

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CEVİZ (*JUGLANS REGIA*) YAPRAK, İÇ ve KABUĞUNDAN
ELDE EDİLEN EKSTRATLARIN TİROSİNAZ ENZİMİ
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MUSTAFA AKIN

Anabilim Dalı: Kimya

Danışman: Yrd. Doç. Dr. NESLİHAN ŞAKİ

KOCAELİ, 2012

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CEVİZ (*JUGLANS REGIA*) YAPRAK, İÇ VE KABUĞUNDAN
ELDE EDİLEN EKSTRATLARIN TİROSİNAZ ENZİMİ
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mustafa AKIN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 02 OCAK 2012

Tezin Savunulduğu Tarih: 16 OCAK 2012

**Tez Danışmanı
Yrd.Doç.Dr. Neslihan ŞAKİ**

(...Neslihan Şakî...)

**Üye
Doç.Dr. Asgar KAYAN**

(...Asgar Kayan...)

**Üye
Yrd.Doç.Dr. Gülnur ARABACI**

(...Gülnur Arabacı...)

KOCAELİ, 2012

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışmada ceviz yaprak, iç ve kabuğundan polifenol ekstraksiyonu yapılarak tirozinaz enziminin kinetik özellikleri incelenmiş ve enzim üzerine ekstratların inhibisyon etkilerine bakılmıştır. Elde edilen ekstratların ekstraksiyon süresinin ekstrakte edilen polifenol miktarına etkileri incelenmiştir.

Çalışmamızda bitki ekstratlarının hazırlanışı ve inhibisyon etkilerinin belirlenme yöntemleri materyal ve metot kısmında açıklanmıştır. Elde edilen sonuçlar ise bulgular ve tartışma kısmında açıklanmıştır.

Yüksek lisans çalışmalarım esnasında göstermiş olduğu yakın ilgi ve yardımlarından dolayı danışmanım Yrd. Doç. Dr. Neslihan ŞAKI'ye ve çalışmalarımda bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Gülnur ARABACI'ya, yüksek lisansım boyunca bana destek veren ve hep yanımda olan birtanem Sermin'e, TARIMSAN TARIM SAN. ve TİC. A.Ş de patronum Sayın Mehmet ARSLANOĞLU'na, benden desteğini esirgemeyen arkadaşım Ümmü Gülsüm YILMAZ'a, sevgili tez arkadaşım Sevgi NALBANTOĞLU'na, beni büyütüp bu günlere getiren canım annem ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
SİMGELER	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. Enzimler.....	2
2.1.1. Enzimlerin yapısı.....	2
2.1.2. Enzim reaksiyonlarının mekanizması ve etki biçimi.....	3
2.1.3. Enzimlerin adlandırılması.....	4
2.1.4. Enzimlerin sınıflandırılması	5
2.1.4.1. Oksidoredüktazlar	5
2.1.4.2. Transferazlar.....	5
2.1.4.3. Hidrolazlar.....	5
2.1.4.4. Liyazlar	5
2.1.4.5. İzomerazlar	5
2.1.4.6. Ligazlar	6
2.1.5. Enzim kinetiği ve Michaelis-Menten eşitliği.....	6
2.1.5.1. Reaksiyon basamakları.....	8
2.1.5.2. Enzimatik reaksiyon hızını etkileyen faktörler	9
2.1.5.3. İzoenzimler	11
2.1.5.4. Proenzimler.....	11
2.1.5.5. Allosterik Enzimler	11
2.2. Tirosinaz	12
2.2.1. Enzim hakkında genel bilgi	12
2.3. Enzim İnhibitörleri	19
2.3.1. Enzimatik inhibisyon	19
2.3.2. Geri dönüşümlü inhibitörler	19
2.3.2.1. Kompetitif (yarışmalı) inhibisyon.....	20
2.3.2.2. Unkompetitif (yarışmasız) inhibisyon.....	21
2.3.2.3. Nonkompetitif inhibisyon	21
2.3.3. Geri dönüşümsüz inhibitörler	22
2.3.4. Tirosinaz enzim inhibitörleri.....	23
2.4. Tirozinaz Enziminin Uygulama Alanları	25
2.5. Antioksidan Maddeler	26
2.5.1. Antioksidan maddelerin işlevi	26
2.6. Ceviz	27
3. MALZEME VE YÖNTEM	31
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	31
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	31
3.1.2. Kullanılan cihazlar	31
3.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	32
3.3. Deneysel Yöntem	33
3.3.1. Ceviz ekstratlarının hazırlanması	33

3.3.1.1. Ceviz yaprağı, içi ve kabuğundan örnek hazırlama	33
3.3.2. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi belirlenmesi	33
3.3.3. Değişen L-Dopa konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi	34
3.3.4. Değişen Kojik asit konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi	34
3.3.5. Cevizin ekstratlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri	35
3.3.5.1. Yaprak ekstratının aktivite üzerine etkisi	35
3.3.5.2. İ ekstratının aktivite üzerine etkisi	35
3.3.5.3. Kabuk ekstratının aktivite üzerine etkisi	36
4. BULGULAR VE TARTIşMA	37
4.1. Değişen L-Dopa Konsantrasyonunun Aktivite zerine Etkisi	37
4.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Belirlenmesi	38
4.3. Kojik Asitin Trosinaz Enzim Aktivitesi zerine Etkisi	39
4.4. Ceviz Yaprak Ekstratının Tirozinaz Enzimi zerine İnhibisyon Etkisi	41
4.5. Ceviz İçi Ekstratının Tirozinaz Enzimi zerine İnhibisyon Etkisi	43
4.6. Ceviz Kabuğu Ekstratının Tirozinaz Enzimi zerine İnhibisyon Etkisi	45
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	52
ZGEMİş	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1: Anahtar-Kilit modeli	3
Şekil 2. 2: Michaelis- Menten grafiği	7
Şekil 2. 3: Lineweaver- Burk grafiği	8
Şekil 2. 4: Sıfırıncı ve birinci dereceden reaksiyonlar	8
Şekil 2. 5: Enzim reaksiyonunun hızı üzerine ısı etkisi	9
Şekil 2. 6: Enzim reaksiyonunun hızı üzerine pH etkisi	10
Şekil 2. 7: Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	10
Şekil 2. 8: Streptomyces castaneoglobisporus kaynaklı tirozinazın, bir caddy proteini olan ORF378 ile kompleks oluşturmuş yapısı. Tirozinaz kırmızı, ORF378 mavi, bakır atomları yeşil renkte gösterilmektedir	12
Şekil 2. 9: Binükleer bakır uçlarının şematik gösterimi. C = bakır iyonu, O = Oksijen, H = Histidin	15
Şekil 2. 10: Tirozinazın monofenolaz ve difenolaz aktivitesi	16
Şekil 2. 11: Mantar tirozinazının monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri. M: monofenol, D: difenol, Q: kuinon	17
Şekil 2. 12: Melanin biyosentezinin şematik gösterimi	18
Şekil 2. 13: Geri dönüşümlü inhibitörlerin eylem mekanizması. E, S, I ve P sırasıyla enzim, substrat, inhibitör ve ürün. ES, enzim substrat kompleksi, EI ve ESI sırasıyla enzim-inhibitör ve enzim-substrat-inhibitör kompleksleri	19
Şekil 2. 14: Kompetitif inhibitörlerin eylem mekanizması	20
Şekil 2. 15: (a) Kompetitif ve (b) Unkompetitif inhibisyon çeşitleri.....	20
Şekil 2. 16: Unkompetitif inhibitörlerin eylem mekanizması	21
Şekil 2. 17: Nonkompetitif inhibisyon çeşidi.....	22
Şekil 2. 18: Geri dönüşümsüz inhibitörlerin reaksiyon mekanizması. E ve E _i sırasıyla enzim, inaktif enzim. S, I ve P sırasıyla substrat, inhibitör ve ürün. ES, EI ve ESI ara ürünler	22
Şekil 2. 19: Bazı tirozinaz inhibitörlerinin inhibitör aktivitelerinin mantar tirozinazının standart inhibitörü olan kojik asitin inhibitör aktivitesiyle kıyaslanması	24
Şekil 2. 20: Geri dönüşümsüz tirozinaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları	25
Şekil 2. 21: Ceviz ağacı ve meyvesi.....	27
Şekil 2. 22: Ceviz bitkisi kültüründe 320 nm de kaydedilen HPLC kromotogram	29
Şekil 2. 23: 10 farklı ceviz kültüründe ceviz çekirdeğinde (mg/100g çekirdek) bulunan fenolik bileşikler	29
Şekil 2. 24: Ceviz çekirdeğinden saflaştırılan fenolik bileşikler.	30
Şekil 4. 1: L-Dopa substratına karşı V (hız) grafiği.	37
Şekil 4. 2: L-Dopa substratı için Lineweaver-Burk grafiği	37
Şekil 4. 3: Farklı ekstraksiyon sürelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesine etkileri.....	38
Şekil 4. 4: Değişik konsantrasyonlardaki Kojik asitin Tirozinaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi.....	39
Şekil 4. 5: Kojik asit için % Aktivite-[I] grafiği.	40
Şekil 4. 6: Kojik asit için Lineweaver-Burk grafiği.	40
Şekil 4. 7: Değişik konsantrasyonlardaki ceviz yaprağı ekstratının tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi	41

Şekil 4. 8: Yaprak ekstratı için % Aktivite-[I] grafiği.....	42
Şekil 4. 9: Ceviz yaprağı ekstratı için Lineweaver-Burk grafiği.	42
Şekil 4. 10: Değişik konsantrasyonlardaki ceviz içi ekstratının tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi	43
Şekil 4. 11: Ceviz içi ekstratı % Aktivite-[I] grafiği.	44
Şekil 4. 12: Ceviz içi ekstratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	44
Şekil 4. 13: Değişik konsantrasyonlardaki ceviz kabuğu ekstratının tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi	45
Şekil 4. 14: Ceviz kabuğu ekstratı & Aktivite-[I] grafiği.....	46
Şekil 4. 15: Ceviz kabuğu ekstratı için Lineweaver-Burk grafiği.....	47

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 4. 1: Ceviz yaprağı, içi ve kabuğu ekstratlarının DPPH serbest radikali giderimi aktivitesi.	38
Tablo 4. 2: Değişşen Kojik asit konsantrasyonuna bağlı olarak % İnhibisyon. ...	39
Tablo 4. 3: Değişşen ceviz yaprağı ekstratı konsantrasyonuna bağlı olarak % inhibisyon.....	41
Tablo 4. 4: Değişşen ceviz içi ekstratı konsantrasyonuna bağlı olarak % İnhibisyon.	43
Tablo 4. 5: Değişşen ceviz kabuğu ekstratı konsantrasyonuna bağlı olarak % İnhibisyon.	45

SİMGELER

°C	:Santigrad derece sıcaklığı
Dk	:Dakika
g	:Gram
L	:Litre
Mg	:Miligram
mL	:Mililitre
µL	:Mikrolitre
mM	:Milimolar

Kısaltmalar

C.Y	:Ceviz yaprağı
C.İ	:Ceviz içi
C.K	:Ceviz kabuğu
DPPH	:2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
E	:Enzim
ES	:Enzim substrat kompleksi
ESI	:Enzim substrat inhibitör kompleksi
I	:İnhibitör
IC ₅₀	:Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu.
Kons	:Konsantrasyon
S	:Substrat

**CEVİZ (*JUGLANS REGÍA*) YAPRAK, İÇ VE KABUĞUNDAN ELDE EDİLEN
EKSTRAKLARIN TİROSİNAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Mustafa AKIN

Anahtar Kelimeler: Enzim, Tirozinaz, İnhibisyon, Ceviz, *Juglans Regia*, Ekstraksiyon.

Özet: Bu çalışmada cevizin yaprak, iç ve kabuğundan elde edilen % 50'lik metanol ekstratlarının tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş ve ekstraksiyon sürelerinin DPPH serbest radikal aktivite giderimi üzerine etkileri belirlenmiştir. Standart substrat L-Dopa ve standart inhibitör Kojik asit kullanılarak enzimin kinetiği incelenmiştir. Standart inhibitör Kojik asit, ceviz yaprağı ekstratı, ceviz içi ekstratı ve ceviz kabuğu ekstratları için inhibisyon özellikleri belirlenerek IC₅₀ değerleri ve inhibisyon çeşitleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda ekstraksiyon süresinin artmasıyla ceviz yaprak ve kabuğunda serbest radikal aktivite gideriminin de arttığı, ceviz içinde ise etkili olmadığı tespit edilmiştir. Ekstratların inhibisyon kinetiği incelendiğinde ekstratların enzim üzerine inhibisyon etkisi gösterdikleri ve bu etkinin ceviz yaprağı ekstratında en fazla olduğu tespit edilmiştir.

INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECTS OF WALNUT'S (*JUGLANS REGIA*) LEAF, KERNEL AND SHELL OF EXTRACTS ON TYROSINASE ENZYME

Mustafa AKIN

Keywords: Enzyme, Tyrosinase, Inhibition, Walnut, *Juglans Regia*, Extraction.

Abstract: In this study, 50 % methanol extracts of leaf, kernel and shell of walnut was investigated effects of inhibition on tyrosinase enzyme and the effects of extraction periods on DPPH free radical activity inhibition was determined. The enzyme activity of standart substrate L-Dopa and standart inhibitor Kojic acid was analysed. The inhibition characteristics and IC_{50} values of standart inhibitor Kojic acid, walnut's leaf, kernel and shell extracts were determined and inhibition types were concluded. As a result of this study, with the increasing extraction periods the free radical activity inhibition ability on walnut's leaf and shell were increased but no increase was observed on kernel extract. From the inhibition kinetics of extracts, it was determined that there was an inhibition effects of extracts on enzyme activity and it was concluded that this effect was the most on the walnut's leaf extract.

1.GİRİŞ

Bildiğimiz gibi, günümüzün hızla gelişen teknolojisi günlük yaşantıda olduğukadar bilim dünyasında da kendini göstermektedir. Bu gelişime özellikle biyokimyasal alanda, enzimatik uygulamalarda rastlanmaktadır. Çünkü, enzimler biyokimyasal reaksiyonlarda biyolojik katalizör görevi gördüklerinden enzimlerin sıkça kullanımlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Özellikle meyve ve sebzelerin hasat sırasında, taşınırken ve depolama sırasında meydana gelen kararmalardan dolayı ticari değerlerinin düşmesi, melanin sentezinin artmasıyla hiperpigmentasyon oluşumuna bağlı cilt lekelerinin oluşumunda önemli bir role sahip olan tirozinaz enzimi ve inhibitörleri ticari ve klinik açıdan büyük öneme sahiptir.

Çalışmamızın ilk kısmında enzimler ve enzim kinetiği ile ilgili genel bilgilerle birlikte ceviz bitkisinin genel özelliklerinden bahsedilmektedir. İkinci kısımda yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan malzemelerin hazırlanışı ve yöntem anlatılmaktadır. Bulgular kısmında ise elde edilen verilere dayalı sonuçlar sunulmaktadır.

Ceviz yaprak, iç ve kabuğundan elde edilen ekstratların tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri incelenerek inhibisyon çeşitlerinin belirlenmesi çalışmamızın temelini oluşturmaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. Enzimler

Biyokimyasal reaksiyonların pek çoğu protein yapısındaki organik kimyasal maddeler tarafından katalize edilirler. Bu biyolojik katalizörlere enzim adı verilir. Bu terim ilk defa W. Künhe tarafından kullanılmıştır. İnsanlar tarihin çok eski zamanlarından beri şarap, ekmek ve yoğurt yapımında ayrıca kımız ve boya yapımında enzimatik reaksiyonlardan yararlanmışlardır.

İlk defa 1833 'lerde Payen ve Persoz, alkol kullanmak suretiyle malt ekstresinden nişastayı sindiren enzimi presipitasyon yolu ile ayırt etmiş ve buna Diyastaz adını vermişlerdir. 1836 'da da Schwan mide suyundan pepsin'i elde etmiştir (Bingöl, 1978).

2.1.1. Enzimlerin yapısı

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen protein yapısında maddelerdir. Bu proteinlerin karakteristiğini çok spesifik olmaları teşkil eder. Enzimlerin etki yaptıkları maddeler genellikle tek ve belirli bir maddedir. Bazen enzimler birbirlerine çok yakın özellikler gösteren maddelere de etki yapabilirler. Enzimin protein yapısı etki yapacağı maddeyi ve katalize edeceği reaksiyonun şeklini tayin eder. Pek az enzim mevcut protein yapıları ile etkili olurlar, çoğunlukla enzimlerin etkili hale geçebilmeleri için aktive edici bir ek maddeye ihtiyaçları vardır (Bingöl, 1978).

Enzimlerin bazıları basit proteinlerdir ve bunların katalitik etki gösteren kısmı doğrudan proteinin polipeptid zinciridir. Bazı enzimlerin de katalitik etki gösterebilmeleri için proteinden başka metal iyonuna ya da protein olmayan organik bir bileşiğe veya her ikisine de ihtiyacı vardır. Organik bileşik enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmiş ve dissosiyeye olmuyorsa prostetik grup, dissosiyeye olabiliyorsa koenzim adını alır. Enzimlerin protein kısmına Apoenzim adı verilir. Her ikisine birden Haloenzim denir. Bazı koenzimler ve prostetik gruplar ise, B grubu vitaminlerinden birini içerirler (Kaya, 1993).

Enzimin etki ettiği madde veya madde karışımına bu enzimin substratı denir. Koenzim ya da prostetik grup enzimin etki edeceği kimyasal reaksiyonu yani etki spesifitesini tayin eder. Apoenzim ise hangi substrata etki edeceğini, diğer bir değişle enzimin substrat spesifitesini tayin eder (Kaya, 1993).

2.1.2. Enzim reaksiyonlarının mekanizması ve etki biçimi

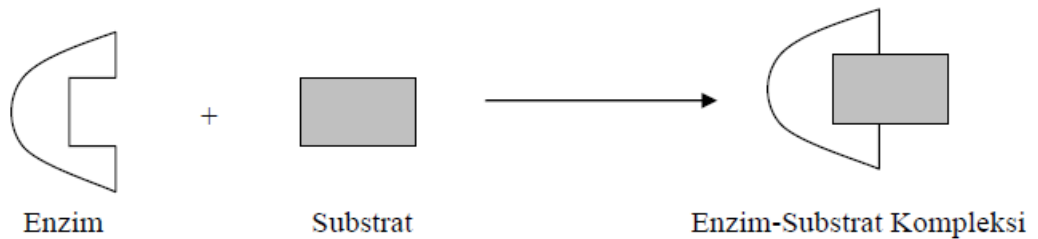
Enzimatik bir reaksiyonun ayırt edici özelliği, enzim üzerinde aktif merkez denen bir cep sınırları içinde meydana gelmesidir. Aktif merkez, enzim molekülü üzerinde, substrat bağlama özelliğine sahip özel bölgedir. Aktif merkez tarafından tutulan ve enzimin etki ettiği molekül, substrat olarak adlandırılır. Basit bir enzimatik reaksiyon şu şekilde gösterilebilir.



Burada E enzimi, S substratı, P ürünü ifade eder; ES enzim-substrat kompleksi, EP ise enzim-ürün kompleksidir. Enzim-substrat kompleksi, enzim etkisi için temeldir. Aktif merkez için, enzim substrat bağlanmasını açıklayan iki model ileri sürülmüştür:

1) Fisher'in anahtar-kilit modelinde, substrat ve enzimin aktif yerinin birbirine uyacak şekilde önceden belirlenmiş olduğu varsayılır.

2) Koshland'ın uyum oluşturma modeline göre ise aktif merkez esnek yapıdadır; substrat varlığında, proteinin tersiyer yapısında oluşan bir değişlikle, enzim substratını katalize uygun en doğru biçimde bağlayacak biçimsel bir değişlikle uğrar (Kaya, 1993).



şekil 2. 1: Anahtar-Kilit modeli (Kaya, 1993).

2.1.3. Enzimlerin adlandırılması

Başlangıçta enzimler gelişmiş güzel isimlendirilmişlerdir. Fakat daha sonraları enzimlerin sanıldığından daha fazla olmaları, karışıklığa neden olmuştur. Bunlar; pepsin, tripsin, kimotripsin ve diastaz gibi klasik isimlerdir.

Birçok enzim, substratlarının adına veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime veya sözcük grubuna "az" son eki ekleyerek adlandırılır. Üreaz, amilaz, arjinaz, proteaz ve lipaz, substratı tanımlayan; DNA polimeraz, laktat dehidrojenaz ve adenilat siklaz, tepkimeyi tanımlayan adlandırmalardır. Üreaz, ürenin hidrolizini katalize eden; DNA polimeraz ise DNA'nın sentezini katalize eden enzimdir.

Günümüzde enzimlerin isimlendirilmesinde iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Her enzim iki şekilde de isimlendirilebilir.

Pratik ve geleneksel isimlendirme:

Sistemik isimlendirmenin basitleştirilmiş bir şekli olup, en çok kullanılan isimlendirme biçimidir. Bu tip isimlendirmenin pratik olmasına rağmen bilimsel araştırmalar için yeterli olmaması, sistemik isimlendirmeyi zorunlu kılmıştır. Aynı zamanda yeni bulunan enzimlerin hızla artması nedeniyle 1965'te Uluslar arası Biyokimya Birliği (IUB: International Union of Biochemistry) tarafından sistemik isimlendirme yapılmış ve bütün dünya bilim çevrelerince kullanılması önerilmiştir (Kaya, 1993).

Sistemik isimlendirme:

Bu tür isimlendirme enzimin kataliz ettiği reaksiyonun özelliklerini belirgin şekilde tanımlamaktadır. Sistemik isimlendirmeye göre enzimler altı ana sınıfta toplanmıştır. Bu her ana sınıfın 4-13 arasında değişen alt sınıfları veya kod numaraları vardır (Kaya, 1993).

2.1.4. Enzimlerin sınıflandırılması

2.1.4.1. Oksidoredüktazlar

Biyolojik oksido-redüksiyon reaksiyonlarını kataliz eden enzimlerdir. NADH, NADPH, FADH₂, FMNH₂ koenzimlerini bulundurlar. Ayrıca şu enzim gruplarını içerirler:

Dehidrogenazlar: Uygun bir hidrojen alıcı eşliğinde substrattan hidrojen atomlarını alan enzimlerdir.

Sitokromlar : Elektronları bir maddeden diğerine aktarırlar. Sitokrom-a, Sit-b, Sit-c ve oksidazlar grubundan olan sitokrom oksidaz ile birlikte, sitokrom sistemini oluştururlar ve hücrelerin mitokondri kısmında bulunur. Bu sitokromlar, kinonlu ve flavin nükleotidli enzimlerden aldıkları elektronları sitokrom oksidazlara aktarırlar.

Oksidazlar : Serbest oksijen eşliğinde substratın oksidayonunu sağlarlar.

2.1.4.2. Transferazlar

Aldehit, keton, açil, azot, fosfat ve kükürt içeren grupların bir bileşikten diğerine aktarılmasını katalize eden enzimlerdir. Transaminazlar bu gruba en iyi örnektir.

2.1.4.3. Hidrolazlar

Substratın çeşidine göre ester, eter, peptid v.s.bağlar üzerine hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler. Disakkarazlar, lipazlar bu gruba örnek verilebilir.

2.1.4.4. Liyazlar

Çift bağ oluşumu ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar bu grubun örnekleridir.

2.1.4.5. İzomerazlar

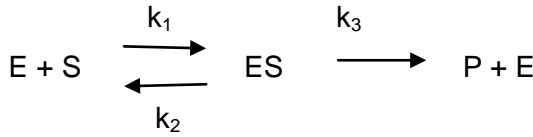
İzomerizasyon reaksiyonlarını katalize ederler.

2.1.4.6. Ligazlar

ATP yıkımıyla oluşan enerjiden faydalanarak 2 molekülün birleşmesini katalize eden enzimlerdir.

2.1.5. Enzim kinetiği ve Michaelis-Menten eşitliği

Kimyasal kinetik, kimyasal bir reaksiyonun hızını ve mekanizmasını inceleme anlamına gelir. Bir kinetik analizin esas amacı, kimyasal reaksiyonun nasıl ve ne gibi bir hızla oluştuğunu anlamaktır. Yani substratların ürüne dönüşümünde izlenen yolun ve hızın bilinmesidir. 1913 yılında Leonar Michaelis ve Menten, enzimlerin kinetik özelliklerini açıklamak için basit bir model ileri sürmüşlerdir. Bu modele göre; bir çok enzimin kinetik özellikleri en basit biçimde;



formülü ile ifade edilebilir. Bu formüle göre;

$$[ES] = k_1[E].[S] \quad (1.1)$$

$$[ES] = k_3[ES] + k_2 [ES] \quad (1.1a)$$

$$k_1[E].[S] = (k_2 + k_3) . [ES] \quad (1.1b)$$

Toplam enzim konsantrasyonu;

$$[E].[S] / [ES] = (k_2 + k_3) / k_1 \quad (1.1c)$$

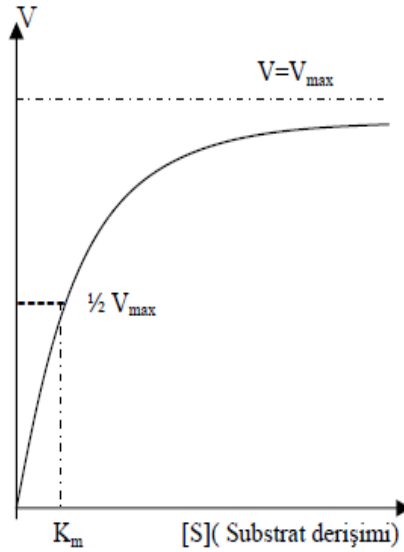
Bir enzimatik reaksiyonun hızı, enzim etkisiyle zaman birimi başına (1 dakikada veya 1 saniyede) oluşan ürünün veya ürüne dönüşen substratın miktarına göre ifade edilir. Bir enzimin bir doku ekstratı veya biyolojik bir sıvı içindeki miktarını ölçmek için, örnek içinde bulunan enzimin katalize ettiği tepkimenin hızı ölçülür. Ölçülen hız, var olan aktif enzimin miktarıyla doğru orantılıdır.

Ancak birçok enzimin saf örnekleri olmadığından veya miktarlarını saptamak zor olduğundan bu enzimlerin miktarları yerine aktivite ünitesi kullanılır; çeşitli enzimatik

reaksiyonların hızlarının farklı olması, ilgili enzimlerin aktivitelerinin veya etkinliklerinin farklı olmasıyla açıklanır.

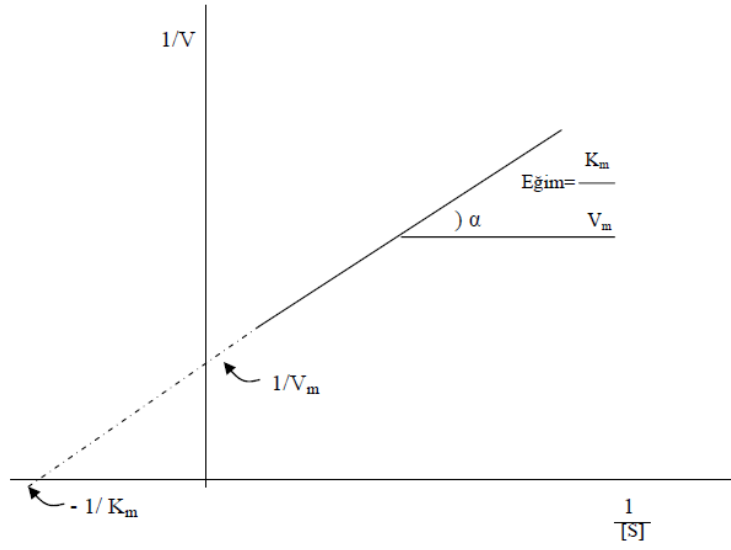
Enzim konsantrasyonu ve diğer bütün şartların sabit olduğu bir ortamda çok düşük bir substrat konsantrasyonunda, enzim moleküllerinin çoğu serbest kalır, ES kompleksi az miktarda oluşur ve dolayısıyla ürüne dönüşen substrat miktarı veya reaksiyonun hızı küçüktür. Substrat konsantrasyonunun belirli artışları ile enzim moleküllerinin yarısı serbest kalırken diğer yarısı ES kompleksini oluşturur. Bu kompleksin oluştuğu noktada yarı maksimal hız ($1/2 V_{max}$) noktasına ulaşılır. Substrat konsantrasyonunun belirli artışlarının devamında enzim moleküllerinin tümünün ES kompleksi oluşturduğu bir noktada reaksiyon hızı maksimumdur (V_{max}) ve bu noktadan sonra substrat konsantrasyonunun artışı ile reaksiyon hızı artmaz:

K_m ise Michaelis-Menten sabiti olarak adlandırılır ve $1/2 V_{max}$ daki substrat konsantrasyonunu ifade eder. (Şekil 2.2)



Şekil 2. 2: Michaelis- Menten grafiği (Bingöl, 1978).

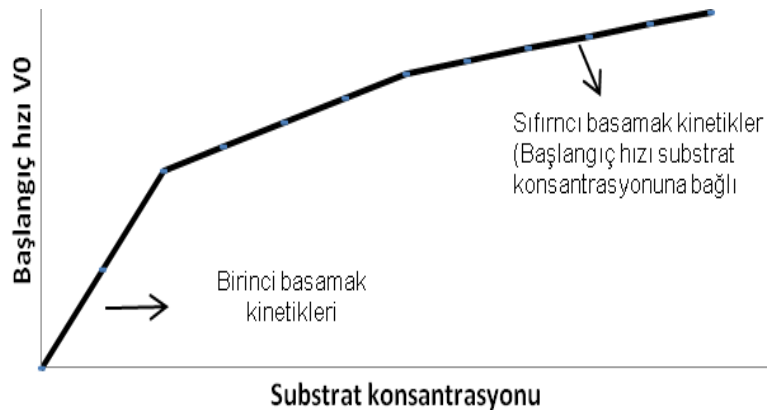
Her enzime özgü karakteristik bir K_m değeri vardır. Michaelis-Menten denkleminin kullanıldığı bir hiperbolik egride, ilgili enzime ait V_{max} ve K_m değerlerini hesaplayabilmek için, grafiği doğrusal olan Lineweaver–Burk denklemi önerilmiştir(Gilbert, 2003).(Şekil 2.3)



Şekil 2. 3: Lineweaver- Burk grafiği (Lineweaver and Burk, 1934).

2.1.5.1. Reaksiyon basamakları

Sabit ısıda herhangi bir reaksiyonun hızı mevcut substratların konsantrasyonuna göre ifade edilir. Reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna bağlılık derecesine bu reaksiyonun kinetik basamağı denir. Bu tanımlamaya göre bütün reaksiyonlar sıfıncı basamak, birinci basamak ve ikinci basamak olarak adlandırılırlar (Kaya, 1993)

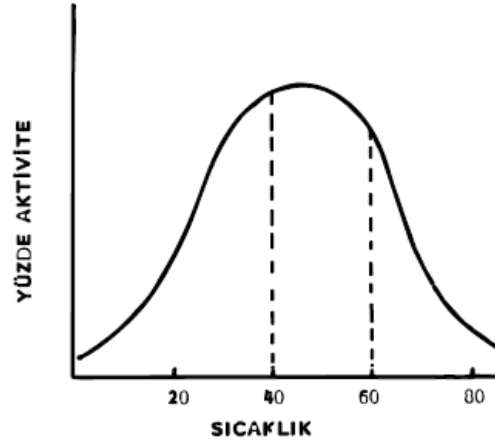


Şekil 2. 4: Sıfıncı ve birinci dereceden reaksiyonlar (Kaya, 1993).

2.1.5.2. Enzimatik reaksiyon hızını etkileyen faktörler

Isı etkisi :

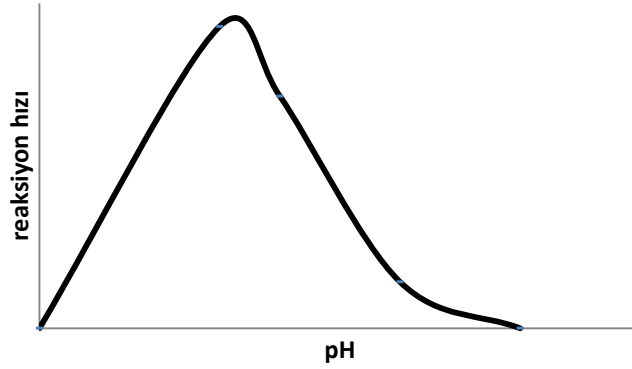
Her enzim için en iyi çalıştığı bir sıcaklık derecesi vardır. Buna o enzimin optimum sıcaklık derecesi denir. Bu derecenin üzerinde enzimler, 3 boyutlu yapılarını kaybederek denatüre olurlar ve reaksiyon hızları düşer. Bu sıcaklıkta reaksiyon hızı oda sıcaklığındakine oranla 4 kez daha fazladır. Hayvansal enzimlerin çoğunun optimum sıcaklığı 40-50° C arasındadır. Bitkisel kaynaklı enzimlerin ise 50-60° C arasındadır (Şekil 2.5)



Şekil 2. 5: Enzim reaksiyonunun hızı üzerine ısı etkisi (Kaya, 1993).

pH etkisi :

Her enzimin en iyi çalıştığı belli bir pH derecesi vardır. Bu pH'nın altında ve üstünde reaksiyon hızı düşer ve değişik pH'lar enzimi denatüre eder. pH derecesi sıcaklık ve substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişir (Şekil 2.6)



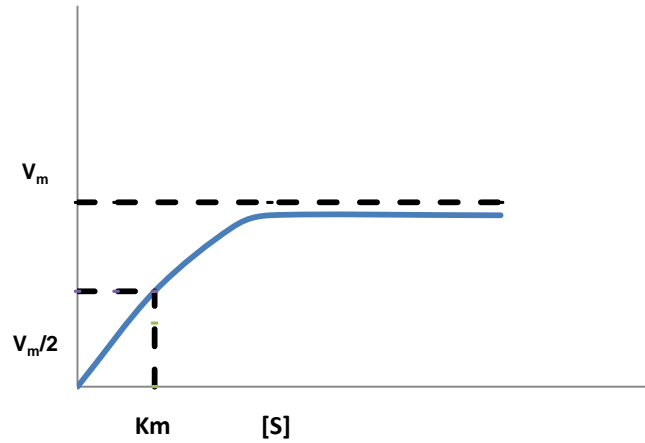
Şekil 2. 6: Enzim reaksiyonunun hızı üzerine pH etkisi (Kaya, 1993)

Enzim konsantrasyonunun etkisi :

Substrat konsantrasyonu sabit tutularak, enzim konsantrasyonu artırıldığında reaksiyon hızı da orantılı olarak artar. Çünkü her enzim molekülü birbirinden bağımsız olarak iş görür. Fakat deneysel olarak bu lineer artışı elde etmek mümkün olmayabilir. Çünkü enzimler dissosiyasyon olabilen inhibitörler ve aktivatörler içerirler ve düşük konsantrasyonlarda enzim dayanıksızdır.

Substrat konsantrasyonunun etkisi :

Sabit enzim konsantrasyonunda, enzimatik reaksiyonun hızı belirli bir noktaya kadar substrat konsantrasyonu ile artar. Hız maksimuma ulaştıktan sonra substrat konsantrasyonunun artması reaksiyon hızını değiştirmez (Şekil 2.7).



Şekil 2. 7: Enzimatik reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.

Inhibitörlerin etkisi :

Enzimatik reaksiyonların hızını azaltan veya yok eden maddelere inhibitörler denir. Inhibitörlerin bu etkisi de inhibisyon olarak tanımlanır.

2.1.5.3. İzoenzimler

Birden fazla molekül şeklinde bulunan enzimlere izoenzim denir. İzoenzimler aynı tür ve dokularda, hatta aynı hücrelerde oluşurlar. Aynı kimyasal reaksiyonu katalize ettikleri halde kinetik özellikleri, aminoasit bileşimleri ve hatta dizileri bakımından farklılık gösterirler. Aynı zamanda izoenzimlerin fiziksel, kimyasal ve immunolojik özellikler bakımından belirgin farklılıkları vardır.

2.1.5.4. Proenzimler

Bir enzimin inaktif öncülüne zimojen denir. Proteolitik enzimler veya kanın pıhtılaşmasını sağlayan enzimler proenzim denilen inaktif bir halde salgılanırlar. Propepsin, pretripsin ve prekimotripsin gibi. Pepsinojen, tripsinojen ve kimotripsinojen olarak ta bilinen bu enzimler pepsin, tripsin ve kimotripsin ön maddeleridir. Proenzimler salgılandıktan sonra prepepsin de olduğu gibi ya kendi kendilerini aktive ederler veya H^+ iyonlarının etkisiyle aktifleşirler.

2.1.5.5. Allosterik Enzimler

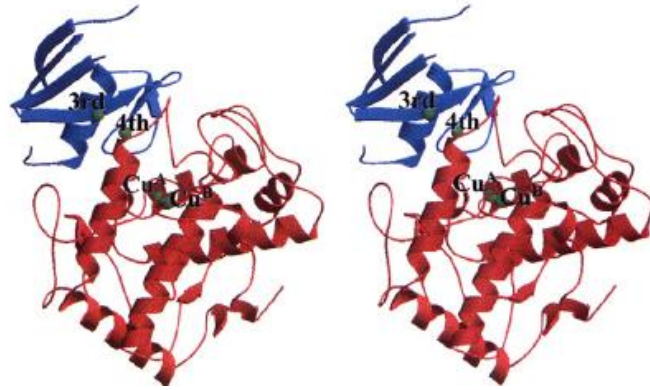
Allosterik enzimler diye tanımlanan bir grup enzim diğerlerinden farklı bir kinetik gösterirler. Bu enzimlerin aktivitesi allosterik etkenler (efektörler) diye bilinen maddeler tarafından azaltılabilir veya arttırılabilir. Her allosterik enzime kendi etkenleri etki eder. Allosterik (diğer bölge) adı şunu kasteder: Etkenler, substrat bağlama bölgeleri dışında enzime bağlanmak suretiyle aktif bölgede meydana gelecek değişiklikleri etkilerler.

Çok enzimli sistemlerin çoğunda dizinin ilk enzimi allosterik enzimdir. Bu enzim en yavaş veya hızı sınırlayan reaksiyon basamağını kataliz eder. Bu şekilde her metabolik dizinin hızı hücre içi enerji istemini değiştirmek ve hücrenin büyüme ile onarım için gerekli yapı taşı moleküllerini değiştirmek için her saniye sürekli olarak programlanır.

2.2. Tirosinaz

2.2.1. Enzim hakkında genel bilgi

Tirosinazlar (monofenol, o-difenol: oksijen oksidoredüktaz EC 1.14.18.1) proteinlerin büyük bir grubu olan tip-3 bakır proteinleri grubuna aittir. Bitkilerden elde edilen katekoloksidazlar, eklem bacaklılar ve yumuşakçalardan elde edilen oksijen taşıyıcı hoemosiyaninleri içerirler (Halaouli ve diğ.,2006).



Şekil 2. 8: Streptomyces castaneoglobisporus kaynaklı tirosinazın, bir caddy proteini olan ORF378 ile kompleks oluşturmuş yapısı. Tirosinaz kırmızı, ORF378 mavi, bakır atomları yeşil renkte gösterilmektedir (Mayer, 2006)

Tirosinaz iki yarı oksidasyon reaksiyonunu katalizler. Birinci reaksiyonda tirosinaz dört farklı enzim yapısı oluşturarak (Edeoxy, Eoxy, Eoxy-M, Emet-D) monofenollerin oksidasyonunu oksijen kullanarak katalizler. İkinci reaksiyonda enzim altı farklı enzim yapısı oluşturarak (Edeoxy, Eoxy, Eoxy-D, Emet, Emet-D) o-difenollerin oksidasyonunu katalizler. İki reaksiyon sonucunda da oligomerlerle reaksiyon veren o-kinonlar oluşur (Kaya, 1993).

Tirosinaz enziminin aktif kısmı bakır iyon değerliğine ve moleküler oksijene bağlı olarak üç ara yapıda bulunabilmektedir: deoksi (Cu I-Cu I), oksisi (Cu II-O₂-Cu II), met (Cu II- Cu II) (Sanchez-Ferrer 1995) Met formu iki elektronun ortamdaki alınması ile deoksi forma dönüşür ve ortaya çıkan deoksi form moleküler oksijenle birlikte geri dönüşümlü oksisi formu oluşturur (Sanchez-Ferrer, 1995).

Tirosinazlar melanin biyosentezinin özellikle ilk basamağında L-tirosinin L-dopakinon ve L-dopakrom'a dönüşümünden sorumludurlar (Solver-Rivas ve diğ.,1999).

Tirosinazın özelliği, monofenollerin o-hidroksilasyon reaksiyonlarını ve o-difenollerin aktif o-kinonlara oksidasyon reaksiyonlarını katalizlemesidir. Bu iki reaksiyonda da moleküler oksijen kullanılır.

O-kinonlar çeşitli nükleofiller yardımıyla enzimatik olmayan reaksiyonlarda kullanılırlar ve bu reaksiyonlar koyu kahverengi pigmentlerle ilişkilendirilirler.

Tirosinaz memelilerde, omurgasızlarda, bitkilerde, mikroorganizmalarda bulunur ve bu yapılarda birçok biyolojik fonksiyona sahiptir(Solner-Rivas ve diğ.,1999).

Enzim ilk olarak memelilerde, melanomaların gelişimindeki rolleri ve albinizm, vitiligo gibi pigmentasyon sorununa bağlı hastalıklardaki etkisi sebebiyle karakterize edilmiştir. Mantarlarda ise temel olarak kahverengileşme ve pigmentasyonla ilişkilendirilmiştir(Van Gelder ve diğ.,1997).

Melaninler UV radyasyonuna, serbest radikallere, dehidratasyona ve aşırı sıcaklıklara karşı savunma ve direniş mekanizması teşkil ederler.

Mantar tirosinazı ilk olarak yenilebilir bir mantar olan *Agaricus bisporus*, Nakamura ve diğ. (1966), Robb ve diğ. (1981), Wichers ve diğ. (1996) 'dan saflaştırılmıştır. Çünkü ürünün gelişimi ve hasatı sırasında meydana gelen enzimatik kararma ürünün ticari değerini azaltmaktadır. *Neurospora crassa*, Kupper ve diğ.(1989), *Lentinula edodes*, Konda ve diğ. (1996), *Aspergillus oryzae* ve *Pycnoporus sanguineus*, Halaouli ve diğ. (2005), gibi diğer mantarlardan elde edilen enzim mantar tirosinaz biyokimyası ve karakteristiğine yeni bir anlayış getirmiştir.

Tirosinaz ile polifenoloksidaz arasındaki fark her zaman açık değildir, çünkü uygun şartlar altında polifenol oksidazlar da monofenolleri hidroksilleyebilmektedirler. Tirosinaz aktivitesi sonucu oluşan ürünler deri pigmentasyonu, bitkilerde ve mantarlarda koruyucu ve savunma mekanizmaları, bazı çiçeklerde pigmentler için öncüleri oluştururlar.

Öte yandan tirosinaz aktivitesi sonucu oluşan ürünler bitkilerde ve sebzelerde kararma reaksiyonları gibi zararlı etkilere de yol açarlar (Ikehata ve diğ.,2002).

Ticari mantar tirosinazı genellikle kararma önleyici ve cilt beyazlatıcı ajanların görüntülenmesi amacıyla doğal kaynaklardan ya da sentetik olarak elde edilir. Örneğin insan vücudundaki tirosinaz deri pigmentasyonunun azaltılmasındaki çalışmalarda kullanılır. Mantar tirosinazı ise karboksilatların, organik materyallerin, diğer protein ve enzimlerin varlığında tirosinaz aktivitesindeki farklılıkların belirlenmesinde kullanılır (Naidja ve diğ.,1998).

Enzimin aktif kısmının yapısında bakır molekülü iyi korunan altı ya da yedi histidine bağlıdır ve tek bir sistein ucu boştaadır. Enzim memelilerde, bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde evrensel bir dağılıma sahiptir. Enzimin bitkilerde ve özellikle mantarlarda biyolojik fonksiyonu hakkında çok fazla bilgi yoktur (Mayer, 2006).

Enzimin biyokimyasal yönü açıkça ortaya konmuştur. Özellikle bitki tirosinazı Yoruk ve diğ.,(2003) tarafından incelenmiştir. Lerch, (1995) ve Sanchez-Ferrer ve diğ. (1995) tarafından tirosinaz enziminin reaksiyon mekanizması geniş ölçüde ele alınarak enzimin melanogenesis çevrimindeki önemi vurgulanmıştır.

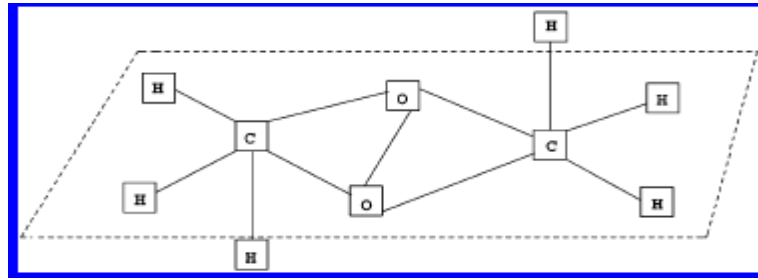
Mantar tirosinazı birçok kinetik verinin oluşturulmasında kullanılan ve en fazla çalışılan tirosinazdır. Fakat henüz kristalize edilemediğinden üç boyutlu yapısı bilinmemektedir. Karşılaştırmalı modelleme deneysel yapısı bulunmayan proteinlerin üç boyutlu yapılarını belirlemede kullanılan en yaygın metottur(Rescigno ve diğ.,2011).

Mantar kökenli tirosinazlar Laccases gibi bakır içeren diğer polifenoloksidazlarla karşılaştırıldıklarında önemli ölçüde heterojeniteye sahip olan sitozolik enzimlerdir. A. Bisporus tirosinazın ham carpophore ekstratından saflaştırılmasıyla ilgili yapılan çalışmalarda genellikle polimerik olan birden fazla form elde edilmiştir. 1963 yılında ise Bouchilloux ve arkadaşları belirgin molekül ağırlığına sahip birçok tirosinaz formunun varlığını preparatif elektroforez ve hidroksi apatit kromatografi kullanarak gün ışığına çıkarmışlardır(Halaouli ve diğ.,2006).

Mikroorganizmalarda, hayvanlarda, bitki ve böceklerde tirosinazın aktif ve aktif olmayan formları görülmektedir. Whitaker (1995) İn vivo tirosinazın yaşlanma, Burtan ve diğ. (1993), ağır çevre koşullarına maruz kalma ya da proteinlerin etkisi sonucu aktive olduğu saptanmıştır.

Jolivet ve diğ. (1998), günümüzde mantar kökenli enzim aktivasyon mekanizması açık değildir ve enzimatik konformasyonel değişimin veya basit bir protein çözünmesinin sonucu olduğu sanılmaktadır(Mayu ve Horel, 1979).

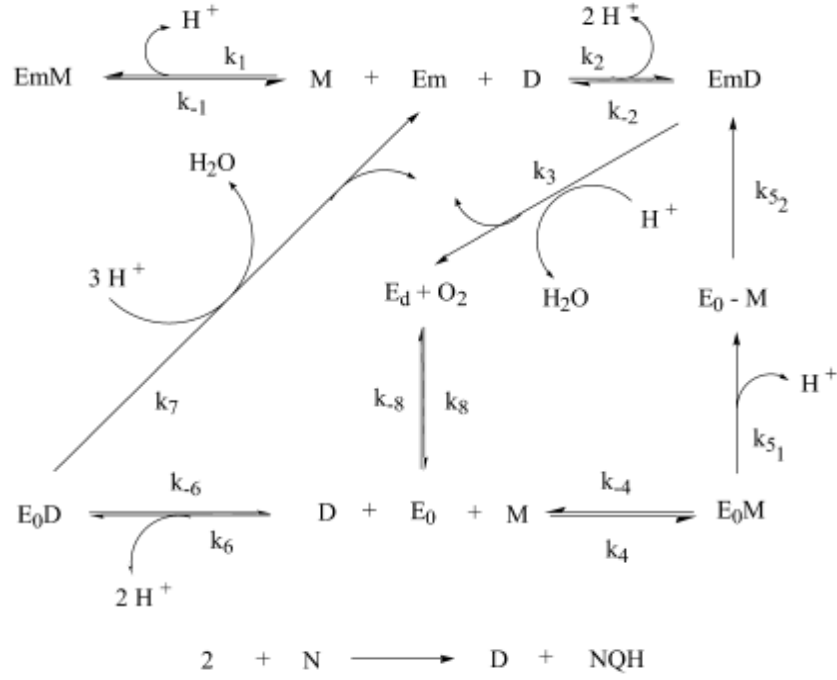
Bütün tirozinaz dizileri karşılaştırıldığında sadece bakır bağlayıcı kısım korunan etki alanı merkezi olarak görülmektedir, bakır içeren oksijenler hemolimflerden bir çok yumuşakça ve eklembacaklıya taşınır. Altı korunmuş histidin tirozinaz enziminin aktif kısmındaki bir çift bakır iyonuna bağlanarak moleküler oksijen ve fenolik substrat ile etkileşir (Seo ve diğ.,2003) (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9: Binükleer bakır uçlarının şematik gösterimi. C = bakır iyonu, O = Oksijen, H = Histidin(Van Gelder ve diğ.,1997).

Tirozinaz substratları enzim tarafından hidroksillenmiş ve kinonlanmış fenol ve katekollerin geniş bir yelpazesinden oluşmaktadır. Bütün tirozinazlar monofenoller üzerine etkidekilerinde tipik bir gecikme süresi gösterirler. Bu gecikme süresi difenol konsantrasyonuna göre sabit hıza ulaşmak için gerekli zaman olarak tanımlanır.

Tirozinaz substratları fenoller ve katekollerle sınırlı değildirler bir çok o-aminofenol ve aromatik o-diamin tirozinaz tarafından kinonlanabilmektedir. Monoaminlerin de enzim tarafından hidroksillendiği bilinmektedir(Recigno ve Sanjust, 2002).



Şekil 2. 10: Tirosinazın monofenolaz ve difenolaz aktivitesi (Espin ve diğ.,2000).

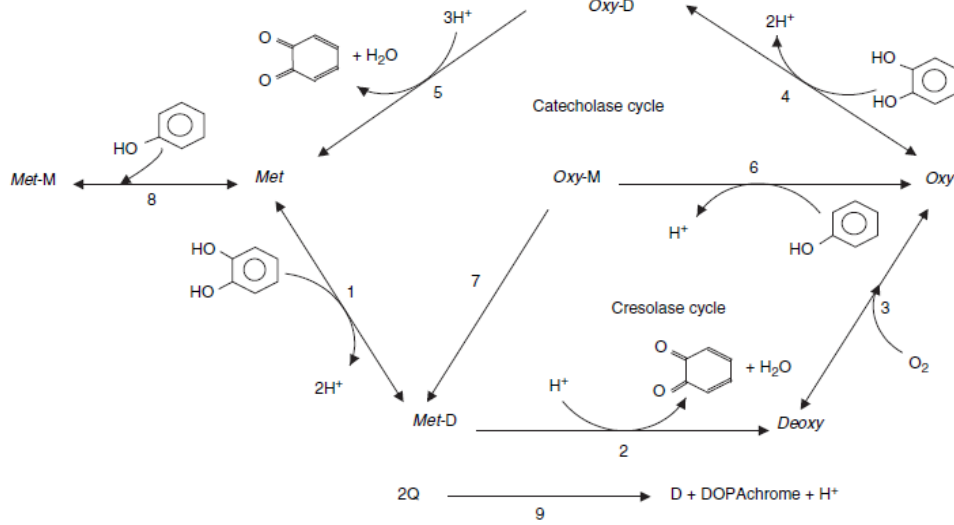
Tirosinaz enziminin bilinen endojen substratları L-tirosin, p-aminofenol ve bunların gulutamat, ç-glutaminil-4-hidroksibenzen(GHB) ile kondenzasyonu sonucu oluşan ürünlerdir.

o-kuinonik ürün gelişimine bağlı olarak tirosinaz substratları üç farklı gruba ayrılabilirler.

i) Benzen halkasına intramoleküler 1,4-katılmasını sürdürebilen dönüşümlü o-kinon ürünleri.

ii) Dönüşümsüz fakat su eklenmesiyle ilerleyebilen o-kinon ürünleri.

iii) Reaksiyon süresince yüksek stabiliteye sahip olan o-kinon ürünleri(Seo ve diğ. 2003).



Şekil 2. 11: Mantar tirozinazının monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri. M: monofenol, D: difenol, Q: kuinon(Cabanes ve diğ.,2002).

Tirosinaz ilk keşfedilen monooksijenaz olmasına rağmen kristal yapısı aydınlatılamamıştır. Tirosinazların aşağıdaki özellikleri dikkate alınarak, haemosiyanimler ve katekol oksidazların benzer binükleer bakır uçlarına sahip oldukları düşünülmektedir.

i) Oksijenle bağlanma prosesindeki konformasyonel değişiklikler ve karşılaştırılabilir değerlik(Woolery ve diğ.,1984).

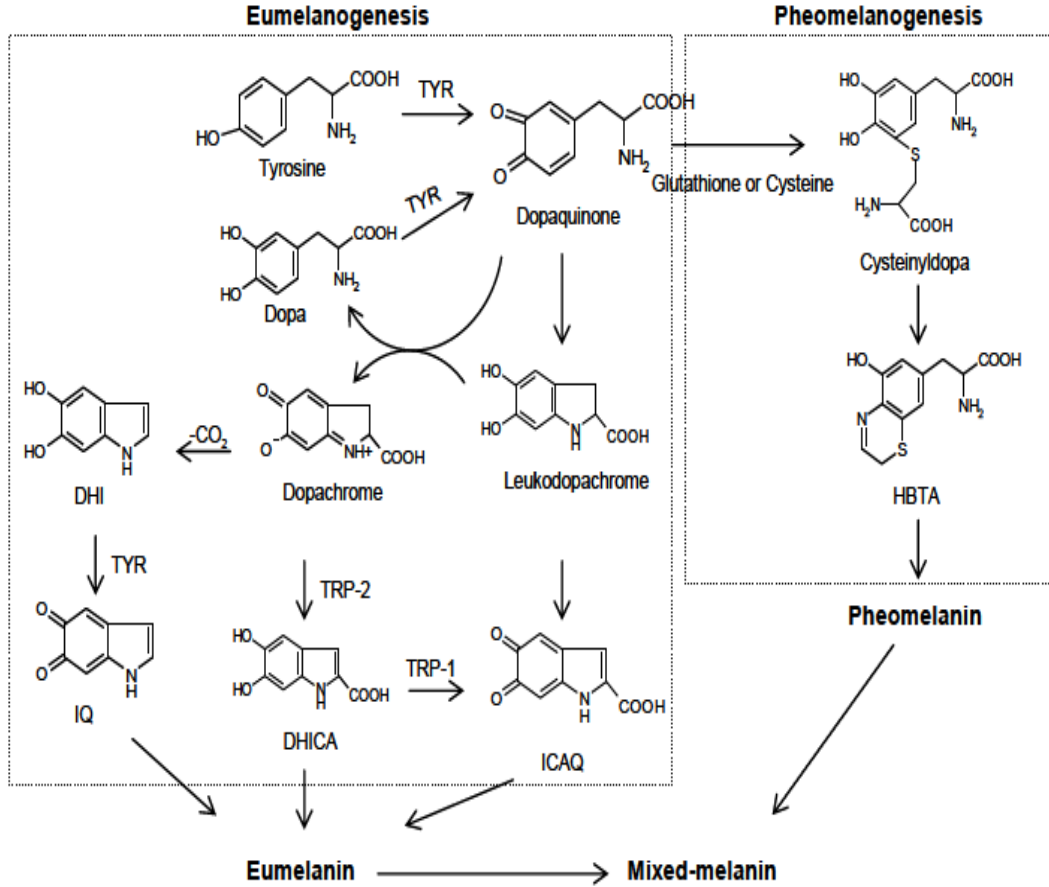
ii) Karşılaştırılabilir spektroskopik ve manyetik özellikler(Himmelwright ve diğ. 1980).

iii) Birincil dizi benzerlikleri (Van Gelder ve diğ.,1997).

Melanogenesis koyu makromolekül pigmentlerinin melanine formasyonuna yol açan proses olarak tanımlanır. Melanin enzimatik katalizlenmelerin ve kimyasal reaksiyonların kombinasyonu ile oluşur (Cooksey ve diğ.,1997).

Melanogenesis tirozinaz tarafından katalizlenen tirosinin dopakroma oksidasyonu ile başlar. Bu adım melanin sentezinde hız sınırlayıcıdır çünkü geri kalan reaksiyon dizisi fizyolojik bir pH değerinde kendiliğinden devam edebilir. Biyosentez mekanizması Şekil 2.12' de gösterilmiştir (Chang, 2009).

Bitki ve mantarlardaki kararma kavramsal olarak melanogenezise benzer ve oksidatif polimerizasyonla alkalıdır. Asıl farklılık ise allomelanin dopakinon türevleri içermez bunun yerine yapısındaki temel monomerler kinon yapıtaşlarıdır.



Şekil 2. 12: Melanin biyosentezinin şematik gösterimi (Schallreuter ve diğ.,2008).

Melanin güneşten gelen UV radyasyonunun zararlı etkilerinden cildi korumada önemli bir rol oynar. Esas olarak insan cildini foto koruyucu bir fonksiyonu olmasına rağmen, anormal miktarda melanin cildin bazı spesifik bölgelerinde daha fazla pigmentli parçalar oluşturur ve bu durum bir estetik sorun haline gelebilir. Enzimatik kararma bitki ve mantarlarda da istenmeyen bir durumdur . Özellikle mantarda hasat sırasında oluşur ve ürünün ticari değerini düşürür(Artes ve diğ.,1998).

Melanin biyosentezinin inhibisyonu kozmetik endüstrisinde de cilt beyazlatma ajanlarının kullanımının yüksek olması açısından oldukça önemlidir. Melanin sentezinin aşırı olması hiperpigmentasyon denilen ciltte lekelenmelerle sonuçlanan bir probleme neden olur.

Melanin biyosentezi inhibitörlerinden, kozmetik alanında beyazlatıcı ajanlar olarak bilinen kojik asit, hidrokinon, arbutin, ve azelaik asit yaygın olarak kullanılmaktadır. Prota (1996), Mora ve Baroldi (2000), bu inhibitörlerin yanı sıra son yıllarda özellikle polifenol içeriği zengin bitki kökenli inhibitörlerin kullanımı yaygınlaşmaktadır(Özer ve diğ.,2007).

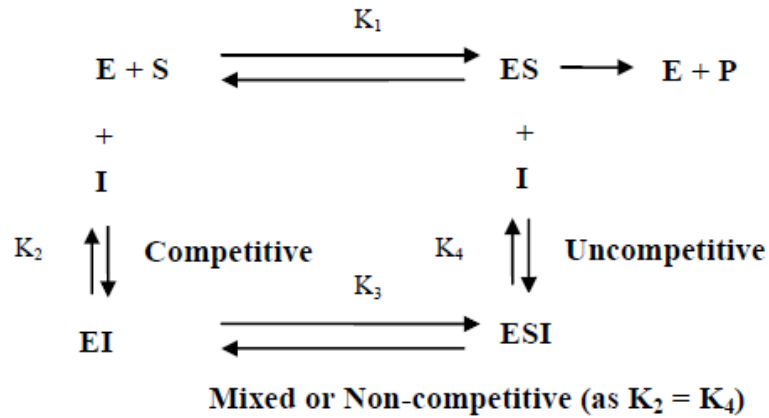
2.3. Enzim İnhibitörleri

2.3.1.Enzimatik inhibisyon

Bazı moleküller enzimlerle ilişki kurma yeteneğinde oldukları halde, substrat gibi hareket etmezler. Yani enzimler bunların yeni bir ürüne dönüşümünü sağlamazlar. Ancak bu birleşme nedeni ile enzimin kendisi de katalitik görevini yerine getiremez. Bu çeşit maddelere 'Enzim İnhibitörleri' denir. Enzim inhibitörleri ile inhibisyonu geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olabilir.

2.3.2. Geri dönüşümlü inhibitörler

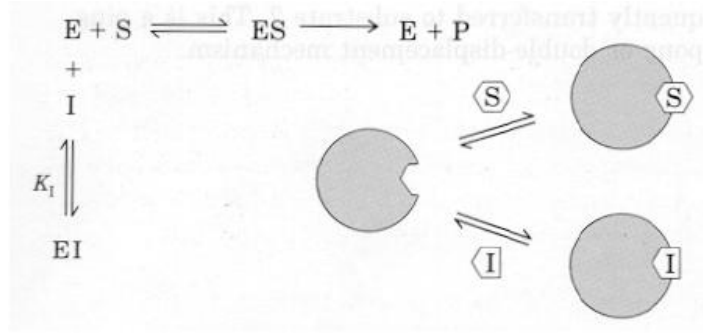
Bu gruptaki inhibitörler üç gruba ayrılırlar; kompetitif (yarışmalı) inhibitörler, unkompetitif (yarışmasız) inhibitörler ve nonkompetitif (sınırlı yarışmalı) inhibitörler.



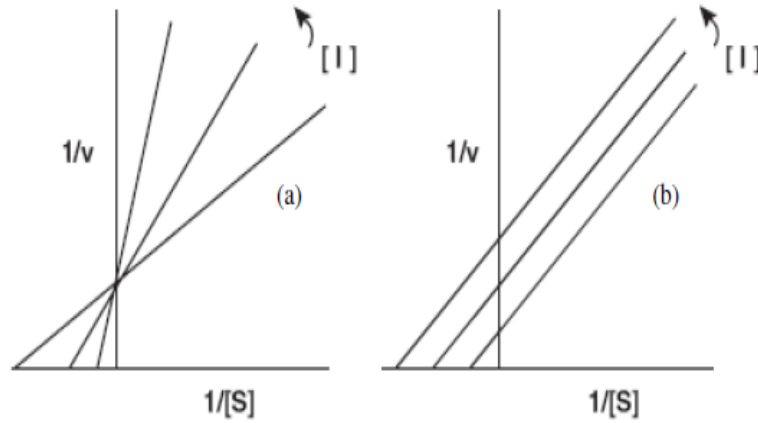
Şekil 2. 13: Geri dönüşümlü inhibitörlerin eylem mekanizması. E, S, I ve P sırasıyla enzim, substrat, inhibitör ve ürün. ES, enzim substrat kompleksi, EI ve ESI sırasıyla enzim-inhibitör ve enzim-substrat-inhibitör kompleksleri (Chang, 2009).

2.3.2.1. Kompetitif (yarışmalı) inhibisyon

Yarışmalı enzim inhibisyonudur; geri dönüşümlü enzim inhibisyonunun yaygın bir tipidir. Kompetitif enzim inhibisyonunda, inhibitör, enzimin aktif yeri için substrat ile yarışır. Enzimin aktif yerine inhibitör bağlanınca reaksiyon gerçekleşmez; inhibitör aktif yeri işgal ederken substratın enzime bağlanmasını önler. Kompetitif enzim inhibisyonunda inhibitör madde, enzimin substratına olan ilgisini azaltır; K_m değeri büyür. Kompetitif inhibitör, sıklıkla yapısal olarak substrata benzeyen ve substrat gibi, enzime reversibl bağlanma özelliği gösteren bir bileşiktir; EI kompleksi oluşturmak üzere enzim ile reversibl olarak birleşir: (Şekil 2.14).



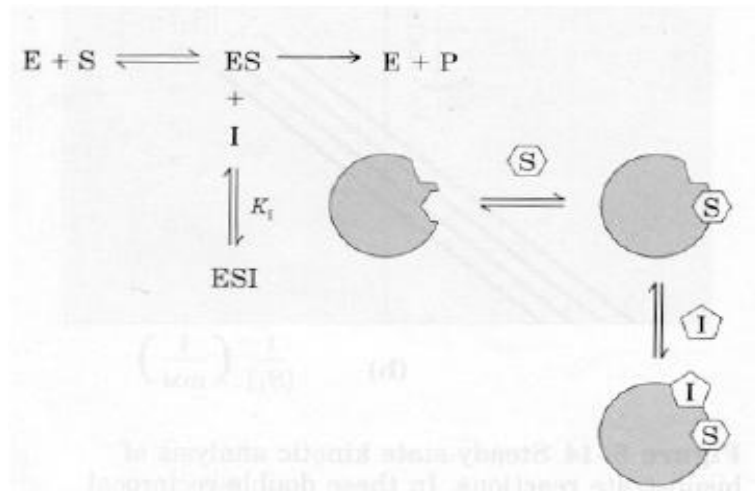
Şekil 2. 14: Kompetitif inhibitörlerin eylem mekanizması (Chang, 2009).



Şekil 2. 15: (a) Kompetitif ve (b) Unkompetitif inhibisyon çeşitleri.

2.3.2.2. Unkompetitif (yarışmasız) inhibisyon

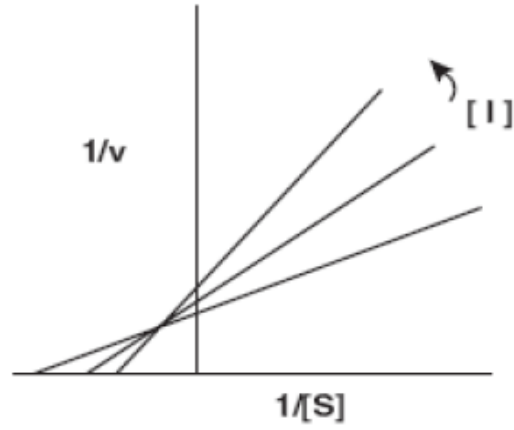
Bir enzime bir unkompetitif inhibitörün bağlanması sonucu meydana gelen enzim inhibisyonudur. Unkompetitif inhibitör, nonkompetitif inhibitör gibi, enzim üzerinde substratın bağlandığı aktif yerden ayrı bir yere geri dönüşümlü olarak bağlanır; fakat nonkompetitif inhibitör serbest enzime veya ES kompleksine bağlanabildiği halde unkompetitif inhibitör, sadece ES kompleksi oluşuktan sonra enzimin substratın bağlı olduğu aktif yerden başka bir yerine geri dönüşümlü bağlanarak enzimi inaktive eder:(Şekil 2.16).



Şekil 2. 16: Unkompetitif inhibitörlerin eylem mekanizması (Chang, 2009).

2.3.2.3. Nonkompetitif inhibisyon

Substrata yapısal yakınlığı olmayan bazı maddeler, belirgin bir şekilde enzimi inhibe ederler. Bu tür inhibisyonda inhibitör enzimin aktif yani katalitik bölgesi dışında spesifik başka bir bölgeye bağlanır. Diğer bir ifadeyle inhibitörle substrat enzimin ayrı ayrı yerlerine bağlanırlar. Bu nedenle bu iki bileşik bağlanmak için birbirleriyle yarışma halinde değildir. Bundan dolayı bu tür inhibisyona yarışmasız inhibisyon da denir. Bu tip inhibitörler enzimin yapısını bozarak katalizi engeller.

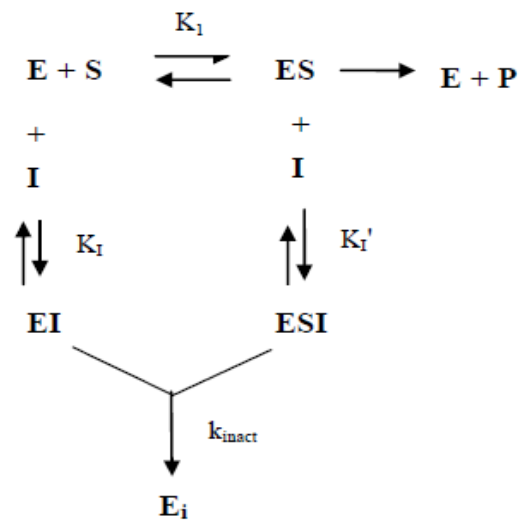


Şekil 2. 17: Nonkompetitif inhibisyon çeşidi.

2.3.3. Geri dönüşümsüz inhibitörler

Geri dönüşümlü inhibitörlerin yanı sıra geri dönüşümlü olmayan inhibitörler de mevcuttur. Bu tip inhibitörler spesifik inaktivatörler olarak ta bilinirler ve enzime kovalent bir bağla bağlanıp onu kolayca inaktif hale getirirler. (Şekil 2.18)

Geri dönüşümsüz enzim inhibisyonu, bir geri dönüşümsüz inhibitörün, enzim üzerinde bulunan ve aktivite için esas olan bir fonksiyonel grubu yıkması veya onunla geri dönüşümsüz olarak birleşmesi sonucu meydana gelir. Bir geri dönüşümsüz inhibitör ve enzim arasında kovalent bağ oluşması yaygındır:



Şekil 2. 18: Geri dönüşümsüz inhibitörlerin reaksiyon mekanizması. E ve E_i sırasıyla enzim, inaktif enzim. S, I ve P sırasıyla substrat, inhibitör ve ürün. ES, EI ve ESI ara ürünler (Chang, 2009).

2.3.4. Tirosinaz enzim inhibitörleri

Tirosinaz enizimin günümüze kadar çalışılmış doğal ve sentetik kaynaklı bir çok inhibitörü bulunmaktadır. İnhibitörler enzim substratları olan tirozin ve dopa varlığında dopakrom oluşumu açısından incelenmiştir.

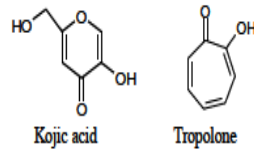
Polifenoller enzim inhibitörleri arasında en yaygın olanlarıdır. Özellikle flavanoidler (stilbenler, kalkonlar, izoflavonoidler, izoflavonlar), uzun zincirli lipitler, steroidler bilinen inhibitörlerdir (Chang, 2000).

Kojik asit tirosinazın en çok çalışılmış inhibitörüdür, aynı zamanda kozmetik alanında cilt beyazlatıcı ve gıda endüstrisinde enzimatik kararmayı önleyici gıda katkısı olarak kullanılmaktadır. Chen ve diğ. (1991), Kojik asit mantar tirosinazının monofenolaz aktivitesi üzerinde kompetitif inhibisyon etkisi gösterirken difenolaz aktivitesi üzerine karışık inhibisyon etkisi gösterir. Tirosinazın difenolaz aktivitesine slow-binding inhibitör etkisi gösterdiği de belirtilmiştir (Cabanés ve diğ.,2002).

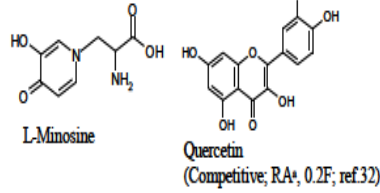
Polifenoller çok sayıda fenolik işlev içeren moleküllerdir ve tirosinaz inhibitörleri arasında en yaygın olanlarıdır. Flavanoidler ise en fazla çalışılan ve yapıları aydınlatılmış polifenollerdir. Bir çok bitkinin yaprak, tohum çiçek ve kabuklarında yaygın olarak bulunurlar. Günümüzde yapısı aydınlatılmış 4000 'den fazla flavanoid mevcuttur. Bu bileşikler bitkilerde UV ışınlarına, patojenlere ve ot oburlara karşı savunma mekanizması sağlarlar.

Harborne ve diğ. (2000), sebzelere, orman meyvelerine ve şaraba karakteristik mavi ve kırmızı rengini verirler. Flavanoidler; flavonlar, flavanoller, flavanonlar, flavonoller, izoflavanoidler, kalkonlar ve katekinlerden oluşan yedi ana gruptan oluşurlar. Flavanoidler yapı olarak tirosinaz inhibitör ve substratları ile uyumludurlar (Şekil 2.19).

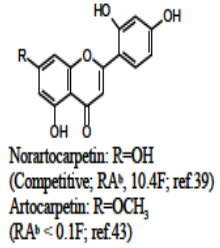
(a) Standard tyrosinase inhibitors



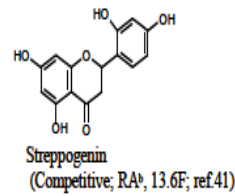
(b) Flavonols



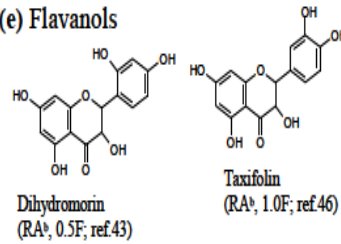
(c) Flavones



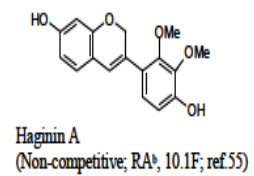
(d) Flavanones



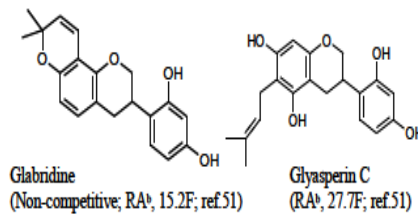
(e) Flavanols



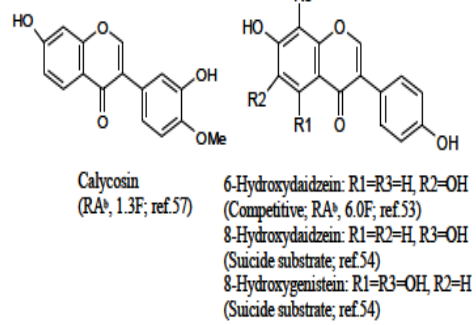
(f) Isoflav-3-en



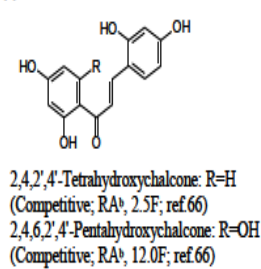
(g) Isoflavans



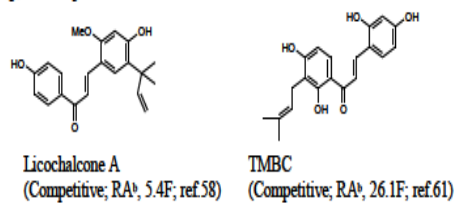
(h) Isoflavones



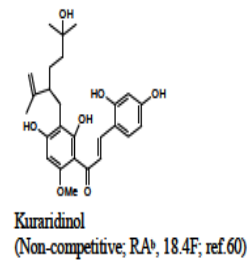
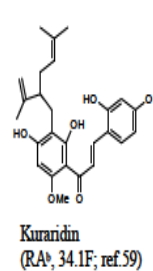
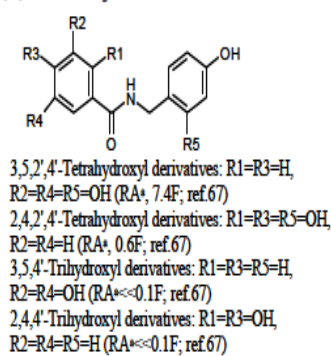
(i) Chalcones



(j) Prenylated Chalcones



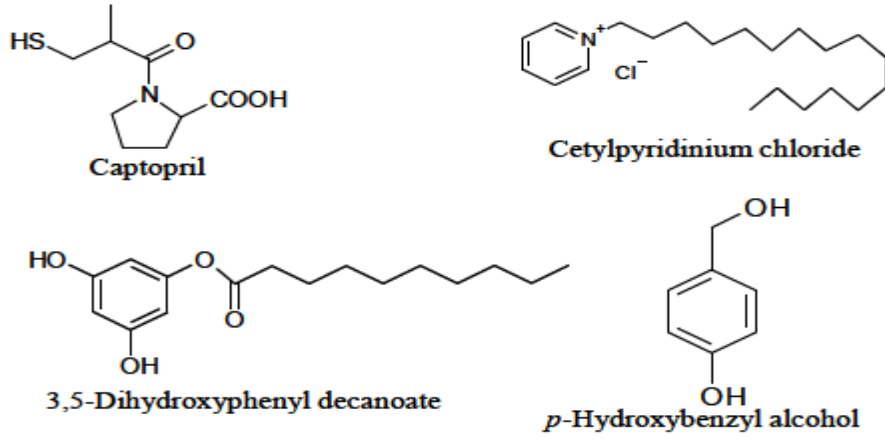
(k) *N*-Benzylbenzamides



Şekil 2. 19: Bazı tirozinaz inhibitörlerinin inhibitör aktivitelerinin mantar tirozinazının standart inhibitörü olan kojik asitin inhibitör aktivitesiyle kıyaslanması (Chang, 2009).

Birçok tirozinaz inhibitörü doğal kaynaklıdır, özellikle bitkilerin farklı bölgelerinden elde edilen ekstratlardan çok sayıda inhibitör elde edilmiştir. Toksik olmayan etkiye sahip ve cilt beyazlatmada yaygın olarak kullanılan polifenol zengini Morus türü bitkilerin farklı bölümlerinden elde edilen ekstratlardan çok sayıda inhibitör saflaştırılmıştır. Bitkinin yapraklarından elde edilen moracin (M-6,3'-o- β -glucopyranoside) tirozinazın anti-difenolaz aktivitesi üzerine kojik asitten 4-5 kat daha fazla inhibitör etkisi göstermiştir(Lee ve diğ.,2002).

Bitki kabuğundan elde edilen ekstrattan saflaştırılan Norartocarpetin (5,2,7',4'-tetrahydroxyflavone) 'un mantar tirozinazının aktivitesine karşı inhibitör etkisinin kojik asitten 10,4 kat daha fazla olduğu bulunmuştur(Ryu ve diğ.,2008).



Şekil 2. 20: Geri dönüşümsüz tirozinaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları (Chang, 2009).

2.4. Tirozinaz Enziminin Uygulama Alanları

Meyve ve sebzelerin taşınması veya işlenmesi esnasında meydana gelen edemelerden dolayı veya bu ürünlerin kesilmiş, dilimlenmiş yüzeylerinin havaya maruz bırakılması ya da dondurulduktan sonra çözünmesi enzimatik kararmaya yol açar.

Özellikle hasat sırasında ve depolamada meydana gelen enzimatik kararma ürünün ticari değerinin düşmesine sebep olur. Bu da enzimi özellikle gıda endüstrisinde oldukça önemli kılar(Jolivet ve diğ.,1998).

Günümüzde biyoteknoloji ve çevre uygulamaları alanında mantar tirosinazına olan ilgi oldukça artmıştır. Tirosinazın monofenolleri difenollere dönüştürme yeteneğinden antioksidan orto-difenollerin üretilmesi amacıyla yararlanılmaktadır. Bu maddeler endüstride gıda ve ilaç katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Tirosinaz inhibitörlerinin cilt beyazlatıcı etkileri özellikle kozmetik endüstrisinde geniş uygulama alanları bulmaktadır(Seo ve diğ.,2003).

2.5. Antioksidan Maddeler

Vücudun, ürettiği serbest radikallere (oksidanlara) karşı savunma mekanizması anlamında bir enzim sistemi vardır. Bu enzimlerin etkinliğini artıran maddelere antioksidan denir ve antioksidanlar vücut hücreleri tarafından üretildiği gibi, gıdalarla da alınan bir grup kimyasal maddedir. Çaydaki polifenoller, soya ve turunçgillerdeki flavonoidler, kakaodaki siyanidin, kanserden koruyucu etkisi olan ve antioksidan etkilere örneklerdir (Gökalp, 2006).

Organik bileşiklerin yapısında değişikliklere neden olan atmosferik oksijen, gıdaların raf ömrünün azalmasına neden olmaktadır. Oksidatif bozunmayı önlemek veya geciktirmek için gıda maddelerini bu bozunmadan korumak amacıyla antioksidan maddeler kullanılmaktadır.

Antioksidanlar gıdalarda; onları dengelemek, oksitlenmeyi kontrol ederek ürün kalitesini artırmak, tatsızlık gelişimini engellemek ve önemli ölçüde terapik ajan olarak potansiyellerini ortaya çıkarmak için kullanılırlar. Gıdaların oksidasyonu sonucu, istenmeyen kahverengi renk, kötü koku, kötü tat (acılık), duyu kalitede ve vitamin miktarında azalmalar gibi sorunlar oluşur (Gökalp, 2006)

2.5.1. Antioksidan maddelerin işlevi

İnsan metabolizmasında vücudun oksijen kullanımındaki normal işlemler sırasında bazı etmenlerin teşviki ile aktif oksijen formları oluşmaktadır. Oluşan aktif oksijen formları engellenmediğinde, DNA, protein, karbonhidrat ve lipitlerde yapısal bozulmalara yol açmaktadır. Antioksidan maddeler, aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak, oksidasyonun teşvik etmiş olduğu zararları hücresel bazda engellemekte ve dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır.

2.6. Ceviz

Bitkiler, gıda endüstrisinde organoleptik ve besin kaynağı olarak nitelikleri bakımından büyük bir yere sahiptirler. Gıda kalitesini korumaları, antioksidan kaynağı olmaları, tıbbi amaçlarla kullanılmaları, dünyanın birçok yerinde hastalıklardan korunmak için medikal bitkilerin yaygın olarak kullanılması açısından büyük bir öneme sahiptirler (Amaral ve diğ.,2004).

Ceviz (*Juglans Regia*),dünya üzerinde yaygın olarak bulunan geleneksel olarak büyük öneme sahip bir bitkidir. Yeşil ceviz, kabukları, çekirdek ve tohumları, ağaç kabukları ve yaprakları bile ilaç ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2. 21: Ceviz ağacı ve meyvesi

Ceviz insanlar için bir besin kaynağı olmasının yanı sıra, bir çok ülkede yerel halk tarafından ilaç yapımında kullanılan bir bitkidir. Bazı bölgelerde vitaminler ve fenolik bileşikler açısından zengin ve besleyici olan ceviz likörü olarak da tüketilmektedir (Stampar ve diğ.,2006).

Fenolik bileşikler bitkilerin ve meyve ağaçlarının metabolizma komplekslerinde kritik bir role sahiptirler. Bu bileşikler meyve ağaçlarının büyümesi, gelişmesi ve meyvelerin hasat süreleri dahil olmak üzere bir çok fizyolojik süreci etkilerler. Gıdalarda bulunan temel fenolik bileşik kompozisyonları insan beslenmesi üzerinde de oldukça yararlıdır (Usenik ve diğ.,2004).

Epidemiyolojik çalışmalar, bitkilerden elde edilen zengin fenolik içeriğe sahip gıdaların kanser, kronik kalp hastalığı, katarakt, beyin ve bağışıklık disfonksiyonlarından oluşan hastalıklara yakalanma riskini azalttığını açıkça ortaya koymuştur (Lattanzio ve diğ.,2003).

Bugüne dek analiz edilen bütün tohum ve meyvelerin arasında en yüksek antioksidan içeriğe sahip olan bitkinin ceviz olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda bitkiden elde edilen ekstratların antioksidan potansiyelinin bitkinin fenolik içeriği ile doğrudan alakalı olduğu ve bu karakteristiğın bitkinin yıllarca depolanmasından sonra bile değişmediği anlaşılmıştır(Holvarssen ve diğ.,2002).

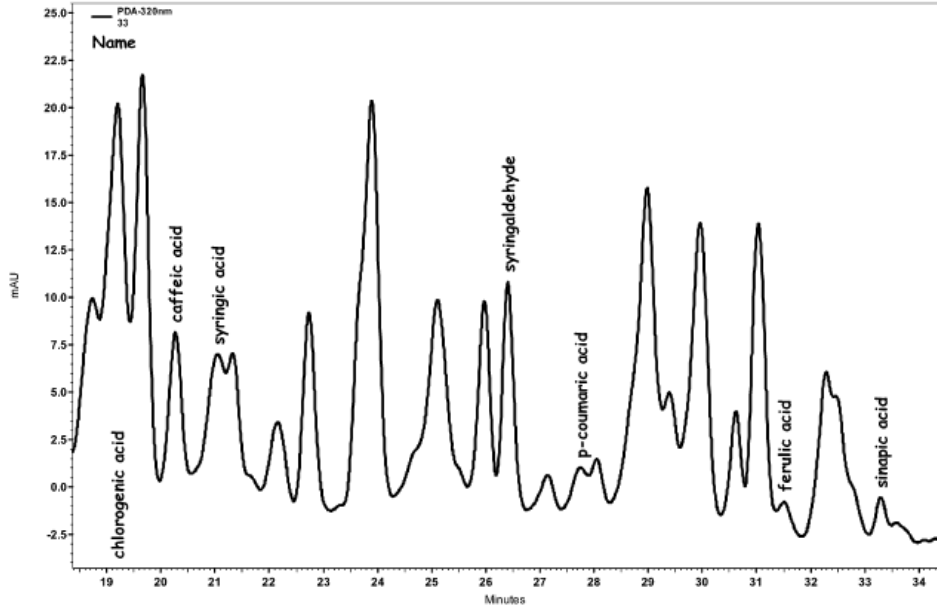
Juglone'nin, cevizde bulunan önemli bir fenolik bileşik olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşiğın antimikrobiyal etkileri ve fare bağırsağındaki tümör oluşumunun tekrarını önlediği belirlenmiştir. Cevizde bulunan ellagic asit ve flavanoidlerin potansiyel serum etkileri ve kalp koruyucu etkileri de tespit edilmiştir (Surgre ve diğ.,1998).

Ceviz yaprağı halk hekimliğinde venöz yetmezliğı ve hemaroid belirtilerinin tedavisinde kullanılırken bitkinin antidiarrheic, antihelminetik ve sıkılaştırıcı özelliklerinden de yararlanılmaktadır.

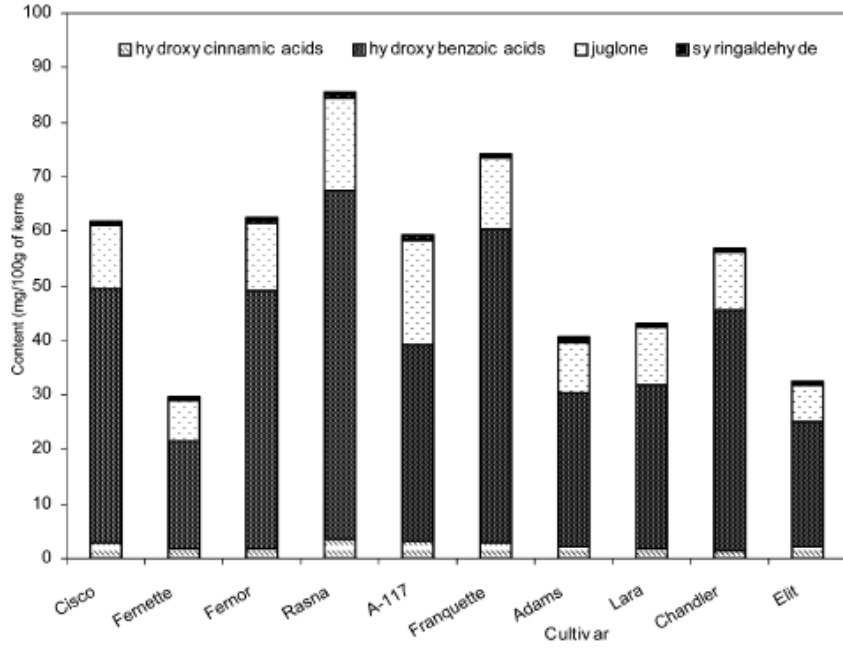
Cevizin etanol ekstratında yapılan bir ön fitokimyasal çalışmada alkaloidlerin, flavanoidlerin ve saponinlerin varlığı tespit edilerek bu ekstratın anti-diyabetik farmakolojik etkisi belirlenmiş ve bu etkinin yapısında bulunan fenolik bileşiklerden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Mohammadi ve diğ.,2011).

Ceviz de meyve kabuğının içindeki çekirdeğı koruyan özel koruyucu kahverengi zar üzerinde yapılan çalışmalarda, bu kısmın meyvenin toplam ağırlığının %5 ini oluşturmasına rağmen antioksidan fenolik bileşikler bakımından oldukça zengin olduğu ve çekirdeğı oksidasyona karşı koruduğı belirlenmiştir(Jurd ve diğ.,1956).

Ceviz ekstratlarının ellagic asit monomerleri, polimerik taninler ve birçok fenolik bileşik içerdiği, bu bileşiklerin insan plazmasını ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu inhibe ettiği de bulunmuştur (Anderson ve diğ.,2001).



Şekil 2. 22: Ceviz bitkisi kültüründe 320 nm de kaydedilen HPLC kromotogramı (Colaric ve diğ.,2005).



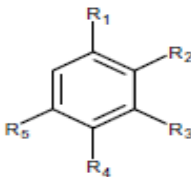
Şekil 2. 23: 10 farklı ceviz kültüründe ceviz çekirdeğinde (mg/100g çekirdek) bulunan fenolik bileşikler(Colaric ve diğ.,2005).

Ağır metallerin atık sulardan ve içme sularından uzaklaştırılması konusunda günümüze dek bir çok çalışma yapılmıştır. Bu konuda doğal kökenli absorbanların ağır metallerle bağ yapma mekanizması açıklığa kavuşturulamamıştır, ancak prosesin karboksil, fenil ve hidroksil grupları varlığında iyon değişimi temeline dayandığı bilinmektedir.

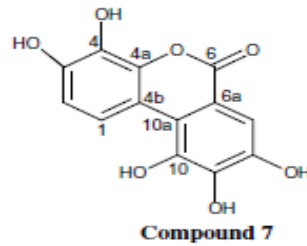
Araştırmacılar bitki kökenli absorbanlarla ilgili araştırmalarında ceviz kabuğundan elde edilen ekstratları kullanarak sulu ortamda Pb^{+2} iyonlarının %80,1 inin absorbe edildiğini keşfederek doğal absorbanların bu konuda ki kullanımlarının yaygınlaşacağı sinyali vermişlerdir (Gala ve diğ.,2011).

Cevizin yaprağından elde edilen ekstrakt üzerinde yapılan analizlerde yüksek miktarda ellagic aside rastlanmıştır ve melanin biyosentezinde etkin olan tirosinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelenmiştir(Özer ve diğ.,2007).

Ceviz çekirdeğinden etil asetat, n-butanol ve petrol eteri kullanılarak elde edilen ekstratlarda anti oksidant fenolik bileşikler taranmıştır. Kolon kromatografisi uygulanarak elde edilen bileşiklerin H^1 ve C^{13} spekturumları ile yapıları aydınlatılarak 7 farklı fenolik bileşik elde edilmiştir(Zhang ve diğ.,2009) (Şekil 2.24).



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	-OH	-OH	-OH	-H	-H
2	-COOH	-H	-H	-OH	-H
3	-COOH	-H	-OCH ₃	-OH	-H
4	-COOCH ₂ CH ₃	-H	-OH	-OH	-OH
5	-COOH	-H	-OH	-OH	-H
6	-COOH	-H	-OH	-OH	-OH



Şekil 2. 24: Ceviz çekirdeğinden saflaştırılan fenolik bileşikler (Chang, 2009)

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen bileşiklerin antioksidan aktivite özellikleri DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)yöntemiyle belirlenmiş ve bileşiklerdeki hidroksil grubu sayılarının antioksidan aktivite üzerinde oldukça etkili olduğu anlaşılmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada cevizin yaprağından, içinden ve kabuğundan elde edilen ekstratların tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri ve ekstraksiyon süresinin antioksidan aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. İlk aşama olarak cevizin yaprağından, içinden ve kabuğundan ekstratlar elde edilmiş, ikinci aşamada ise elde edilen ekstratların tirozinaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri ayrı ayrı incelenmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Deneysel çalışmalarda kullanılan çeşitli kimyasallar ve cihazlar Bölüm 3.1.1 ve 3.1.2'de verilmiştir.

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Tirosinaz enzimi	Sigma-Aldrich EC 1.14.18.1
L- Dopa	Sigma-Aldrich
Kojik asit	Sigma-Aldrich
Sodyum dihidrojenfosfat monohidrat	Merck
Metanol	Merck
DPPH	Merck

3.1.2. Kullanılan cihazlar

pH metre:	CG 840 Schott
UV Visible spektrofotometre:	CARY 1E, Varian
Karıştırıcı:	Vortex-Genine
Mikropipetler:	Volac R 880/D
Evaporatör:	Thermo
Çalkalayıcı:	Biolab 1575-2B

3.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Deneysel çalışma için kullanılan çözeltiler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Tampon çözeltinin hazırlanması:

0.1 M fosfat tamponu (pH 6.80) :6.9 gram (0.05 mol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 6.80'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Substrat çözeltisinin hazırlanması:

5 mM L-Dopa çözeltisi; 0.00986 gram (0.3 mol) L-Dopa 10 mL tampon çözelti içinde çözülerek hazırlandı.

Enzim çözeltisinin hazırlanması:

1000 U/mL enzim çözeltisi; Ticari olarak temin edilen 1881 U/mL mantar tirosinazından 5.32 mg alınarak 10 mL 0.1 M fosfat tamponunda (pH 6.80) çözülerek hazırlandı.

Standart inhibitör çözeltisinin hazırlanması:

0.15 mM Kojik asit çözeltisi; 0.213 mg Kojik asit 10 mL fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı.

DPPH serbest radikal aktivitesi gideriminde kullanılan çözeltisinin hazırlanması:

0.1 mM DPPH çözeltisi; 4 mg DPPH 100mL methanolde çözülerek hazırlandı.

3.3. Deneysel Yöntem

3.3.1. Ceviz ekstratlarının hazırlanması

Araştırmada kullanılan ceviz yaprak, iç ve kabukları GEBZE civarından temin edildi. Materyaller çalışmada kullanılıncaya kadar derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.3.1.1. Ceviz yaprağı, içi ve kabuğundan örnek hazırlama

Yaprak, iç ve kabuk örnekleri Gebze-Kocaeli civarından temin edildi. Örnekler yıkanıp kurutulduktan sonra laboratuvar tipi bir değirmende öğütülerek elekten geçirildi. Analizlerde kullanılıncaya dek + 4 °C'de muhafaza edildi.

Polifenol ekstraksiyonu için, 0.2 gr öğütülmüş örnek ve 10 ml ekstraksiyon solventi (metanol'ün % 50 lik sulu çözeltisi) mekanik çalkalayıcıda 2 ve 18 saat boyunca oda sıcaklığında ekstrakte edildikten sonra, örneklerden katı partiküllerin uzaklaştırması amacıyla filtre edildi. Elde edilen ekstratlar 5.000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi ve ekstrattaki metanol evaporatörde uçuruldu. Elde edilen çözelti analizlerde kullanılıncaya dek - 18 °C 'de muhafaza edildi.

3.3.2. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi belirlenmesi

Bitki ekstratlarının ve standart maddelerin serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. Standart olarak metanol kullanıldı. 40 mg/mL konsantrasyonlardaki ekstraksiyon süresi 2 saat ve 18 saat olan örneklerden 1'er mL alınıp örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL metanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.1)$$

A kontrol, Kontrolün Absorbansı; A örnek, örneğin absorbansı

3.3.3. Değişen L-Dopa konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi

L-Dopa substratıyla Michaelis-Menten kinetiğinin incelenmesi amacıyla, önce tampon içinde bir stok substrat (5mM L-Dopa) çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak son konsantrasyon 0.001 mM ile 4.16 mM arasında olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Uygun tampon çözeltide hazırlanmış enzim çözeltisi konsantrasyonu sabit tutularak (0.2 mL 1000 U/mL) farklı substrat konsantrasyonları için 475 nm'de 60 sn boyunca aktivite izlendi ve absorbanst-zaman grafiğinden ilk hızları belirlendi.

Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V'$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_m ve V_{max} değerleri bulundu.

3.3.4. Değişen Kojik asit konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi

Tirosinazın standart inhibitörü olan kojik asitin farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkilerinin belirlenmesi için önce 0.15 mM lık stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiden konsantrasyonları 0.00025 mM ile 0.005 mM arasında değişen çözeltiler hazırlandı. Bunun için uygun tampon çözeltisi içinde hazırlanmış substrat (L-Dopa 5 mM) çözeltisinden 0.25 mL alındı ve yine tampon içinde hazırlanmış değişik konsantrasyonlardaki inhibitör çözeltilerinden eklendi. Üzerine 0.2 mL enzim ilave edilerek 475 nm'de 60 sn boyunca aktivite izlendi. Çizilen % aktivite-inhibitör konsantrasyonları grafiğinden IC_{50} değeri belirlendi.

Buna göre inhibitör konsantrasyonları uygun çalışma aralığı 0.00125 mM, 0.0005mM ve 0.00025 mM olarak belirlendi. Her bir inhibitör konsantrasyonu için 0.2 mM, 0.42 mM, 0.8mM ve 1.6 mM konsantrasyonlarında substrat (5 mM L-Dopa) 120, 250, 480 ve 900 μ Lçözeltileri ve 0.2 mL enzim eklenerek aktivite ölçümleri alındı, absorbanst-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplandı. Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V'$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_i değerleri bulundu.

3.3.5. Cevizin ekstratlarının enzim aktivitesi üzerine etkileri

3.3.5.1. Yaprak ekstratının aktivite üzerine etkisi

Önceden hazırlanmış olan 40 mg/mL ceviz yaprağı ekstratından uygun seyreltmeler yapılarak son konsantrasyon 0.26mg/ml ile 6.66 mg/ml arasında olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Her bir inhibitör konsantrasyonu için, tampon içinde hazırlanmış 0.25 mL substrat çözeltisi üzerine 0.2 mL yine tamponda hazırlanmış enzim çözeltisi eklenerek 475 nm'de 60 sn boyunca aktivite izlendi ve % aktivite-inhibitör konsantrasyonları grafiğinden I_{50} değeri belirlendi.

Bu sonuçlardan yola çıkılarak uygun inhibitör konsantrasyonu çalışma aralığı olarak 0.26, 0.93, 1.33, 2.66, mg/ml olarak belirlendi. Her bir inhibitör konsantrasyonu için 0.2 mM, 0.42 mM, 0.8mM ve 1.6 mM konsantrasyonlarında substrat (5 mM L-Dopa) çözeltilerinden sırasıyla 120, 250, 480, 900 μ L eklendive 0.2 mL enzim varlığında aktivite ölçümleri alındı, absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplandı. Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_i değerleri bulundu.

3.3.5.2. İç ekstratının aktivite üzerine etkisi

Önceden hazırlanmış olan 40 mg/mL ceviz içi ekstratından uygun seyreltmeler yapılarak son konsantrasyonu 1.33mg/ml ile 20 mg/ml arasında olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Her bir inhibitör konsantrasyonu için tamponda hazırlanmış 0.25 mL substrat çözeltisi ve üzerine 0.2 mL tamponda hazırlanmış enzim çözeltisi eklenerek 475 nm'de 60 sn boyunca aktivite izlendi ve % aktivite-inhibitör konsantrasyonları grafiğinden I_{50} değeri belirlendi. Bu sonuçlardan yola çıkarak uygun inhibitör konsantrasyon çalışma aralığı 1.33, 6.66, 13.33, 20 mg/ml olarak belirlendi.

Her bir inhibitör konsantrasyonu için 0.2 mM, 0.42 mM, 0.8mM ve 1.6 mM konsantrasyonlarında substrat (5 mM L-Dopa) çözeltilerinden sırasıyla 120, 250, 480, 900 μ L eklendive 0.2 mL enzim eklenerek aktivite ölçümleri alındı, absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplandı. Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_i değerleri bulundu.

3.3.5.3. Kabuk ekstratının aktivite üzerine etkisi

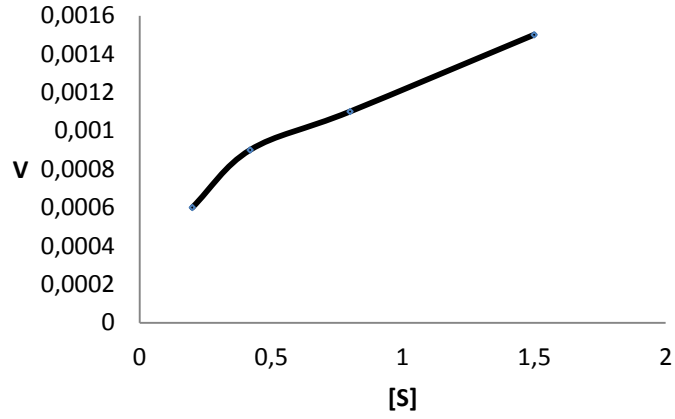
Önceden hazırlanmış olan 40 mg/mL ceviz kabuğu ekstratından uygun seyreltmeler yapılarak son konsantrasyonu 1.33 mg/ml ile 20 mg/ml arasında olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Her bir inhibitör konsantrasyonu için tamponda hazırlanmış 0.25 mL substrat çözeltisi ve üzerine 0.2 mL tamponda hazırlanmış enzim çözeltisi eklenerek 475 nm 'de 60 sn boyunca aktivite izlendi ve % aktivite-inhibitör konsantrasyonları grafiğinden I_{50} değeri belirlendi.

Bu sonuçlardan yola çıkarak uygun inhibitör konsantrasyon çalışma aralığı olarak 1.33, 6.66, 13.33, 20 mg/ml olarak belirlendi. Her bir inhibitör konsantrasyonu için 0.2 mM, 0.42 mM, 0.8 mM ve 1.6 mM konsantrasyonlarında substrat (5 mM L-Dopa) çözeltilerinden sırasıyla 120, 250, 480, 900 μ L eklendi ve 0.2 mL enzim eklenerek aktivite ölçümleri alındı, absorbans-zaman grafiğinden ilk hızları hesaplandı. Bu ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_i değerleri bulundu.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

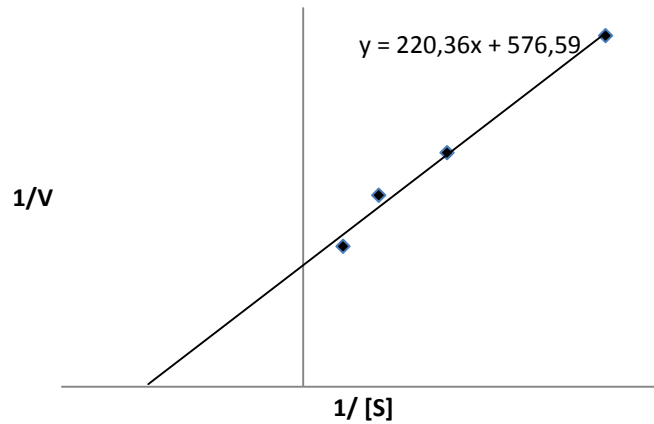
4.1. Değişen L-Dopa Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi

5 mM'lık stok L-Dopa çözeltisinden 0.2, 0.42, 0.8, 1.5 mM konsantrasyonlarında L-Dopa çözeltisi hazırlanarak Michaelis-Menten grafiği çizilmiştir. Bu grafikten yararlanılarak L-Dopa için K_m ve V_m değerleri belirlenmiştir. Bu çalışmaya ait grafik aşağıda görülmektedir. (Şekil 4.1)



Şekil 4. 1: L-Dopa substratına karşı V (hız) grafiği.

Michaelis-Menten grafiğinden ilk hız değerleri Lineweaver-Burk grafiğinde ($1/V$ 'ye karşı $1/[S]$) yerine konularak K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur.(Şekil 4.2)



Şekil 4. 2: L-Dopa substratı için Lineweaver-Burk grafiği

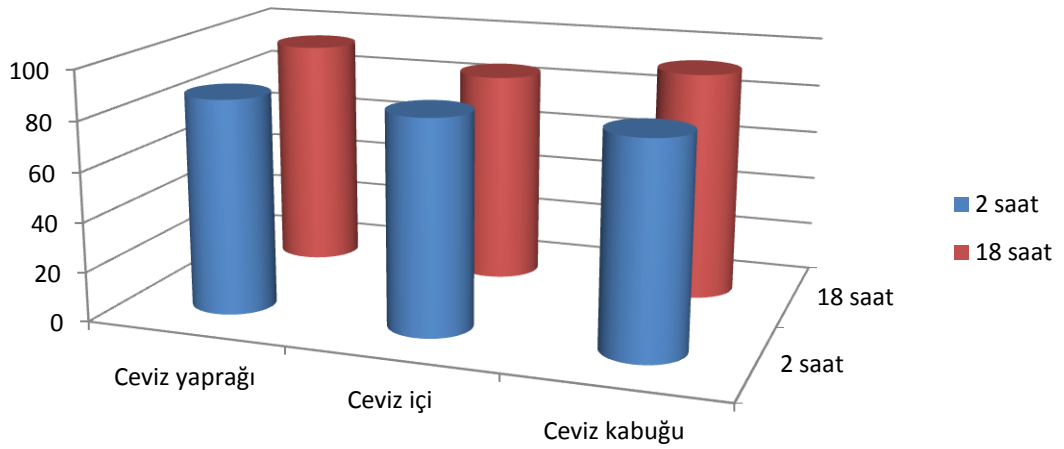
4.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Belirlenmesi

Bitki ekstralarının serbet radikali giderim aktivitesi 400 mg/mL konsantrasyonda tayin edilmiştir. İçerisinde bitki ekstresi bulunmayan kontrole ve ekstraksiyon süresi farklılıklarına göre aktivite karşılaştırmaları yapılmıştır.(Tablo 4.1 ve Şekil 4.3)

Tablo 4. 1: Ceviz yaprağı, içi ve kabuğu ekstralarının DPPH serbest radikali giderimi aktivitesi.

	Ekstraksiyon süresi	% DPPH serbest radikali giderimi aktivitesi
Ceviz yaprağı ekstresi	2 saat	86.66
	18 saat	93.33
Ceviz içi ekstresi	2 saat	84.615
	18 saat	92.30
Ceviz kabuğu ekstresi	2 saat	85.714
	18 saat	85.714

Elde edilen sonuçlara göre ceviz yaprağının ekstraksiyon süresinin DPPH serbest radikali giderimi aktivitesi üzerine etkisi tespit edilmiştir. Yaprak ve içi ekstralarında ekstraksiyon süresindeki artış DPPH serbest radikali giderim aktivitesinde de artışa sebep olmuştur. Ancak ceviz kabuğu ekstrasında ekstraksiyon süresi DPPH serbest radikali giderimi aktivitesini etkilememiştir.



Şekil 4. 3: Farklı ekstraksiyon sürelerinin DPPH serbest radikali giderim aktivitesine etkileri.

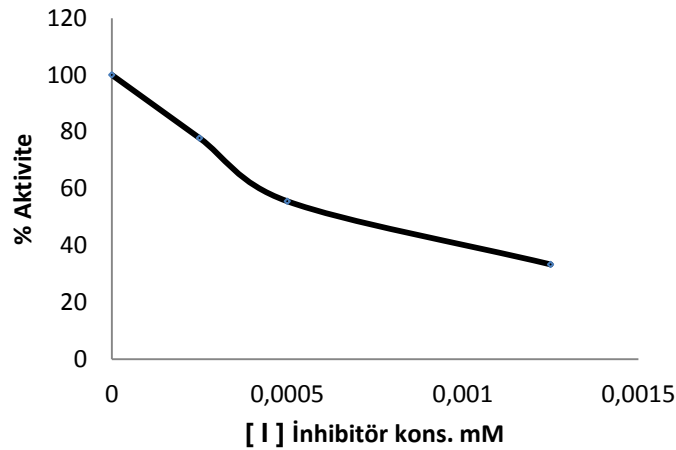
4.3. Kojik Asitin Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kojik asitin Tirozinaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesi için 0.15 mM'lık stok çözeltisinden son konsantrasyonu 0.00025 ile 0.005 mM arasında olacak şekilde çözeltiler hazırlanarak aktivite üzerine etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan inhibitör konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği çizilmiştir. (Şekil 4.4)

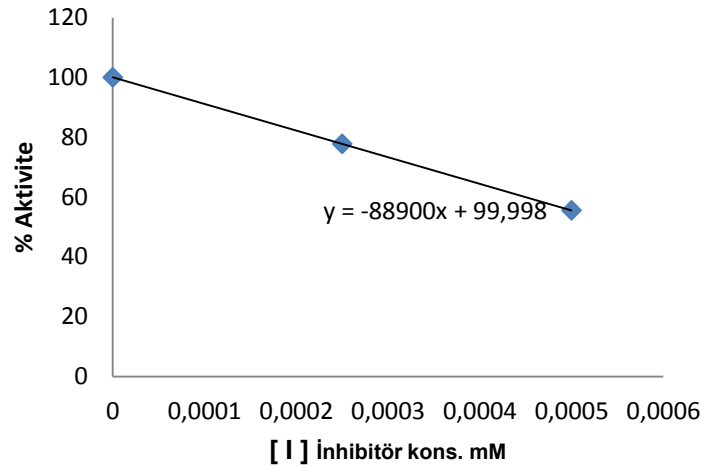
Enzim aktivitesindeki değişimi belirlemek için küvete sırasıyla; tampon çözelti (pH 6.80), substrat çözeltisi (L-Dopa), inhibitör çözeltisi ve son olarak ta enzim çözeltisi ilave edilerek son durumda enzim aktivitesinde meydana gelen değişme gözlemlendi.

Tablo 4. 2: Değişken Kojik asit konsantrasyonuna bağlı olarak % İnhibisyon.

[I] İnhibitör konsantrasyonu mM	% Aktivite
0	100
0,00025	77.77
0,0005	55.55
0,00125	33.33



Şekil 4. 4: Değişik konsantrasyonlardaki Kojik asitin Tirozinaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi.



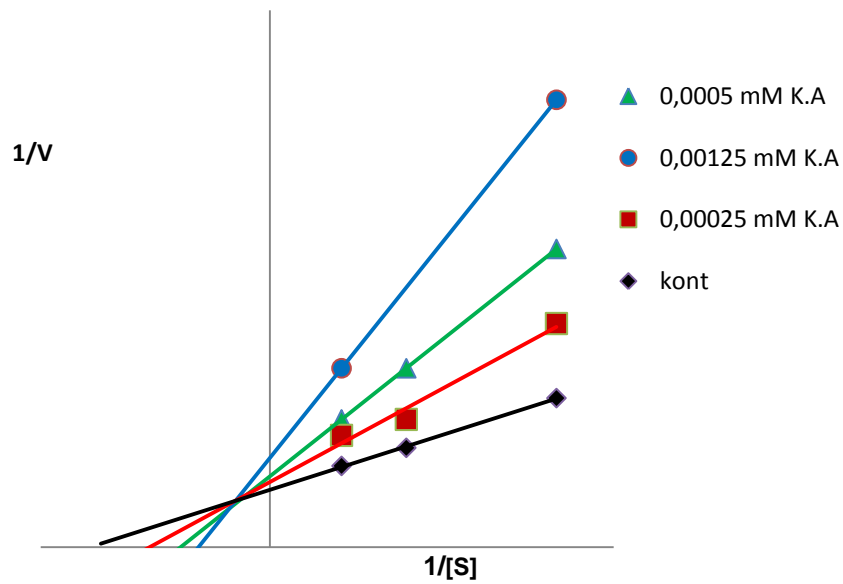
Şekil 4.5: Kojik asit için % Aktivite-[I] grafiği.

Kojik asitin IC_{50} değeri hesaplandı;

$$y = -88900x + 99.998$$

$$y = 50 \text{ için } x = IC_{50} = 5.624 \times 10^{-4} \text{ mM}$$

İnhibisyon çeşidini belirleyebilmek için tampon çözeltisi (pH 6.80), 0.2 mL enzim, sırasıyla 0.2 mM, 0.42 mM ve 0.8 mM substrat (L-Dopa) konsantrasyonlarında her bir konsantrasyon için üç farklı inhibitör konsantrasyonu (0.00025, 0.0005, 0.00125 mM) denenerek enzim aktivitesindeki değişimler gözlemlendi. Her bir inhibitör konsantrasyonu için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak K_i değeri hesaplandı. (Şekil 4.6)



Şekil 4. 6: Kojik asit için Lineweaver-Burk grafiği.

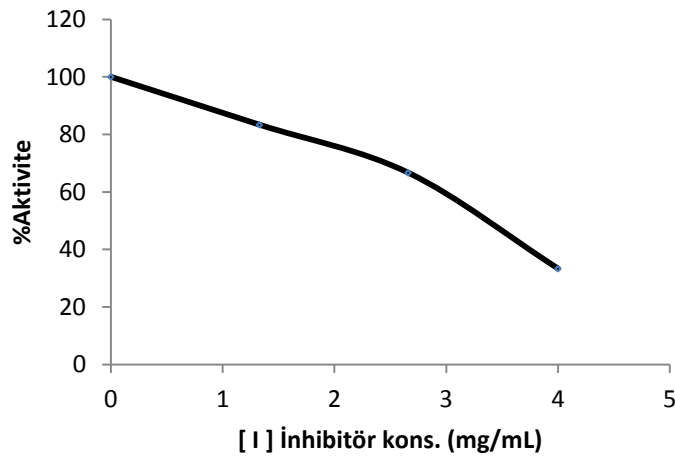
4.4. Ceviz Yapağı Ekstratının Tirosinaz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi

Ceviz yapağı ekstratının Tirosinaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesi için 40 mg/mL'lik stok çözeltisinden son konsantrasyonu 1mg/mL ile 4 mg/mL arasında olacak şekilde çözeltiler hazırlanarak aktivite üzerine etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan inhibitör konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği çizilmiştir. (Şekil 4.7)

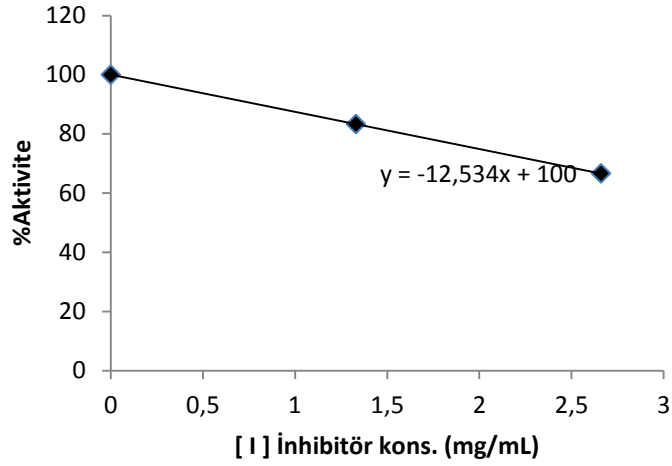
Enzim aktivitesindeki değişimi belirlemek için küvete sırasıyla; tampon çözelti (pH 6.80), substrat çözeltisi (L-Dopa), inhibitör çözeltisi ve son olarak da enzim çözeltisi ilave edilerek son durumda enzim aktivitesinde meydana gelen değişme gözlemlendi.

Tablo 4. 3: Değişen ceviz yapağı ekstratı konsantrasyonuna bağlı olarak % İnhibisyon.

[I] İnhibitör konsantrasyonu mg/mL	% Aktivite
0	100
1,33	83.33
2,66	66.66
4	33.33



Şekil 4. 7: Değişik konsantrasyonlardaki ceviz yapağı ekstratının tirosinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi



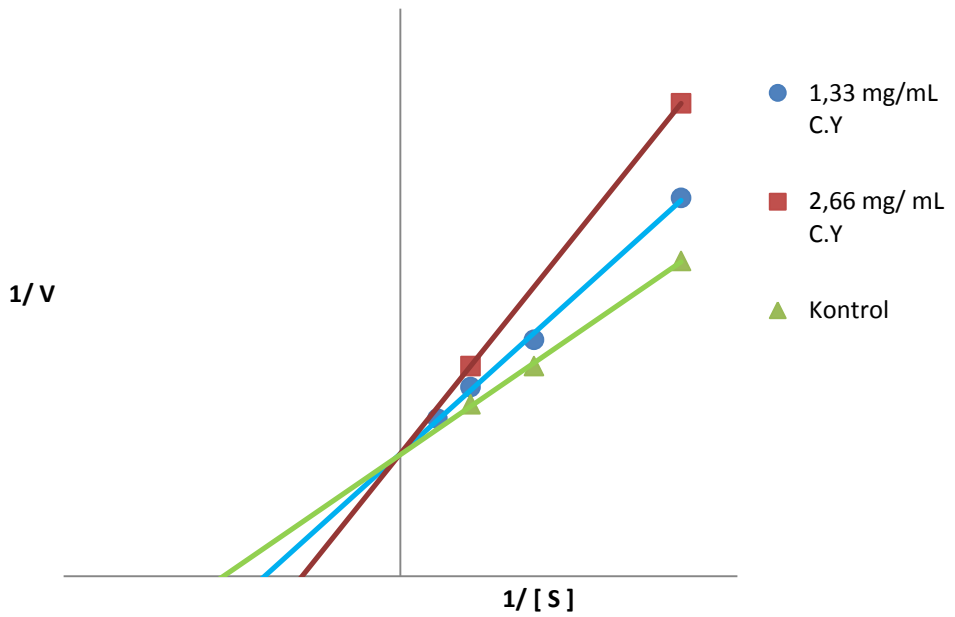
Şekil 4. 8: Yaprak ekstratı için % Aktivite-[I] grafiği.

Ceviz yaprağı ekstratının IC_{50} değeri hesaplandı;

$$y = - 12.534x + 100$$

$$y = 50 \text{ için } x = IC_{50} = 3.99 \text{ mg/mL}$$

İnhibisyon çeşidini belirleyebilmek için tampon çözeltisi (pH 6.80), 0.2 mL enzim, sırasıyla 0.2 mM, 0.42 mM ve 0.8 mM substrat (L-Dopa) konsantrasyonlarında her bir konsantrasyon için iki farklı inhibitör konsantrasyonu (1.33, 2.66 mg/mL) denenerek enzim aktivitesindeki değişimler gözlemlendi. Her bir inhibitör konsantrasyonu için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak K_i değeri hesaplandı. (Şekil 4. 9)



Şekil 4. 9: Ceviz yaprağı ekstratı için Lineweaver-Burk grafiği.

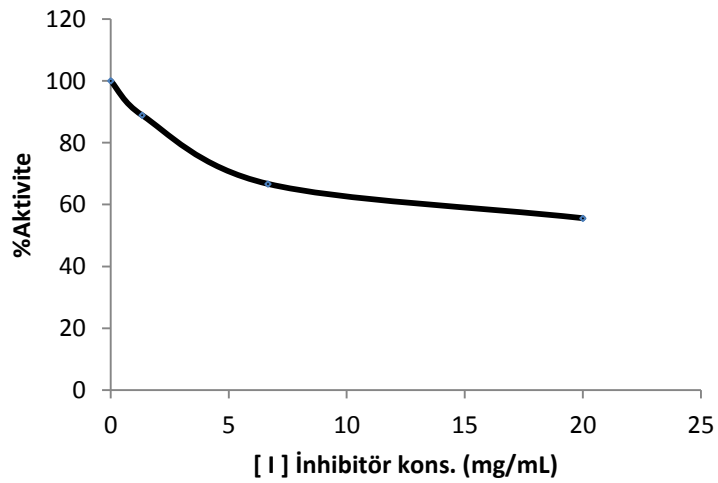
4.5. Ceviz İçi Ekstratının Tirosinaz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi

Ceviz içi ekstratının Tirosinaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesi için 40 mg/mL'lik stok çözeltisinden son konsantrasyonu 1 mg/mL ile 20 mg/mL arasında olacak şekilde çözeltiler hazırlanarak aktivite üzerine etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan inhibitör konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği çizilmiştir. (Şekil 4.10)

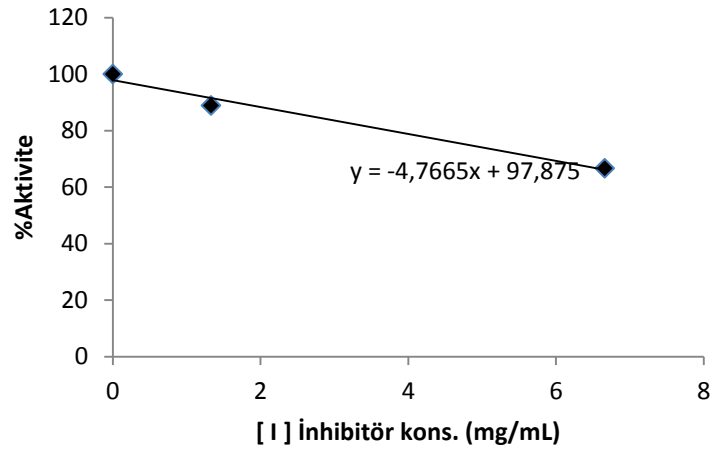
Enzim aktivitesindeki değişimi belirlemek için küvete sırasıyla; tampon çözelti (pH 6,80), substrat çözeltisi (L-Dopa), inhibitör çözeltisi ve son olarak ta enzim çözeltisi ilave edilerek son durumda enzim aktivitesinde meydana gelen değişme gözlenmiştir.

Tablo 4.4: Değişken ceviz içi ekstratı konsantrasyonuna bağlı olarak % İnhibisyon.

[I] İnhibitör konsantrasyonu mg/mL	% Aktivite
0	100
1,33	88.88
6,66	66.66
20	55.55



Şekil 4.10:Değişik konsantrasyonlardaki ceviz içi ekstratının tirosinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi



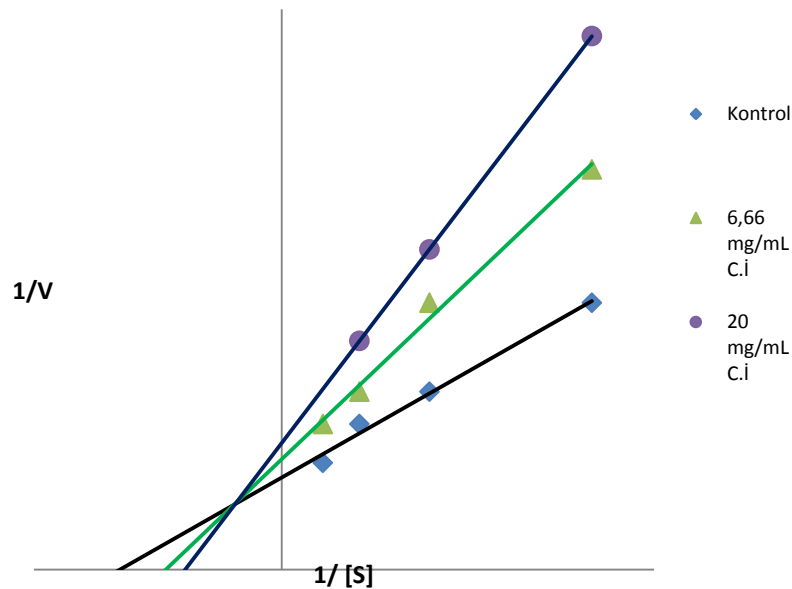
Şekil 4.11: Ceviz içi ekstratı % Aktivite-[I] grafiği.

Ceviz içi ekstratının IC₅₀ değeri hesaplandı;

$$y = - 4.7665x + 97.875$$

$$y = 50 \text{ için } x = IC_{50} = 8.837 \text{ mg/mL}$$

İnhibisyon çeşidini belirleyebilmek için tampon çözeltisi (pH 6.80), 0.2 mL enzim, sırasıyla 0.2 mM, 0.42 mM ve 0.8 mM substrat (L-Dopa) konsantrasyonlarında her bir konsantrasyon için üç farklı inhibitör konsantrasyonu (1.33, 6.66, 20 mg/mL) denenerek enzim aktivitesindeki değişimler gözlemlendi. Her bir inhibitör konsantrasyonu için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak Ki değeri hesaplandı. (Şekil 4.12)



Şekil 4. 12: Ceviz içi ekstratı için Lineweaver-Burk grafiği.

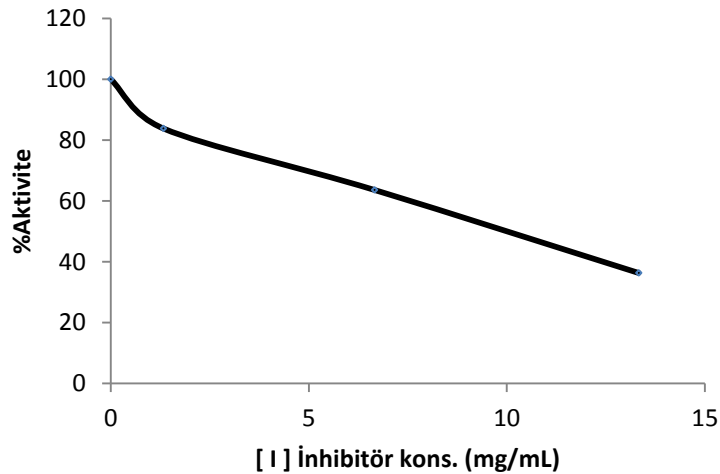
4.6. Ceviz Kabuğu Ekstratının Tirosinaz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi

Ceviz içi ekstratının Tirosinaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesi için 40 mg/mL'lik stok çözeltisinden son konsantrasyonu 6 mg/mL ile 15 mg/mL arasında olacak şekilde çözeltiler hazırlanarak aktivite üzerine etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan inhibitör konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği çizilmiştir. (Şekil 4.13)

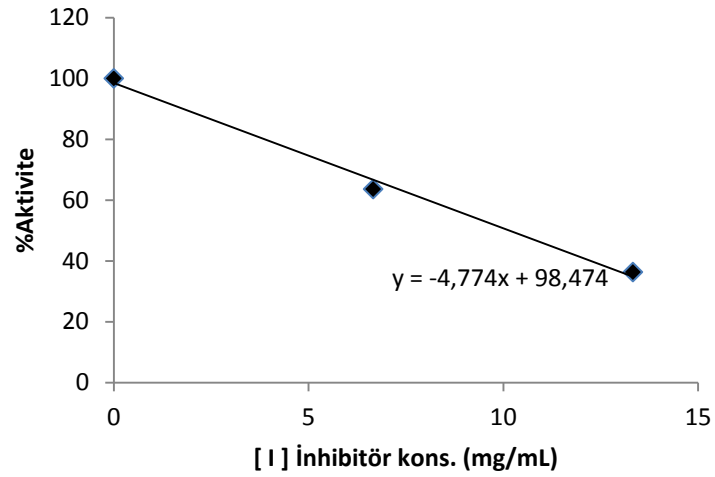
Enzim aktivitesindeki değişimi belirlemek için küvete sırasıyla; tampon çözelti (pH 6.80), substrat çözeltisi (L-Dopa), inhibitör çözeltisi ve son olarak ta enzim çözeltisi ilave edilerek son durumda enzim aktivitesinde meydana gelen değişme gözlenmiştir.

Tablo 4. 5: Değişen ceviz kabuğu ekstratı konsantrasyonuna bağlı olarak % İnhibisyon.

[I] İnhibitör konsantrasyonu mg/mL	% Aktivite
0	100
1,33	83.83
6,66	63.63
13,33	36.36



Şekil 4.13: Değişik konsantrasyonlardaki ceviz kabuğu ekstratının tirosinaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi



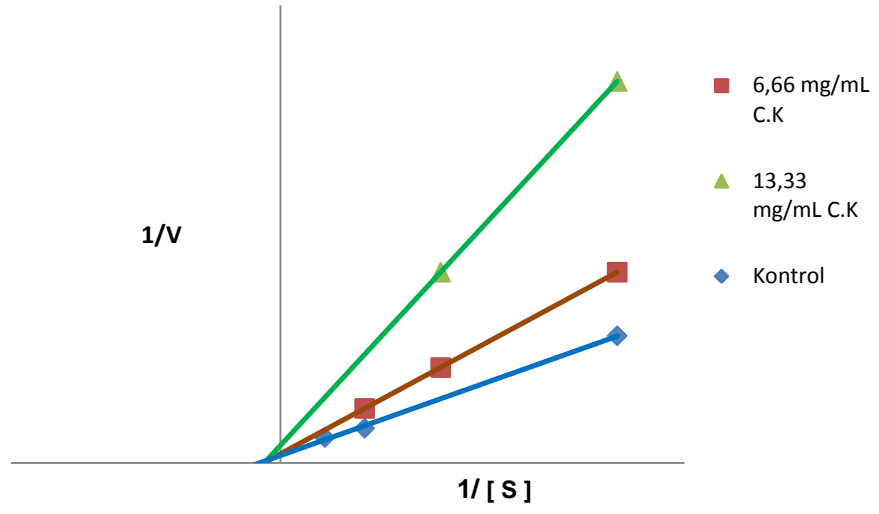
Şekil 4.14: Ceviz kabuğu ekstratı & Aktivite-[I] grafiği.

Ceviz kabuğu ekstratının IC_{50} değeri hesaplandı;

$$y = - 4.774x + 98.474$$

$$y = 50 \text{ için } x = IC_{50} = 10.154 \text{ mg/mL}$$

İnhibisyon çeşidini belirleyebilmek için tampon çözeltisi (pH 6.80), 0.2 mL enzim, sırasıyla 0.2 mM, 0.42 mM ve 0.8 mM substrat (L-Dopa) konsantrasyonlarında her bir konsantrasyon için üç farklı inhibitör konsantrasyonu (1.33, 6.66, 13.33 mg/mL) denenerek enzim aktivitesindeki değişimler gözlemlendi. Her bir inhibitör konsantrasyonu için Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak K_i değeri hesaplandı. (Şekil 4.14)



Şekil 4. 15: Ceviz kabuğu ekstratı için Lineweaver-Burk grafiği.

Tablo 4.6: Tüm verilerin toplu halde gösterimi

	IC ₅₀ mg/mL	K _i	İnhibisyon çeşidi
Ceviz yaprağı	3.99	3,78	Kompetitif
Ceviz içi	8.837	12,66	Nonkompetitif
Ceviz kabuğu	10.154	9.655	Nonkompetitif

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalarda amaç, ceviz yaprak, iç ve kabuğundan hazırlanan ekstratların tirozinaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesidir ve hazırlanan ekstratların ekstraksiyon sürelerinin DPPH serbest aktivite giderimi üzerine etkilerinin belirlenmesidir.

Meyve ve sebzelerin taşınması veya işlenmesi esnasında meydana gelenedelenmelerden dolayı veya bu ürünlerin kesilmiş, dilimlenmiş yüzeylerinin havaya maruz bırakılması ya da dondurulduktan sonra çözünmesi enzimatik kararmaya yol açar. Tirozinaz enzimi katalizi enzimatik kararma reaksiyonları, ürünün tat, görünüm ve besin değerini düşürdüğüünden istenmemektedir.

Bunun yanı sıra son yıllarda kozmetik endüstrisinde tirozinaz inhibitörleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle hiperpigmentasyonun sebep olduğu aşırı melanin sentezi sonucu oluşan cilt lekelenmelerinin önlenmesinde tirozinaz inhibitörleri oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Özer ve diğ., (2007) tarafından yapılan çalışmada melanin biyosentezi sonucu oluşan hiperpigmentasyonun önlenmesi amacıyla yapısında yüksek oranda Ellagic asit içeren *Juglans regia*, *Castanea sativa* ve *Eucalyptus camaldulensiss* yapraklarından elde edilen metanol ekstratlarının tirozinaz enzimi aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Ellagic asit içerikleri belirlenen ekstratlarda en yüksek oran ceviz yaprağı ekstratında tespit edilmiştir.

Ekstratların ve standart inhibitörlerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında Ellagic asit 0,225 mM, Kojik asit 0,311 mM, Arbutin 0,265 mM olarak belirlenmiştir.

Kale ve diğ., (2010) tarafından yapılan çalışmada cevizden metanol, etanol, kloroform ve etilasetat ile elde edilen ekstratlardaki fenolik ve flavanoid maddeler belirlenmiştir. En yüksek verim etilasetat ekstratından elde edilmiştir. Toplam polifenol içeriği 20.32 ile 44.87 mg/g olarak tespit edilmiştir.

Ekstraksiyonda kullanılan solventlerin etkisi incelenmiştir, Kloroform ekstratında 3.5 mg/g flavanoid, 34.50 mg/g fenol; etilasetat ekstratında 32.81 mg/g flavanoid, 44.87 mg/g fenol; etanol ekstratında 13.59 mg/g flavanoid, 36.78 mg/g fenol; metanol ekstratında 11.48 mg/g flavanoid, 20.32 mg/g fenol elde edilmiştir.

Almeida ve diğ., (2007) tarafından yapılan çalışmada ceviz yaprağından elde edilen metanol/su ekstratının serbest radikal aktivite giderimi incelenmiştir. ONOO⁻, NO⁻, H₂O₂, HO⁻ radikalleri aktivite giderimi için IC₅₀ değerleri belirlenmiştir.

Ceviz yaprağından elde edilen ekstratların antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Ekstrat *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. Aeruginosa*, *K. Pneumoniae* vebazı mantar çeşitleri için antimikrobiyel etkisi tespit edilmiştir (Oliveira ve diğ., 2008).

Ceviz kabuğu ekstratından elde edilen polifenollerden diarylheptanoid yapısında iki yeni polifenol molekülü keşfedilmiştir (Liu ve diğ., 2008).

Ceviz kabuğundan elde edilen ekstratlarda vanilik asit, syringic asit, coumaric, ferulic asit ve myricetin bileşikleri saflaştırılmıştır Cosmulescu ve diğ., (2010). Bu moleküllerden bir çoğunun bilinen tirozinaz enzim inhibitörleri olmaları bizim yaptığımız çalışmada ekstratların inhibisyon etkilerini açıklamaktadır.

Ceviz yaprak, iç ve kabuğundan meyvedeki polifenolleri ekstrakte etmek amacıyla % 50'lik metanol ekstratları hazırlanmıştır. Ekstrattaki polifenol miktarının değişimini gözlemlemek amacı ile ekstrat süreleri 2 ve 18 saat süreyle her bir materyal için gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstratlardaki polifenol oranının belirlenmesi ve ekstraksiyon sürelerinin etkilerinin belirlenmesi amacı ile DPPH serbest radikal aktivitesi giderimi metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre her bir ekstrata hazırlanan DPPH çözeltisinden eklenip kontrole karşı absorpsiyon değerleri okunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre ceviz yaprağının 2 ve 18 saatlik ekstratı DPPH serbest radikal aktivitesi giderimi sırasıyla % 86.66 ve % 93.33, ceviz içi 2 ve 18 saatlik DPPH serbest radikal aktivitesi giderimi sırasıyla % 84.615 ve % 92.30, ceviz kabuğu 2 ve 18 saatlik DPPH serbest radikal aktivitesi giderimi sırasıyla % 85.714 ve % 85.714 olarak bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlara göre ceviz yaprağının 2 ve 18 saatlik ekstraksiyon sürelerindeki aktivitesi giderimi iç ve kabuğa göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ceviz kabuk ve iç 2 saatlik ekstratlarında ise aktivite giderimi birbirine yakın değerler olarak bulunmuştur.

18 saatlik ekstratlar göz önüne alındığında yine enyüksek aktivite giderimi ceviz yaprağı ekstratında elde edilmiştir. Ceviz içi ekstratı aktivite giderimi ceviz kabuğu ekstratı aktivite gideriminden daha yüksek bulunmuştur.

Ekstraksiyon süreleri dikakate alınarak ekstraksiyon süresindeki artışın ceviz iç ve yaprağında DPPH serbest radikal giderimi aktivitesini artırdığı ancak ceviz kabuğunda bir değişikliğe sebep olmadığı tespit edilmiştir.

Tirosinaz enzimi kinetik çalışmaları için substrat olarak L-Dopa kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki substrat çözeltileri, tampon çözelti ve enzim çözeltileri kullanılarak L-Dopa için Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri çizilmiştir. Bu eğrilerden faydalanılarak K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. K_m değeri 0.382 mM ve V_{max} değeri 0.00174 olarak bulunmuştur.

Standart enzim inhibitörü olarak Kojik asit kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki kojik asit çözeltisi, tampon çözelti ve enzim çözeltisi kullanılarak Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk eğrileri oluşturularak K_i değerleri ve İnhibisyon türü belirlenmiştir. İnhibisyon türü literatüre de uygun olarak Nankompetitif olarak belirlenmiştir. % Aktivite- İnhibitör konsantrasyonu grafiği çizilerek IC_{50} değeri hesaplanmıştır. IC_{50} değeri 5.624×10^{-4} mM bulunmuştur.

Ceviz yaprağı ekstratından farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler kullanılarak alınan ölçümler sonucu % Aktivite-İnhibitör konsantrasyonu grafiği çizilerek IC_{50} değeri hesaplanmıştır ve değer 3.99 mg/mL olarak bulunmuştur. Dahasonra farklı konsantrasyonlarda substrat ve inhibitör çözeltileri ile alınan ölçümlerle Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değeri hesaplanmış ve inhibisyon türü belirlenmiştir. İnhibisyon türü Kompetitif (yarışmalı) inhibisyon olarak belirlenmiştir.

Ceviz içi ekstratından farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler kullanılarak alınan ölçümler sonucu % Aktivite-İnhibitör konsantrasyonu grafiği çizilerek IC_{50}

değeri hesaplanmıştır ve değer 8.837 mg/mL olarak bulunmuştur. Dahasonra farklı konsantrasyonlarda substrat ve inhibitör çözeltileri ile alınan ölçümlerle Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değeri hesaplanmış ve inhibisyon türü belirlenmiştir. İnhibisyon türü Nankompetitif inhibisyon olarak belirlenmiştir.

Ceviz kabuğu ekstratından farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltiler kullanılarak alınan ölçümler sonucu % Aktivite-İnhibitör konsantrasyonu grafiği çizilerek IC_{50} değeri hesaplanmıştır ve değer 10.154 mg/mL olarak bulunmuştur. Dahasonra farklı konsantrasyonlarda substrat ve inhibitör çözeltileri ile alınan ölçümlerle Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değeri hesaplanmış ve inhibisyon türü belirlenmiştir. İnhibisyon türü Nankompetitif inhibisyon olarak belirlenmiştir.

Ekstratlarla yapılan enzim kinetiği çalışmaları sonucu cevizin iç, yaprak ve kabuğundan elde edilen ekstratların Tirosinaz enzimi üzerine inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Elde edilen veriler ele alındığında hesaplanan IC_{50} değerlerine göre en iyi inhibisyon etkisini ceviz yaprağı ekstratı 3.99 mg/mL IC_{50} değeri ile daha sonra ceviz içi ekstratı 8.837 mg/mL IC_{50} değeri ile son olarak da ceviz kabuğu ekstratı 10.154 mg/mL IC_{50} değeri ile göstermektedir.

DPPH ile yapılan serbest radikal aktivite giderimi çalışmaları ile ekstratların inhibisyon etkileri doğru orantılı sonuçlar vermiştir. Serbest aktivite giderimi en yüksek ceviz yaprağı ekstratlarında elde edilirken, en yüksek inhibisyon etkisi de yine ceviz yaprağı ekstratlarında elde edilmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen verilere dayalı olarak standart inhibitör kojik asit ve standart substrat L-Dopa ile yapılan çalışmalar literatürle paralellik göstermektedir. Ekstratlarla yapılan inhibisyon çalışmaları ise ilk olup belirlenen IC_{50} değerleri ve inhibisyon çeşitleri yapılacak çalışmalar için yeni bir kaynak literatür niteliğindedir. Edilen veriler tablo 4.6.'da toplu halde verilmiştir.

KAYNAKLAR

Artés, F.; Castañer, M.; Gil, M.I., "Review: enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables.", *J. Agric. Food Chem.*, 4, 377-389., (1998).

Burton, K.S., Love, M.E. and Smith, J.F., "Biochemical changes associated with mushroom quality in *Agaricus* spp.", *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 736-741, (1993).

Bingöl, G., "Biyokimya", *Ankara Üniv. Ecz. Fak.*, 276-307, (1978).

Cabanes, J., Chazarra, S. and Garcia-Carmona, F., "Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply.", *J. Theo. Biol.*, 214, 321-325, (2002).

Chen, J.S.; Wei, C.; Marshall, M.R., "Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase.", *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1897-1901, (1991).

Cooksey, C.J.; Garratt, P.J.; Land, E.J.; Pavel, S.; Ramsden, C.A.; Riley, P.A.; Smit N.P.M. "Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase.", *J. Biol. Chem.*, 272, 26226-26235, (1997).

Espin, J.C., Varon, R., Fenoll, L.G., Gilabert, M.A., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F., "Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase." *Eur. J. Biochem.*, 267, 1270-1279, (2000).

Gilbert, H. F., "Basic concepts in a student's Survival Guide Biochemistry", Second edition, *Ph. D. Prof. of Biochem. Baylor College of Medicine Houston*, Texas.

Gökalp, N., "Doğal Antioksidanlar", Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, *Ankara Üniv. Fen Bil Enst.*, Ankara, 7-33, (2006).

Harborne, J.B.; Williams, C.A., "Advances in flavonoid research since 1992." *Phytochem.*, 55, 481-504, (2000).

Himmelwright, R.S., Eickman, N.C. and Solomon, E.I., "Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins.", *J Am Chem Soc*, 102, 7339-7344, (1980).

Holaoui, S., Asther, M., Sigoillot, J.C., Hamdi, M., Lomascolo, A., "Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristic, bioengineering and biotechnological applications", *J. of Applied Microbiology*, 100, 219-232, (2006).

Ikehata, K., Nicell, J.A., "Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols.", *Bioresource Technology*, 74, 191-199, (2000).

Jolivet, J., Arpin, N., Wichers, H.J. and Pellon, G., "Agaricus bisporus browning: a review.", *Mycol Res.*, 102, 1459-1483, (1998).

Kale, A., Gaikwad, S., Mundhe, K., Deshpande, N and Salvekar, J., "Quantification of phenolics and flavanoids by spectrophotometer from *Juglans regia*", **Int. J. Pharma and Bio Sciences**, Vol. 1, Issue 3, (2010).

Kanda, K., Sato, T., Ishii, S., Enei, H. and Ejiri, S., "Purification and properties of tyrosinase isozymes from gill of *Lentinus edodes* fruiting bodies.", **Biosci Biotechnol Biochem**, 60, 1273–1278, (1996).

Kaya, N., "Biyokimya", **Atatürk Üniv. Basımevi**, 42-58, (1993).

Kupper, U., Niedermann, D.M., Travaglini, G. and Lerch, K., "Isolation and characterization of the tyrosinase gene from *Neurospora crassa*.", **J Biol Chem**, 264, 17250–17258, (1989).

Lerch, K., "Tyrosinase: molecular and active-site structure." In: Lee, C.Y., Whitaker, J.R. (Eds.), "Enzymatic Browning and its Prevention, ACS Symposium Series 600." **American Chemical Society**, Washington, DC., (1995).

Lineweaver, H., Burk, D., "The determination of enzyme dissociation constant", **J. Am. Chem. Soc.**, 56, 658-662, (1934)

Mayer, A.M., "polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review", **Phytochem.**, 67, 2318-2331, (2006)

Mayer, A.M. and Harel, E., "Polyphenol oxidases in plants.", **Phytochem**, 31, 193–215, (1979).

Mora PC, Baraldi PG., "Dermocosmetic applications of polymeric biomaterials. In: Dumitru S, ed., *Polymeric Biomaterials*", 2nd ed. **New York and Basel, Marcel Dekker**, pp. 459–490, (2000).

Naidja, A., Huang, P.M., Bollag, J.-M., "Comparison of reaction products from the transformation of catechol catalyzed by birnessite or tyrosinase." **Soil Sci. Soc. Amer. J.**, 62, 188±195, (1998).

Nakamura, T., Sho, S. and Ogura, Y., "On the purification and properties of mushroom tyrosinase.", **J Biochem**, 59, 481–486, (1966).

Nakamura, M., Nakajima, T., Ohba, Y., Yamauchi, S., Lee, B.R. and Ichishima, E., "Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis.", **Biochem J**, 360, 537–545, (2000).

Özer, Ö., Mutlu, B. ve Kivçak, B., "Antityrosinase Activity of some plant extracts and formulations containing Ellagic acid.", **Pharm. Biology**, Vol. 45, No.6, pp. 519-524, (2007).

Prota G., "Melanins and melanogenesis.", **Cosmetics Toiletries**, 111(55): 43–51, (1996).

Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A., Sanjust, E., "Tyrosinase inhibition: general and applied aspects", **J. Enz. Inhib. Med. Chem.** 17, 207–218, (2002).

Rescigno, A., Bruyneel, F., Padiglia, A., Sollai, F., Salis, A., Marchand-Brynaert, J., Sanjust, E., "Structure-activity relationships of various amino-hydroxy-benzenesulfonic acids and sulfonamides as tyrosinase substrates.", **Biochimica et Biophysica Acta**, 1810, 799-807, (2011).

Robb, D.A. and Gutteridge, S., "The polypeptide composition of two fungal tyrosinases.", **Phytochem**, 20, 1481–1485, (1981).

Sanchez-Ferrer, a., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., "Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism", **Biochim Biophys Acta**, 1-11, (1995).

Schallreuter, K.U.; Kothari, S.; Chavan, B.; Spencer, J.D., "Regulation of melanogenesis controversies and new concepts.", **Exp. Dermatol.**, 17, 395-404, (2008).

Soler-Rivas, C., Jolivet, S., Arpin, N., Olivier, J.M., and Wichers, H.J., "Biochemical and physiological aspects of Brown blotch disease of *Agaricus bisporus*", **FEMS Microbial Rev.**, 23, 591-614, (1999).

Sung-Yum, S., Vinay, K.S., Niti, S., "Mushroom tyrosinase: Recent prospects.", **J. Agric. Food Chem.**, 51, 2837-2853, (2003).

Te-Shang, C., "An updated review of Tyrosinase inhibitors.", **Int. J. Mol. Sci.**, 10, 2440-2475, (2009).

Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H. and Wichers, H.J. "Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases.", **Phytochem**, 45, 1309–1323, (1997).

Wichers, H.J., Gerritsen, Y.A.M. and Chapelon, C.G.J., "Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*.", **Phytochem**, 43, 333–337, (1996).

Whitaker, J.R., "Polyphenol oxidase. In Food Enzymes Structure and Mechanism ed.", **Wong, D.W.S. pp.** 271–307. New York: Chapman Hall., (1995).

Woolery, G.L., Powers, L., Winkler, M., Solomon, E.I., Lerch, K. and Spiro, T.G., "Extended X-Ray absorption fine structure study of the coupled binuclear copper active site of tyrosinase from *Neurospora crassa*.", **Biochem Biophys Acta**, 788, 155–161, (1984).

Yoruk, R., Marshall, M.R., "Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review.", **J. Food Chem.**, 27, 361–422, (2003).

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Bursa'nın Keles ilçesinde doğdu. İlköğretimini Keles de tamamladı. 2003 yılında Bursa Anadolu Kız Lisesinden mezun oldu. 2004 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen edebiyat Fakültesi Kimya bölümünü kazandı ve 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitimine başladı ve 2012 yılında mezun oldu. 2009 yılından beri TARIMSAN TARIM SAN. ve TİC. A.Ş.'de Kalite Kontrol ve AR-GE uzmanı olarak çalışmakta. Bekar.