **40**, 3614–3618.
- [199] **Costa, V., Moradas-Ferreira, P.,** 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, **22**, 217-246.
- [200] **Droge, W.,** 2003. Oxidative stress and aging. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **543**, 191-200.
- [201] **Mandavilli, B.S., Santos, J.H., Van Houten, B.,** 2002. Mitochondrial DNA repair and aging, *Mutation Research*, **509**, 127-151.

- [202] **Davies, M.J., Fu, S., Wang, H., Dean, R.T.,** 1999. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radical Biology and Medicine*, **27 (11-12)**, 1151-1163.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1995 yılında Fırat Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünü kazandım, 1999 yılında ise mezun oldum. 2001 yılında Fırat Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde Biyokimya alanında yüksek lisansa başladım. 2003 yılında mezun oldum. 2004 yılında aynı bölümde ve alanda doktora eğitimime başladım. Halen Necip Güngör Kısaparmak Ticaret Meslek Lisesinde Kimya Öğretmeni olarak görev yapmaktayım. Evli ve iki çocuk annesiyim.

Ebru ÇÖTELİ