



Kaldirik (*Trachystemon orientalis*) bitkisi polifenol oksidaz enzimi üzerine metallerin etkisi

Esmâ Hande Alıcı^{1*} Gülnur Arabacı¹

¹Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Sakarya
aalici@sakarya.edu.tr

18.01.2013 Geliş/Received, 01.08.2013 Kabul/Accepted

ÖZET

Yaptığımız çalışmada Polifenol oksidaz enzimi Kaldirik (*Trachystemon orientalis*) bitkisinden ekstrakte edilmiştir ve elde edilen ham enzim ekstraktı analizler için kullanılmıştır. Enzimin 4-metil katekol substratı için optimum pH değeri 5,0, optimum sıcaklık değeri 5 °C ve K_m sabiti 4,55 mM olarak bulunmuştur. Metal etkisi sonuçlarına göre Fe^{+3} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , K^{+1} enzimi aktive ederken, Hg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Sn^{+2} ve Na^{+1} inhibe etmiştir. Ba^{+2} , Al^{+3} ve Pb^{+2} metalleri ise enzim üzerinde hem aktivasyon hem inhibisyon etkisi göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Trachystemon orientalis*, Polifenol oksidaz, metal etkisi, enzim kinetiği

The metal effect on the polyphenol oxidase enzyme from borage (*Trachystemon orientalis*) plant

ABSTRACT

In this study, Polyphenol oxidase was extracted from Borage plant (*Trachystemon orientalis*) and the crude extract was used for the assays. Its pH and temperature optima for 4-methyl catechol were 5.0 and 5°C, respectively. K_m of this enzyme was 4.55 mM for 4-methyl catechol. We also found that the enzyme was activated by Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} , but inhibited by Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} , Na^{+} . Ba^{2+} , Al^{3+} and Pb^{2+} metal ions both activated and inhibited the enzyme at different concentrations.

Keywords: *Trachystemon orientalis*, Polyphenol oxidase, metal effect, enzyme kinetics

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Endüstriyel gelişmenin bir sonucu olarak çevre, ağır metallere gittikçe kirlenmektedir. Ağır metaller sular, topraklar ve tortullar için potansiyel bir tehlike teşkil etmektedir. Ağır metallerin belirli konsantrasyonlarda ekosisteme uzun süreli toksik etkisi olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [1, 2].

Metal iyonları sınırlı düzeylerde iken yaşam süreçleri için gereklidir. Gerekli metal iyonlarının konsantrasyonu hücre içerisinde enzimler tarafından düzenlenen bir transport mekanizmasıyla kontrol edilir. Aşırı, kullanılmayan metal iyonları hücre dışına atılır. Bununla birlikte normalde biyolojik sistemler, hücre için gerekli olmayan metal iyonları (safsızlık) için bir transport mekanizmasına sahip değildir. Bu metal iyonları biyolojik sisteme nüfuz eden, herhangi bir biyolojik rolü olmayan ve normalde biyolojik sistemde bulunmayan metal iyonlarıdır. Bu sebeple safsızlık metal iyonlarının aşırısı zehirlenme ya da hastalık etkisi yaratır. Bu metal iyonları toksik kabul edilir. Toksik metal iyonları şu şekilde sınıflandırılabilir;

- Gerekli metal iyonlarının aşırısı: Enzimlerin olağan aktiviteleri için eser miktarda gerekli olan metal iyonları, aşırı miktarda bulunduğu toksik etki yaratabilir. Magnezyum, mangan, krom, çinko, demir, bakır, kobalt ve nikel örnek verilebilir.
- Gerekli olmayan metal iyonları: Bu metal iyonları organizma için gerekli değildir ve eğer vücuda alınırsa toksik etki gösterir. Bu grubun örnekleri üçüncü geçiş serisinin ağır metal iyonları ve f blok elementleridir. Bu metal iyonları biyokimyasal sistemler için gerekli değildir fakat biyokimyasal moleküllere bağlanmaya kuvvetli bir eğilimleri vardır. Bu sebeple organizmaya alındıklarında toksik etki gösterirler.

Metal iyonları şu yollarla toksik etki yaratabilir;

- Safsızlık metal iyonu, esansiyel metal iyonlarının bağlanma bölgesi olan, enzim proteininin koordinasyon bölgesine bağlanabilir. Ayrıca iyon kanalı, membran ya da polisakkaritlere de bağlanabilir.
- Enzimin aktivite kaybı, enzimin yapısında aktivitesi için gerekli olan metal iyonunun dışarıdaki toksik metal iyonuyla yer değiştirmesinden kaynaklanabilir.
- Yeni metal iyonunun biyomoleküle girişi, onun konformasyonunu ve dolayısıyla biyolojik aktivitesini değiştirir.
- Metal iyonu DNA'ya bağlanabilir ve bu bağlanma baz sırasında değişmeye neden olabileceği için kusurlu protein ve enzimlerin üretilmesiyle sonuçlanabilir.
- Toksik metal iyonunun DNA'ya bağlanması replikasyonunu stimüle eder. Böylece kontrolsüz hücre

bölünmesi ve kanser oluşumuna neden olabilir [3] ayrıca bu durumun doğurganlığı azalttığı da bilinmektedir [4].

Volkanlar, erozyon, kaynak suları gibi doğal süreçlerin [5] yanında ağır metaller ekolojik çevreye madencilik, döküm, çamur ve atıksu arıtımı, pestisidlerin kullanımı, inorganik gübre ve atmosferik birikim gibi insan kaynaklı yollardan da girebilir [6,7]. İz elementlerin aşırı konsantrasyonları (Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb ve Zn) toksiktir ve büyümenin engellenmesi, biyokütlede azalma ve bitkilerin ölümüne neden olur. Ağır metaller solunum, fotosentez, hücrelerin boyuna uzaması, bitki-su ilişkisi, N-metabolizması ve mineral beslenmesi gibi fizyolojik süreçleri inhibe eder [1].

Ağır metaller hayvanların bağışıklık sistemi üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Örneğin Cd, Hg, Pb gibi bazı ağır metallerin düşük dozları bağışıklık sistemi fonksiyonunu geliştirebilirken yüksek dozları baskılayıcıdır. Pekçok çalışma bağışıklık sisteminin düzenlenmesinin çevredeki ya da laboratuvar ortamındaki öldürücü dozun altındaki metal maruziyeti ile ilgili olduğunu göstermiştir [5,8].

Belirli bir organik kirleticinin etkileri geçicidir, mikroorganizmaların onun varlığına adapte olma ve onu parçalama yeteneğine bağlıdır. Buna karşın toksik metaller toprakta kalabilir ve topraktaki mikrobiyal topluluğa uzun süreli hasar verip çeşitli biyotik ve abiyotik süreçleri olumsuz etkileyebilir [9]. Toksik metaller toprak enzim aktivitelerini de değiştirir. Toprak enzim aktiviteleri doğal ve insan kökenli karışıklıkların hassas ve erken indikatörleri olarak kabul edilmektedir [2,6]. Toprakta uzun süre kalan, doğada dirençli olan metaller, bitki kökleri tarafından absorbe edilirler ve bitkinin yapraklarına ve yenilebilir kısımlarına taşınırlar. Bitkinin farklı kısımlarındaki metal birikimi toprakta bulunan metalin kimyasal formu, ulaşılabilirliği, bitkinin türü ve olgunluk düzeyine bağlıdır [10]. Metal ve metaloidlerin tehdidi altında bulunan canlı toplulukları içerisinde bitkiler, hareketsiz ve yerleşik varlıkları sebebiyle, değişen çevresel koşullar altında toksik metal ve metaloitlere karşı en savunmasız olan organizmalardır. Toksik metal ve metaloidlerin doğrudan ya da dolaylı olarak reaktif oksijen türlerinin aşırı oluşumuna sebebiyet vermesi bitkilerde oksidatif strese neden olur [11].

Aerobik koşullarda, ağır metaller tekli oksijen (1O_2), süperoksit anyonu ($\bullet O_2^-$), hidroksi ($\bullet OH$), peroksi ($ROO\bullet$) ve alkoksi ($RO\bullet$) radikalleri gibi reaktif oksijen türlerine neden olabilir. Bitkilerde reaktif oksijen türleri hücre membranları, proteinler, DNA replikasyonu ve onarımında hasara neden olmakla birlikte kloroplast pigmentlerinin redüksiyonuna neden olabilir [7, 10,12].

Böylece fotosentetik aktivitenin azalması besin zincirindeki ilk seviye olduğu için mahsul veriminin azalmasına neden olabilir.

Bitkiler iki çok etkili antioksidan savunma sistemine sahiptir;

- Enzimatik yol (katalaz, peroksidaz, polifenol oksidaz, süperoksit dismutaz, glutatyon oksidaz)
- Enzimatik olmayan yol (askorbat, glutatyon, α -tokoferol ve karotenoidler)

Bu yolların her ikisi de reaktif oksijen türlerinin süpürülmesine izin verir ve bitki hücrelerini oksidatif hasardan korur [12,13]. Oksidatif stres durumlarında bitkilerde antioksidan savunma sistemleri aktive olduğundan antioksidan bir enzim olan Polifenol oksidaz seviyesinde artışlar gözlenmektedir [14].

Polifenol oksidazlar (PPO) bakır içeren yaygın enzimlerdir. Bu enzimler fenolik bileşikleri kinonlara oksitler ve bu reaksiyonda moleküler oksijeni kullanırlar. PPO'lar tarafından üretilen kinonlar yüksek derecede reaktifler ve kendileri biraraya gelip bağlanarak ve ayrıca proteinleri çapraz bağlayarak veya alkilleyerek hasar görmüş bitki dokularında ve ekstraktlarında genellikle gözlenen kahverengi pigmentlerin oluşmasına neden olurlar [15].

Trachystemon orientalis (L.) G. Don (*Boraginaceae*) türü 30-40 cm yükseklikte, rizumlu, çok yıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları sert tüylü, yürek biçiminde, her mevsim yeşildir ve çiçekleri mavimsiyahıdır. Türkiye'de Kuzey Anadolu bölgesinde, kayın ormanları altında ve Karadeniz bölgesinin değişik habitatlarında, ayrıca doğu Bulgaristan ve batı Kafkasya'da dağılım gösterir. İdrar arttırıcı, kan temizleyici, yumuşatıcı ve ateş düşürücü etkilere sahiptir. Dahilen infüzyon halinde kullanıldığı gibi ilkbaharda çiçek tomurcuklu ve yapraklı gövdeleri sebze olarak da tüketilmektedir. Ülkemizde halk arasında Kaldirik, Balıkotu, Hodan, Ispit, Acı hodan, Doğu hodanı, Burğu, Tamara, Zılbit adlarıyla bilinmektedir. Tanen, uçucu yağ, nitrat tuzları, müsilaj, saponin ve rezin taşımaktadır [16, 17]. Antioksidan fenolik bileşikler açısından zengin bir bitki olduğundan [18], yaptığımız çalışmada Polifenol oksidaz enzimi için kaynak bitki olarak seçilmiştir. Spesifik enzim sistemleri ile farklı ilaçlar, metal iyonları ve kimyasallar arasındaki etkileşimler son yıllarda geniş ölçüde çalışılmaktadır. Bu çalışmalar, ilaç tasarımı ve enzim mekanizmalarının aydınlatılması açısından çok önemlidir [19].

Bütün bu sebeplerden dolayı gerekli ya da toksik metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi, enzim

karakterizasyonu çalışmalarında çokça yer verilen bir konudur. Biz de yaptığımız bu çalışmada Kaldirik (*Trachystemon orientalis*) bitkisinden ekstrakte edilen Polifenol oksidaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklık gibi karakteristik özelliklerinin yanısıra enzimi, hem enzim aktivitesi için gerekli hem de gerekli olmayan metal iyonları ile etkileştirip meydana gelen değişimleri inceledik.

2. MATERYAL VE METOD (MATERIAL AND METHOD)

2.1. Kullanılan materyal (The materials used)

Kaldirik (*Trachystemon orientalis*) bitkisi Sakarya'nın Hendek ilçesindeki köylü pazarından mart ayının sonunda taze olarak temin edilmiştir. Temininden hemen sonra bitkinin çiçek, yaprak ve tomurcuk kısımları ayrılıp gövde kısmından ayrı halde derin dondurucuya alınarak kullanılabilecek kadar -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich, Merck firmalarından temin edilmiştir. Enzim aktivite çalışmaları Shimadzu UV-2401 PC UV-VIS model UV-Vis spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir.

2.2. Ham enzim özütünün hazırlanması (Preparation of crude extract)

Dondurucuda depolanmış kaldirik bitkisinin çiçek, tomurcuk ve yaprak kısımlarından 10 gram alınarak ince ince doğranmıştır. % 0,5 polivinil piroolidon (PVP), % 4 triton x-100 ve 0,001 M askorbik asit içeren 30 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,0) ile hazırlanan çözelti ile blender kullanılarak 5 dakika boyunca parçalanmıştır. Elde edilen homojenat üç kat tülbentten süzülüş ve 5.000 rpm'de 15 dk süresince santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatant ham enzim ekstraktı olarak enzim karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

2.3. Polifenol oksidaz aktivite tayini (Activity measurement of Polyphenol oxidase)

Polifenol oksidaz (PPO) enziminin aktivitesi pH 7,0 fosfat tamponu, 4-metil katekol substrat çözeltisi ve ham enzim ekstraktı karıştırılarak oda sıcaklığında, 420 nm'de 1dk süre ile absorbansdaki artış ölçülerek saptanmıştır. Toplam reaksiyon hacmi her ölçüm için 3 mL olarak sabit tutulmuştur. Zamana karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek elde edilen grafiğin eğiminden ilk hız değerleri hesaplanmıştır. Her aktivite tayininde ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

2.4. PPO enzimine substrat konsantrasyonunun etkisi (The effect of substrate concentration on PPO activity)

Enzimin maksimum hızının (V_{max}) ve Michaelis-Menten sabitinin (K_m) bulunması için gerçekleştirilen kinetik çalışmada 1,0 mM ile 10,0 mM arasında değişen 4-metil katekol substrat çözeltisi kullanılmıştır. Enzimin maksimum hızı ve K_m değeri tayin edilirken spektrofotometrik olarak 420 nm'de 60 s aktivitesi izlenmiştir. Daha sonra absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplanmıştır. Bu ilk hız değerleri Michaelis-Menten ($[S]$ 'a karşı V) ve Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/[S]$ 'ye karşı $1/V$) yerine konularak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur.

2.5. Optimum pH çalışması (Optimum pH assay)

PPO enzimi aktivitesine pH etkisinin incelenmesi çalışmasında 3,0 ile 9,0 arasında değişen pH'larda hazırlanmış tampon çözeltiler kullanılmıştır. pH 3,0-6,0 aralığında 0,1 M sitrat tamponu, pH 6,0-8,0 aralığında 0,1 M fosfat tamponu ve pH 8,0-9,0 aralığında 0,1 M Tris tamponu hazırlanmıştır. Enzimin 4-metil katekol substratına karşı gösterdiği aktivite farklı pH değerlerinde ölçülmüştür. Enzim aktivite tayinleri, önceki bölümde anlatıldığı gibi, spektrofotometrik yöntemle 60 s süresince 420 nm'de absorbans artışları izlenerek gerçekleştirilmiştir. Substrat konsantrasyonu 5 mM'da sabit tutulmuştur. pH değişkenine karşı yüzde aktivite grafiği çizilmiş ve enzimin 4-metil katekol substratına karşı en yüksek aktiviteyi gösterdiği pH değeri saptanmıştır.

2.6. Optimum sıcaklık çalışması (Optimum temperature assay)

PPO enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 °C'lerde enzim aktivitesine bakılmıştır. Bunu belirlemek için farklı sıcaklık değerlerinde, daha önceki gibi 60 s boyunca 420 nm'de absorbanstaki artış izlenmiştir. Yüksek sıcaklıklar için su banyosu ve düşük sıcaklıklar için ise buz banyosu kullanılmıştır. 4-metil katekol substrat konsantrasyonu 10 mM'da sabit tutulmuştur. Enzimin 4-metil katekol substratına karşı en yüksek aktiviteyi gösterdiği sıcaklık değeri saptanmıştır.

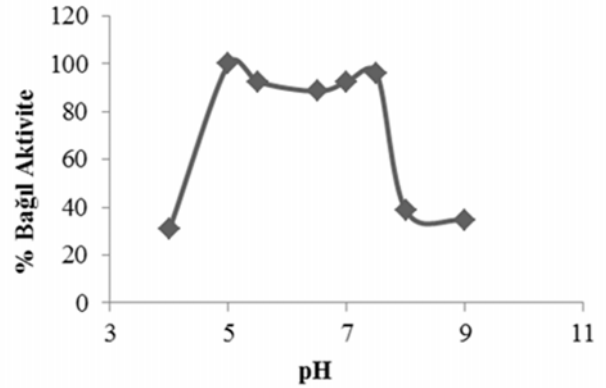
2.7. PPO enzimine metallerin etkisi (The effect of metal ions on PPO activity)

Kaldirik PPO enzimine metal etkisinin incelenmesi amacıyla standart koşullarda aktivite ölçümü yapılmış yalnız farklı olarak ortama sabit konsantrasyonda metal çözeltilerinden eklenmiştir. Bu amaçla metallerin son konsantrasyonu 0,5 mM (bazıları için), 1 mM ve 5 mM

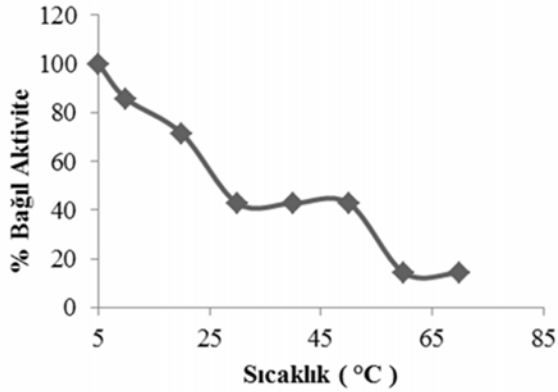
olacak şekilde ayarlanmıştır. pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış enzim çözeltileri metallerle birlikte 4°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 4-metil katekol sabit konsantrasyonda reaksiyon ortamına eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Çalışmada Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Al^{+3} , Pb^{+2} , Sn^{+2} , Na^{+1} , K^{+1} , Ni^{+2} metallerinin etkisi incelenmiştir. Sonuçlar metalsiz ortamda gerçekleştirilen kontrol reaksiyonun hızıyla mukayese edilmiştir.

3. BULGULAR (FINDINGS)

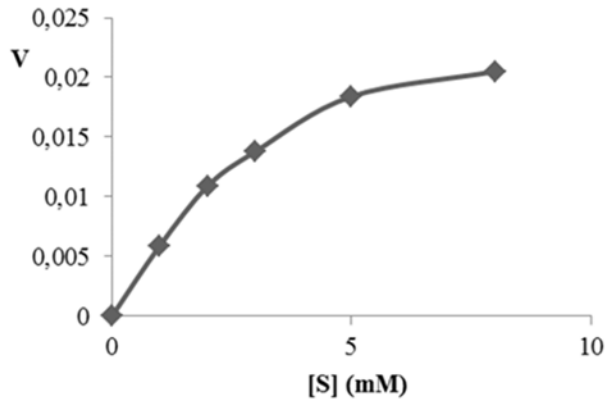
Yapılan çalışma sonucunda kaldirik PPO enziminin bazı karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Optimum pH denemesi sonuçlarına göre enzim 4-metil katekol substratı için 2 farklı pH optimumu vermektedir. Enzim en yüksek aktiviteyi pH 5,0'de göstermiştir fakat pH 7,5'da da aktivite pH 5,0'dekine çok yakındır. Enzim en yüksek aktiviteyi 5°C'de gösterdiğinden enzimin optimum sıcaklık değeri 5°C'dir. Çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden enzimin 4-metil katekol substratı için K_m değeri 4,55 mM, V_{max} değeri ise 0,0334 EÜ/mL olarak bulunmuştur.



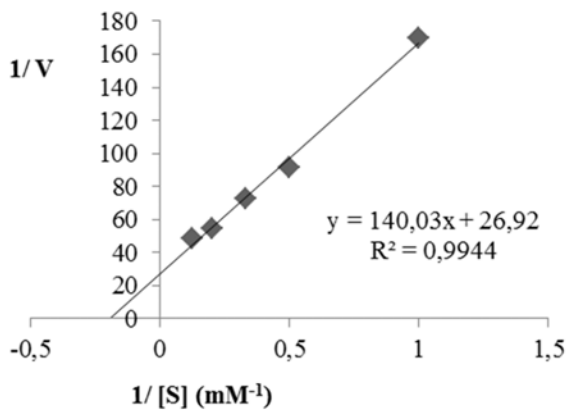
Şekil 1. 4-metil katekol substratı için PPO optimum pH grafiği (The optimum pH graph for 4-methylcatechol)



Şekil 2. 4-metil katekol substratı için PPO optimum sıcaklık grafiği (The optimum temperature graph for 4-methylcatechol)



Şekil 3. 4-metil katekol substratı için PPO Michaelis-Menten grafiği (The Michaelis-Menten graph for 4-methylcatechol)



Şekil 4. 4-metil katekol substratı için PPO Lineweaver-Burk grafiği (The Lineweaver-Burk graph for 4-methylcatechol)

Tablo 1. Kaldirik PPO enzimi için elde edilen bazı karakteristik değerler (Some characteristic values obtained for borage PPO)

Kaldirik PPO	
K_m (mM)	4,55
V_{max} (EÜ/mL)	0,0334
Opt. pH	5,0
Opt. Sıcaklık (°C)	5,0

Tablo 2. Çeşitli metallerle etkileştirilen PPO enziminin % kalan aktivite değerleri (The relative remaining activity values for metal-affected PPO)

Metal	PPO % Kalan Aktivite		
	Metal Son Konsantrasyonu (mM)		
	0,5 mM	1 mM	5 mM
Metalsiz	100	100	100
Ba ⁺²	-	109,1	81,81
Fe ⁺³	-	113,64	115,91
Hg ⁺²	65	65	0
Mg ⁺²	-	100	104,55
Mn ⁺²	-	95,45	0
Pb ⁺²	87,80	101,14	103,41
Sn ⁺²	85,37	95,12	100
Zn ⁺²	-	102,27	117,04
Ni ⁺²	-	87,78	87,78
Al ⁺³	-	105	97,5
K ⁺¹	-	112,5	107,5
Na ⁺¹	-	100	68,75
Cu ⁺²	-	107,14	135,71
Ca ⁺²	-	100	101,94

PPO enzim aktivitesine metal etkisinin incelendiği çalışmada, bazı metallerin enzim aktivitesini arttırdığı, bazı metallerin azalttığı ve bazılarının ise belli konsantrasyonlarda artırıp belli konsantrasyonlarda azalttığı tespit edilmiştir (Tablo 2). Sonuçlara göre Fe⁺³, Mg⁺², Zn⁺², Cu⁺², Ca⁺², K⁺¹ PPO aktivatörü iken, Hg⁺², Mn⁺², Ni⁺², Sn⁺² ve Na⁺¹ PPO enziminin inhibitörüdür. Ba⁺², Al⁺³ ve Pb⁺² metalleri ise reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonlarına göre enzim üzerinde hem aktivasyon hem inhibisyon etkisi göstermiştir. Ba⁺² ve Al⁺³ 1mM düzeyinde kullanıldığında enzimi düşük düzeyde de olsa aktive etmiş, 5 mM düzeyinde kullanıldıklarında ise inhibisyon etkisi göstermiştir. Pb⁺² 0,5 mM düzeyinde enzimde belirgin bir inhibisyon yaratmış, 1 ve 5 mM düzeylerinde ise enzim metalsiz aktivitesinin çok az üzerine çıkmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

Kaldirik PPO enzimi 4-metil katekol substratını 4,55 mM'lık K_m ve 0,0334 EÜ/mL'lik V_{max} değerleriyle dönüşüme uğratmıştır (Tablo 1). Bu değerler diğer bitki kaynaklı PPO enzimleri ile benzerlik göstermektedir fakat farklı çalışmaları da mevcuttur. Örneğin biberiye bitkisinden izole edilen PPO enziminin 4-metil

katekol substratı için K_m değeri 17 mM ve V_{max} değeri 11720 EÜ/mL'dir [23]. Polifenol oksidaz enziminin meyve ve sebzelerde aktivasyon gösterdiği optimum sıcaklık aralığı 25-30°C'dir. Bitki polifenol oksidazı için pH profili çalışmalarında optimum pH aralığının ise 4,5-8,0 olduğu bulunmuştur [20]. Kaldirik PPO enzimi için 4-metil katekol substratıyla elde edilen optimum pH değeri olan pH 5,0 bu genellemeye uyarken optimum sıcaklık değeri genele göre daha düşük kalmaktadır (5°C).

Yapılan çalışmada kaldirik PPO enziminin bazı metal iyonlarının varlığından fazlasıyla etkilendiği, bazı metal iyonlarının etkisini ise rahatlıkla tolere edebildiği görülmüştür. Enzim Sn^{+2} ve Pb^{+2} gibi toksik metal iyonlarına karşı son derece dayanıklıdır; 0,5 mM Sn^{+2} varlığında %15 inhibe olmuş fakat metal konsantrasyonu 1 ve 5 mM düzeyine arttırıldığında duruma adapte olarak metalsiz ortamdaki etkinliğiyle aktivite gösterebilmiştir. Pb^{+2} iyonu da Sn^{+2} ile tamamen benzer bir etki göstermiştir. Oysaki Sn^{+2} ve Pb^{+2} gibi iyonlar enzimleri şiddetle inhibe edebilmektedir. Örneğin çağla meyvesinden izole edilen PPO enziminin 10 mM Sn^{+2} varlığında aktivitesini tamamen kaybettiği [20], örümcek çiçeği PPO enziminin ise 5 mM Pb^{+2} varlığında aktivitesinin % 65'ini kaybettiği bildirilmiştir [21].

Hg^{+2} , kaldirik PPO enzimi için kuvvetli bir inhibitördür. 0,5 mM Hg^{+2} konsantrasyonunda enzim aktivitesi %65'e düşerken, 5 mM Hg^{+2} konsantrasyonunda enzim aktivitesini tamamen kaybetmiştir. Mn^{+2} da 5 mM'da enzimi tamamen öldürmüştür. Muz PPO enziminin ise 10 mM Mn^{+2} varlığında halen aktivitesinin % 94'ünü koruduğu görülmektedir [22]. Ni^{+2} ve Na^{+1} metal iyonları da kaldirik PPO enzimi üzerinde belirgin bir inhibisyon etkisi yaratmıştır.

Fe^{+3} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} ve K^{+1} metal iyonları enzim için aktivatör görevi görmüşlerdir. Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} ve K^{+1} iyonları enzim aktivitesinde çok az bir değişim yaratırken 5 mM düzeyindeki Fe^{+3} %15,91, Cu^{+2} %35,71'lik bir aktivite artışı meydana getirmiştir.

Biberiye bitkisinden izole edilen PPO enziminin metallere etkileştirildiğinde kaldirik PPO ile benzer özellikler sergilediği görülmüştür [23]. Kırmızı pazı yaprağı PPO enzimi ile bir karşılaştırma yaptığımızda ise K^{+1} iyonunun benzer şekilde enzimi aktive ettiği, Cu^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının farklı olarak enzimi inhibe ettiği görülmektedir [24].

Sn^{+2} ve Pb^{+2} metal etkilerinin şaşırtıcı sonuçları eşliğinde, sonuçlar genel olarak incelendiğinde pek çok ağır metalin PPO enzim aktivitesi üzerinde önemli bir değişim yaratmadığı hatta enzim aktivitesini arttırdığı

gözlenmiştir. PPO enziminin antioksidan savunma enzimlerinden biri olduğu düşünüldüğünde bu durum beklenen bir sonuçtur.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] Michalak A., Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress, Polish J. of Environ. Stud., 15 (4), 523-530, 2006.
- [2] Pe'rez-de-Moraa A., Burgosa P., Madejo'na E., Cabreraa F., Jaeckelb P., Schloterb M., Microbial Community Structure and Function in a Soil Contaminated by Heavy Metals: Effects of Plant Growth and Different Amendments, Soil Biology & Biochemistry, 38, 327-341, 2006.
- [3] Bhattacharya P. K., Metal Ions in Biochemistry, Alpha Science, London, 190-194, 2005.
- [4] Majer B. J., Tscheko D., Paschke A., Wennrich R., Kundi M., Kandeler E., Knasmüller S., Effects of Heavy Metal Contamination of Soils on Micronucleus Induction in Tradescantia and on Microbial Enzyme activities: a Comparative Investigation, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 515, 111-124, 2002.
- [5] Dubovskiy I.M., Grizanova E.V., Ershova N.S., Rantala M.J., Glupov V.V., The Effects of Dietary Nickel on The Detoxification Enzymes, Innate Immunity and Resistance to The Fungus *Beauveria bassiana* in The Larvae of The Greater Wax Moth *Galleria mellonella*, Chemosphere, 85, 92-96, 2011.
- [6] Shen G., Lu Y., Zhou Q., Hong J., Interaction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heavy Metals on Soil Enzyme, Chemosphere, 61, 1175-1182, 2005.
- [7] Xu H., Song P., Gu W., Yang Z., Effects of Heavy Metals on Production of Thiol Compounds and Antioxidant Enzymes in *Agaricus bisporus*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 74, 1685-1692, 2011.
- [8] Kazimirova M., Slovák M., Effects of Heavy Metals and Fluorine on Phagocytosis and Phenoloxidase Activity in *Mamestra brassicae*, Eur. J. Entomol., 93, 467-473, 1996.
- [9] Gianfreda L., Ruggiero P., Soil Biology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 257-311, 2006.
- [10] Nayeka S., Gupta S., Sahab R.N., Metal Accumulation and Its Effects in Relation to Biochemical Response of Vegetables Irrigated with Metal Contaminated Water and Wastewater, Journal of Hazardous Materials, 178, 588-595, 2010.

- [11] Anjum N.A., Ahmad I., Mohmood I., Pacheco M., Duarte A.C., Pereira E., Umar S., Ahmad A., Khan N.A., Iqbal M., Prasad M.N.V., Modulation of Glutathione and Its Related Enzymes in Plants' Responses to Toxic Metals and Metalloids, *Environmental and Experimental Botany*, 75, 307–324, 2012.
- [12] Saffar A., Najjar M.B.B., Mianabadi M., Activity of Antioxidant Enzymes in Response to Cadmium in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Biological Sciences*, 9 (1), 44-50, 2009.
- [13] Israr M., Jewella A., Kumarb D., Sahia S.V., Interactive Effects of Lead, Copper, Nickel and Zinc on Growth, Metal Uptake and Antioxidative Metabolism of *Sesbania drummondii*, *Journal of Hazardous Materials*, 186, 1520–1526, 2011.
- [14] Jaleel C.A., Jayakumar K., Chang-Xing Z., Azooz M.M., Effect of Soil Applied Cobalt on Activities of Antioxidant Enzymes in *Arachis hypogaea*, *Global Journal of Molecular Sciences*, 3 (2), 42-45, 2008.
- [15] Constabel C.P., Barbehenn R., *Induced Plant Resistance to Herbivory*, Springer, Dordrecht , 253-269, 2008.
- [16] Karagöz A., Cevahir G., Özcan T., Sadıkoğlu N., Yentür S., Kuru A., Bazı Yüksek Bitkilerden Hazırlanan Sulu Ekstrelerin Antiviral Aktivite Potansiyellerinin Değerlendirilmesi, *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı-Bildiriler*, Eskişehir, 318-321, 2002.
- [17] Akçin Ö.E., Kandemir N., Akçin Y., A Morphological and Anatomical Study on a Medicinal and Edible Plant *Trachystemon orientalis* (L.) G.Don (*Boraginaceae*) in the Black Sea Region, *Turk J Bot*, 28, 435-442, 2004.
- [18] Özen T., Antioxidant Activity of Wild Edible Plants in The Black Sea Region of Turkey, *Grasas y Aceites*, 61 (1), 86-94, 2010.
- [19] Ceyhun A.B., Şentürk M., Yerlikaya E., Erdoğan O., Küfrevioğlu Ö.İ., Ekinci D., Purification and Characterization of Carbonic Anhydrase from The Teleost Fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass) Liver and Toxicological Effects of Metals on Enzyme Activity, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 69-74, 2011.
- [20] Güngör K., Çağla Badem (*Prunus dulcis*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 2008.
- [21] Gao Z.J., Liu J.B., Xiao X.G., Purification and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Leaves of *Cleome gynandra* L., *Food Chemistry*, 129, 1012-1018, 2011.
- [22] Yang C.P., Fujita S., Ashrafuzzaman M.D., Nakamura N., Hayashi N., Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Pulp, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2732-2735, 2000.
- [23] Aydemir T., Selected Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Extracted from *Rosmarinus Officinalis* L., *International Journal of Food Properties*, 13 (3), 475-485, 2010.
- [24] Gao Z.J., Han X.H., Xiao X.G., Purification and Characterisation of Polyphenol Oxidase from Red Swiss Chard (*Beta vulgaris subsp. cicla*) Leaves, *Food Chemistry*, 117, 342-348, 2009.

