

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

MİS ZAMBAĞININ (*Lilium candidum*) BİYOKİMYASAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE
ENDÜSTRİYEL AMAÇLI KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEYHUN IŞIK

OCAK 2014

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

MİS ZAMBAĞININ (*Lilium candidum*) BİYOKİMYASAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE
ENDÜSTRİYEL AMAÇLI KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEYHUN IŞIK

OCAK 2014

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

CEYHUN IŞIK tarafından hazırlanan **MİS ZAMBAĞININ (*Lilium candidum*) BİYOKİMYASAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE ENDÜSTRİYEL AMAÇLI KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI** başlıklı tezinin, 13/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Yaşar DEMİR (Jüri Başkanı)
Kimya Anabilim Dalı,
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur

İmza:



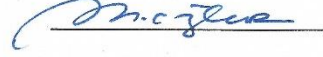
Prof. Dr. Nazan DEMİR (Danışman)
Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali ÖZLER (Üye)
Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Gül Asiye AYÇIK
Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Prof. Dr. Nazan DEMİR
Danışman, Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 13/01/2014

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Ceyhun IŞIK

13/01/2014



ÖZET
MİS ZAMBAĞININ (*Lilium candidum*) BİYOKİMYASAL
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ VE ENDÜSTRİYEL AMAÇLI
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Ceyhun IŞIK

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nazan DEMİR

Ocak 2014, 136 sayfa

Bu tez çalışmasında, Muğla kırsalında doğal olarak yetişen ve hoş kokusu nedeniyle insanların dikkatini çeken mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçekleri Mayıs-Haziran aylarında toplanmış ve bazı biyokimyasal aktiviteleri üzerine araştırmalar yapılmıştır.

Proteaz enzimi proteoinlerin peptitlere ve amino asitlere hidrolizini katalizler. Hem endüstriyel hem de biyokimyasal uygulamalarda en önemli enzim gruplarından biridir. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden proteaz enzimi saflaştırmak için $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi yöntemi ve CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi kullanıldı. Enzim için optimum pH ve optimum sıcaklık, kazein, azokazein, jelatin, hemoglobin, azoalbumin substratları için K_M ve V_{\max} değerleri belirlendi. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE kullanıldı. Enzimin molekül ağırlığının 29,7 kDa olduğu jel filtrasyon kromatografisinden yararlanılarak hesaplandı.

Enzim aktivitesi üzerine Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) katyonlarının, EDTA, SDS, β -merkapt etanol ve iyodasetamid kimyasallarının etkisi incelendi.

Ayrıca mis zambağı çiçeklerinin A vitamini (β -karoten) miktarı $64 \pm 0,23$ $\mu\text{g}/100$ g, E vitamini (α -tokoferol) miktarı $36 \pm 0,15$ $\mu\text{g}/100$ g ve C vitamini (askorbik asit) miktarları $16 \pm 0,32$ mg/100 g olarak belirlendi.

UPLC-ESI-MS/MS ile fenolik bileşik profili, B grubu vitaminleri ve serbest amino asit içeriği, Headspace GC/MSD ile uçucu ve aroma verici bileşenleri analiz edildi. Ayrıca hekzan, etil asetat ve alkol fraksiyonları olmak üzere mis zambağı çiçeklerinden elde edilen üç farklı polaritedeki ekstraktların antioksidan aktiviteleri belirlendi: Toplam antioksidan aktivite (β -karoten renk açılımı yöntemi ile), DPPH serbest radikali giderimi ve ABTS katyon radikali giderimi aktivitesi belirlendi.

Elde edilen sonuçlar ışığında mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin fenolik bileşik bakımından zengin olduğu görüldü. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinde majör olarak, Kaempferol ve Ferrulik asit tespit edildi.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin 100 gramında 568 µg Fenialanin, 547 µg İzölösün, 520 µg Triptofan, 275 µg Valin ve 81 µg Lösün gibi esansiyel amino asitlere rastlandı.

Yapılan çalışmalar beyaz zambak (*Lilium candidum*) çiçeklerinin, preoteaz enzimini, tüm serbest amino asitleri, aroma bileşenlerinden Linalool (3,7 dimethyl-1,6-Octadien-3-ol) ile A, C, E ve B grubu vitaminlerini içermesi ve esansiyel amino asitlerin miktarının yüksek olması, fenolik bileşik bakımından zengin olmasının ilaç ve özellikle kozmetik sektöründe çok önemli bir bitkisel kaynak olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Beyaz Zambak (*Lilium candidum*), Proteaz, Amino Asitler, Fenolik Bileşikler, Antioksidanlar, B Vitamini

ABSTRACT

DETERMINATION OF BIOCHEMICAL ACTIVITIES OF (*Lilium candidum*) AND INVESTIGATION OF INDUSTRIAL USAGE

Ceyhun IŞIK

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Nazan DEMİR

January 2014, 136 pages

In this study, *Lilium candidum* flowers which is grown up in Muğla picked up and some biochemical activities were investigated.

Proteases enzymes catalyses hydrolysis of proteins to peptides and amino acids. They are one of the important groups both in biochemical and industrial applications. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate and CM-Sephadex ion exchange chromatography were used for purification of the protease from *Lilium candidum* flowers. Optimal pH and temperature and K_m and V_{max} values for casein, azocasein, azoalbumin, gelatin, hemoglobin substrats for purified enzyme were calculated. Sodium dodecyl sulphate polacrylamide gel electrophoresis was applied for control of the protease enzyme purified from *Lilium candidum* and molecular weight of purified protease enzyme is determined as 29,7 kDa by using gel filtration chromatography.

The effect of Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) cations and EDTA, SDS, β -mercapto ethanol and iodoasetamid chemicals on enzyme activity were studied.

Lilium candidum flowers were analyzed for phenolic compounds, B group vitamins and free amino acids content using UPLC-ESI-MS/MS, for volatile and flavor compounds using Headspace GC/MSD. Moreover, extracts of hexane, ethyl acetate and alcohol fractions, which were in three different polarities, obtained from *Lilium candidum* flowers were evaluated for antioxidant activities: Total antioxidant activity (using β -carotene bleaching method), DPPH free radical scavenging assay, ABTS radical cation scavenging assay.

The obtained results indicate that *Lilium candidum* flowers were rich in phenolic compounds. 28.73 $\mu\text{g/g}$ Kaempferol, 27.04 $\mu\text{g/g}$ 4-Hydroxy benzoic acid and 6.59 $\mu\text{g/g}$ p-Coumaric acid were detected in *Lilium candidum* flowers as major.

Free amino acids were determined in *Lilium candidum* flowers. Essential amino acids like Phenylalanine (568 μg), Isoleucine(547 μg), Tryptophan(520 μg), Valine (275 μg) and Leucine (81 μg) were found in 100g *Lilium candidum*.

Proteases enzyme, all free amino acids, linalool (3,7 dimethyl-1,6-Octadien-3-ol) and B group vitamins content of *Lilium candidum* and high in essential amino acids and

phenolics compounds amount demonstrate value and importance in pharmaceutical and cosmetic sectors.

Keywords: *Lilium candidum*, Protease, Amino Acids, Phenolic Compounds, Antioxidants, B vitamins

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca, bilgisi, deneyimi ve tecrübesiyle beni yönlendiren değerli zamanını benden esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nazan DEMİR'e

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocam Sayın Prof. Dr. Yaşar DEMİR'e

Çalışmalarımın teorik ve deneysel kısmında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Şeyda KIVRAK'a ve Uzm. Dr. İbrahim KIVRAK

Bu güne kadar benden desteklerini esirgemeyen değerli aileme,

Ve eşim Şeyma GÜMÜŞ IŞIK'a çok teşekkür ederim.

Ceyhun IŞIK

Ocak 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç ve Kapsam.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. <i>Lilium</i> Bitkisinin Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. <i>Lilium candidum</i> 'un (Mis Zambagının) Genel Özellikleri	4
2.2. Proteinler ve Amino Asitler	5
2.2.1. Amino Asitler.....	6
2.2.2. Peptid Bağı ve Özellikleri	8
2.2.3. Proteinlerin Yapısı	10
2.3. Enzimler	12
2.3.1. Proteaz enzimi.....	18
2.4. Aroma Bileşenleri.....	22
2.4.1. Aroma Bileşenlerinin Eldesi	23
2.4.1.1. <i>Su destilasyonu</i>	24
2.4.1.2. <i>Su-buhar destilasyonu</i>	24
2.4.1.3. <i>Su buharı destilasyonu</i>	25
2.4.1.4. <i>Kuru destilasyon</i>	25
2.4.1.5. <i>Hidrodifüzyon</i>	26
2.4.1.6. <i>Maserasyon ile destilasyon</i>	26
2.4.1.7. <i>Soğuk yağ ile özütleme (Anfloraj)</i>	27
2.4.1.8. <i>Sıcak yağ ile özütleme (Maserasyon)</i>	27
2.4.1.9. <i>Organik çözücülerle özütleme</i>	27
2.4.1.10. <i>Sıkma ile yapılan mekanik özütleme</i>	28
2.4.1.11. <i>Çizerek özütleme</i>	28
2.4.2. Aroma Bileşenlerinin Kimyasal Bileşimi	29
2.4.3. Aroma Bileşenlerinin Sınıflandırılması	29

2.5. Antioksidanlar	30
2.5.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	32
2.5.1.1. Birincil Antioksidanlar	33
2.5.1.2. İkincil Antioksidanlar	35
2.6. Fenolik Bileşikler.....	36
2.6.1. Fenolik Asitler.....	38
2.6.1.1. Hidroksisinnamik asitler.....	39
2.6.1.2. Hidroksibenzoik asitler.....	39
2.6.2. Flavonoidler	39
2.6.2.1. Flavonlar	39
2.6.2.2. Flavonoller	40
2.6.2.3. Flavanonlar	40
2.6.2.4. Flavanoller (Katekinler).....	40
2.6.2.5. Antosiyanidinler.....	41
2.6.2.6. İzoflavonoidler	41
2.6.2.7. Neoflavonoidler	42
2.6.2.8. Flavonoid glikozitler.....	42
2.7. Vitaminler	42
2.7.1. Suda Çözünen Vitaminler	43
2.7.1.1. Thiamin (B ₁ Vitamini).....	43
2.7.1.2. Riboflavin (B ₂ Vitamini).....	44
2.7.1.3. Nikotinamid (B ₃ Vitamini)	45
2.7.1.4. Pantotenik Asit (B ₅ Vitamini).....	46
2.7.1.5. Piridoksin (B ₆ vitamini)	47
2.7.1.6. Biotin.....	48
2.7.1.7. Folik Asit (B ₁₀ veya B ₁₁ Vitamini).....	48
2.7.1.8. Lipoik Asit.....	49
2.7.1.9. Kobalamin (B ₁₂ Vitamini)	50
2.7.1.10. C Vitamini.....	51
2.7.2. Yağda Çözünen Vitaminler.....	52
2.7.2.1. A vitamini.....	52
2.7.2.2. D vitamini	53
2.7.2.3. E vitamini.....	53
2.7.2.4. K vitamini.....	54
3. MATERYAL VE YÖNTEM	55

3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	55
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanması	55
3.3. Yöntemler.....	59
3.3.1. Protein Tayini.....	59
3.3.1.1. Kalitatif protein tayini	59
3.3.1.2. Bradford yöntemiyle protein tayini.....	59
3.3.2. Mis Zambağı Çiçeklerinden (<i>Lilium candidum</i>) Proteaz Enziminin Saflaştırılması.....	60
3.3.2.1. Örneklerinin toplanması.....	60
3.3.2.2. Homojenatın hazırlanması.....	60
3.3.2.3. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	60
3.3.2.4. Diyaliz.....	61
3.3.2.5. CM-Sephadex iyon değişim kolonunun hazırlanması.....	61
3.3.2.6. Mis zambağı çiçeklerinden (<i>Lilium candidum</i>) elde edilen homojenatın CM-Sephadex iyon değişim kolonuna tatbiki ve proteaz enziminin elüsyonu.....	62
3.3.3. Proteaz Enzimi İçin Aktivite Tayini	62
3.3.4. SDS-PAGE İle Enzim Saflığının Kontrolü ve Alt Birimlerin Belirlenmesi.....	63
3.4. Mis Zambağı Çiçeklerinden (<i>Lilium candidum</i>) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmalar	64
3.4.1. Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	64
3.4.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	64
3.4.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Molekül Ağırlığı Tayini.....	65
3.4.4. Enzimin V_{max} ve K_M Değerlerinin Belirlenmesi	65
3.4.5. Mis Zambağı Çiçeklerinden (<i>Lilium candidum</i>) Saflaştırılan Proteaz Enziminin Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi.....	66
3.4.6. Mis Zambağı Çiçeklerinden (<i>Lilium candidum</i>) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Katyonların Etkisinin İncelenmesi.....	66
3.4.7. Mis Zambağı Çiçeklerinden (<i>Lilium candidum</i>) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin Araştırılması	67
3.5. Bitki Ekstraksiyonu	67
3.6. Fenolik Bileşiklerin UPLC-MS/MS İle Belirlenmesi	68
3.7. Serbest Amino Asit İçeriğinin UPLC-MS/MS İle Belirlenmesi.....	68
3.8. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinin Aroma Verici Uçucu Organik Bileşenlerin Headspace GC/MSD İle Belirlenmesi.....	69
3.9. B Grubu Vitamin İçeriğinin UPLC-MS/MS İle Belirlenmesi.....	71
3.10. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri	72

3.10.1. Toplam Antioksidan Aktivite: β -Karoten Renk Açılım Yöntemi.....	72
3.10.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi	73
3.10.3. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi	73
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	74
4.1. Kantitatif Protein İçin Hazırlanan Standart Eğri.....	74
4.2. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları	74
4.2.1. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden Proteaz Enziminin CM-Sephadex İyon Değişim Kromatografisi İle Saflaştırılması Sonuçları	74
4.2.2. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden proteaz enziminin saflaştırma basamakları sonuçları	75
4.2.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları	76
4.3. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden Saflaştırılan Proteaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmaların Sonuçları	77
4.3.1. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden Saflaştırılan Proteaz Enziminin Optimum pH Sonuçları.....	77
4.3.2. Optimum Sıcaklık Sonuçları	78
4.3.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Molekül Ağırlığı Tayini Sonuçları	79
4.3.4. Kazein Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması Sonuçları	80
4.3.5. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden Saflaştırılan Proteaz Enziminin Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi Sonuçları.....	81
4.3.6. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Katyonların Etkisinin İncelenmesi Sonuçları	84
4.3.7. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden Saflaştırılan Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi Sonuçları	89
4.4. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinin C Vitamini Miktarının Belirlenmesi	92
4.5. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinin E Vitamini Miktarının Belirlenmesi	92
4.6. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinin A Vitamini Miktarının Belirlenmesi	93
4.7. Fenolik Bileşiklerin UPLC-MS/MS İle Analiz Sonuçları.....	94
4.8. Serbest Amino Asit İçeriğinin UPLC-MS/MS İle Analiz Sonuçları.....	100
4.9. Aroma Bileşenlerinin Headspace GC/MSD İle Analiz Sonuçları.....	108
4.10. B grubu Vitaminlerinin UPLC-MS/MS İle Analiz Sonuçları.....	110
4.11. Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	114

4.11.1. β -karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları.....	114
4.11.1.1. <i>Mis zambağı (Lilium candidum) çiçekleri lipit peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi sonuçları</i>	114
4.11.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Sonuçları.....	115
4.11.3. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Sonuçları.....	116
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	118
KAYNAKLAR	124
EKLER.....	132
ÖZGEÇMİŞ.....	135

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler..	14
Çizelge 2.2. Taşıyıcı olarak görev yapan bazı koenzimler	14
Çizelge 2.3. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri.....	30
Çizelge 2.4. Vitaminler ve Fonksiyonları	43
Çizelge 2.5. THF tarafından taşınan bir karbonlu birimler	49
Çizelge 3.1. Xevo TQ-S MS/MS Cihaz Analiz Şartları.....	69
Çizelge 3.2. Headspace GC/MSD Cihaz Analiz Parametreleri	70
Çizelge 3.3. Xevo TQ-S MS/MS Cihaz Analiz Şartları.....	71
Çizelge 4.1. CM-Sephadex kolonundan Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden elde edilen proteaz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve homojenattan saflaştırılan proteaz enziminde enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.	76
Çizelge 4.2. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliği sonuçları.....	84
Çizelge 4.3. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin sonuçları	88
Çizelge 4.4. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin belirlenmesi sonuçları	91
Çizelge 4.5. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinin vitamin tayini sonuçları	94
Çizelge 4.6. <i>Lilium candidum</i> çiçeklerinde bulunan fenolik bileşiklerin 280 nm'de HPLC-DAD ile analiz sonuçları (µg/100g kuru ağırlık ± standart sapma) ..	95
Çizelge 4.7. <i>Lilium candidum</i> çiçeklerinde bulunan serbest amino asit içeriğinin UPLC-ESI-MS/MS ile analiz sonuçları (µg/100g kuru ağırlık ± standart sapma).....	108
Çizelge 4.8. Beyaz zambak (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinin Aroma Verici Bileşen Yüzdeleri.....	110
Çizelge 4.9. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçekleri bulunan suda çözünebilen vitaminlerin UPLC-ESI-MS/MS ile analiz sonuçları (µg/100g kuru ağırlık ± standart sapma).	114
Çizelge 4.10. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinin β-karoten renk açılımı yöntemiyle lipit peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (% inhibisyon)	115
Çizelge 4.11. Beyaz zambak (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinin türlerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon)	116
Çizelge 4.12. Beyaz zaambak (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinin ABTS yöntemiyle radikali giderim aktivitesi (% inhibisyon)	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Lilium candidum</i>	4
Şekil 2.2. Amino asitlerin genel yapısal formülü.....	7
Şekil 2.3. İki amino asidin birleşmesiyle peptid bağı oluşumu	9
Şekil 2.4. Sistein proteazların genel reaksiyon mekanizması	20
Şekil 2.5. Serin proteazlarının genel reaksiyon mekanizması.....	20
Şekil 2.6. Aspartik proteazların genel reaksiyon mekanizması	21
Şekil 2.7. Çinko (metaloproteaz) genel reaksiyon mekanizması	21
Şekil 2.8. Birincil Antioksidanlar	35
Şekil 2.9. İkincil Antioksidanlar	36
Şekil 4.1. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik.....	74
Şekil 4.2. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden CM-Sephadex iyon değişim kolonu ile saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği.....	75
Şekil 4.3. CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı	77
Şekil 4.4. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	78
Şekil 4.5. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	78
Şekil 4.6. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği	79
Şekil 4.7. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbans grafiği.....	80
Şekil 4.8. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi için kazein substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	81
Şekil 4.9. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi için hemoglobin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	82
Şekil 4.10. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi için jelatin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	82
Şekil 4.11. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi için azoalbumin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği	83
Şekil 4.12. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi için azokazein substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği.....	83

Şekil 4.13. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM FeCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları.....	85
Şekil 4.14. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MnCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları.....	85
Şekil 4.15. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM CaCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları.....	86
Şekil 4.16. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM NiCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları.....	86
Şekil 4.17. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM FeCl ₃ 'ün etkisinin sonuçları.....	87
Şekil 4.18. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM HgCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları.....	87
Şekil 4.19. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MgCl ₂ 'ün etkisinin sonuçları.....	88
Şekil 4.20. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM EDTA'in etkisinin sonuçları.....	89
Şekil 4.21. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM SDS'nin etkisinin sonuçları.....	90
Şekil 4.22. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM iodasetamid'in etkisinin sonuçları.....	90
Şekil 4.23. Mis Zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM β-merkapt etanol'ün etkisinin sonuçları	91
Şekil 4.24. E vitamini tayini standart grafiği	93
Şekil 4.25. A vitamini tayini standart grafiği.....	94
Şekil 4.26. Kaemferol kalibrasyon eğrisi.....	96
Şekil 4.27. Kaemferol MRM kromatogramı	96
Şekil 4.28. Ferrulicisit kalibrasyon eğrisi.....	97
Şekil 4.29. Ferrulicisit MRM kromatogramı.....	97
Şekil 4.30. p-coumarik asit kalibrasyon eğrisi.....	98
Şekil 4.31. p-coumarik asit MRM kromotogramı.....	98
Şekil 4.32. 4-Hidroksibenzoik asit kalibrasyon eğrisi	99

Şekil 4.33. 4-Hidroksibenzoik asit MRM kromotogramı	99
Şekil 4.34. Prolin amino asidinin MRM kromotogramı	101
Şekil 4.35. Valin amino asidinin MRM kromotogramı	101
Şekil 4.36. Treonin amino asidinin MRM kromotogramı.....	102
Şekil 4.37. Lösin amino asidinin MRM kromotogramı	102
Şekil 4.38. İsolösin amino asidinin MRM kromotogramı.....	103
Şekil 4.39. Asparajin amino asidinin MRM kromotogramı.....	103
Şekil 4.40. Lizin amino asidinin MRM kromotogramı.....	104
Şekil 4.41. Glutamin amino asidinin MRM kromotogramı	104
Şekil 4.42. Glutamik asit amino asidinin MRM kromotogramı	105
Şekil 4.43. Methionin amino asidinin MRM kromotogramı.....	105
Şekil 4.44. Fenilalanin amino asidinin MRM kromotogramı	106
Şekil 4.45. Arginin amino asidinin MRM kromotogramı.....	106
Şekil 4.46. Tyrosin amino asidinin MRM kromotogramı.....	107
Şekil 4.47. Triptofan amino asidinin MRM kromotogramı	107
Şekil 4.48. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçekleri headspace GC/MSD kromatogramı	109
Şekil 4.49. Thamine (B ₁ Vitamini) bileşiği kromatogramı	111
Şekil 4.50. Riboflavin (B ₂ Vitamini) bileşiği kromatogramı	112
Şekil 4.51. Nikotirik asit (B ₃ Vitamini) bileşiği kromatogramı	112
Şekil 4.52. Piridoksin (B ₆ Vitamini) bileşiği kromatogramı.....	113
Şekil 4.53. Folik asit (B ₉ Vitamini) bileşiği kromatogramı	113
Şekil 4.54. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinin β -karoten renk açılımı yöntemiyle lipit peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (% inhibisyon) sütun grafığı.....	115
Şekil 4.55. Mis zambağı (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinin türlerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) sütun grafığı	116
Şekil 4.56. Beyaz zaambak (<i>Lilium candidum</i>) çiçeklerinin ABTS yöntemiyle radikali giderim aktivitesi (% inhibisyon) sütun grafığı	117

KISALTMALAR DİZİNİ

Asp	Aspartik Asit
BSA	Bovin serum albümin
CA	Karbonik anhidraz
CM	Karboksimetil
Dak	Dakika
DTT	Ditiyoeritritol
E	Enzim
E.C	Enzim Kod
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
EU	Enzim Ünitesi
g	Gram
His	Histidin
I	İnhibitör
mL	Mililitre
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez
S	Substrat
Ser	Serin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil etilendiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

İlk insan dünyada yürümeye başladığından beri, iki temel hedefi olmuştur: ölümsüzlük, genç ve güzel kalmak. Ölüm, yaşlanmak ve çirkinlik hep en kötü kavramlar olarak anılmıştır. Kadim tarihten beri insanlar ölümsüzlüğü, ebedi gençlik ve güzelliği düşlemişler; onun sırrının peşinden koşmuşlardır. Bu iki istek bugün tıp bilimlerinin ve kozmetik alanının gelişmesine yol açmıştır. Kadınlar, Orta Çağ simyacıları ile birlikte ebedi gençliğin sırrını bulmaya çalışmıştır. Simyacıları ilgilendiren konunun bilimsel ve felsefi yönü, kadınları ilgilendiren ise çoğunlukla pratik tarafı olmuştur. Sonuçta, özellikle kadınlar uzun yıllar genç ve güzel kalmak uğruna birçok şey denemiş ve tecrübelerini nesilden nesile aktarmıştır. Bugün kozmetik ürün çeşitliliğinin geldiği nokta inanılmazdır.

Değişen dünya düzeni, kentli yaşamın görselliği ön plana çıkaran bakış açısı ve son teknolojilerle desteklenen kozmetik sektörü modern çağın büyüğü gibidir. Fakat tüketiciye sunulan ürünler çok sayıda kimyasal içermektedir ve bu kimyasalların insan sağlığına ciddi zararlar verebileceğini düşünmek hiç de yanlış olmayacaktır. Özellikle son yıllarda artan kadın kanserleri nedeniyle kozmetik ürünlere şüphe ile bakılmaya başlanmış ve bunun sonucu olarak doğala olan ilgi artmaya başlamıştır. Son yıllarda piyasaya sürülen kozmetik ürünler incelendiğinde özellikle doğal kozmetik ürün sayısında çok ciddi artışların olduğu söylenebilir.

Doğal kozmetik ürün herhangi bir kozmetik ürünün performansını arttırmak ya da ürünün göstereceği etkiyi bitki özleri ile sağlamak için, formülasyonlara bitki özleri ekleyerek yapılan ürünlerdir. Aslında insanlar ilk dönemlerde tüm ihtiyaçlarını bitkilerden karşılamışlardır. Ancak zaman ile hızla artan insan nüfusu nedeniyle gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde kimyasal sentezlere başvurulmuştur. Bu sayede birçok bitki içindeki aktif maddeler laboratuvarlarda düşük maliyetlerle üretilmiştir. Maliyetinin düşük olması nedeniyle ve artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılayabilmek için tüketiciler kimyasal sentez ile üretilen aktif maddeleri kullanmaya

başlamışlardır. Bu kimyasalların insanlar ve doğa üzerindeki zararlı etkileri artınca insanlar tekrardan doğaya yönelmişlerdir.

Bu tez çalışmasında, son yıllarda kozmetik ürünlerde ve ilaçlarda kullanılan sentez kimyasallarının doğaya ve insana verdiği zararların bir sonucu olarak insanoğlunun doğaya tekrar yönelmesinden hareketle özellikle Muğla yöresinde doğal ortamda yetişen ve hoş kokusuyla insanların ilgisi çeken mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin bazı biyokimyasal aktiviteleri üzerine araştırmalar yapılmıştır.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) eskiden beri Batı Anadolu da yetiştirilen çok eski bir bitkidir. Uzun yıllardır halk arasında çeşitli rahatsızlıkların giderilmesinde mis zambağı (*Lilium candidum*) bitkisi kullanılarak hazırlanan preperatlar kullanılmıştır. Halk arasında özellikle yaralar, kesikler, yanıklar, çeşitli enfeksiyonlar, cilt lekeleri, öksürük, akne ve göz ağrılarına karşı kullanıldığı bilinmektedir.

Bu kapsamda yapılan çalışmalarda mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden proteaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, antioksidan aktivitesi, içeriğinde bulunan amino asitlerin, fenolik bileşiklerin, A vitamini, E vitamini , C vitamini ve B grubu vitaminlerinin miktarları belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Lilium* Bitkisinin Genel Özellikleri

Liliacea familyasından olan *Lilium* cinsi ılıman Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da doğal olarak yayılış gösterir. Dünyada yaklaşık 100'ün üzerinde türü olduğu bilinmekte olup, ülkemizde bu zamana kadar 5 tür, 1 alt tür ve 4 varyetesi tespit edilmiştir (Smyth vd., 1980). Ülkemizde yayılış gösteren *Lilium* türleri şunlardır: *L. Candidum* L., *L. Martagon* L., *L. Carniolicum subsp. Ponticum* (C. Koch) Davis & Henderson, *L. Carniolicum var. Ponticum* (C. Koch) Davis & Henderson, *L. Ciliatum* P.H. Davis, *L. Monodelphum Bieb*, *L. Monodelphum var. szovitsianum* (Fischer & Ave-Lall.) Elwes, *L. Monodelphum var. armenum* (Miscz. ex Grossh.) Davis & Henderson, *L. Kesselringianum* Miscz (Davis, 1984). Bu türlerin çoğu Kuzey Anadolu'da bulunmaktadır. *Lilium* cinsinin Avrupa florasında 10 türü tanımlanmıştır (Tutin vd., 1980). *Lilium candidum* ve *Lilium martagon* türleri hem Türkiye'de hem de Avrupa'da yayılış göstermektedir (Davis, 1984; Tutin vd., 1980). Yine Avrupa florasında bulunan *Lilium carniolicum* Türkiye florasında alt tür olarak tanımlanmış ve iki varyetesi tespit edilmiştir (Davis, 1984). *Lilium carniolicum* türünün Avrupadaki yayılış alanları; Alplerin Güney Doğusu, Balkan Yarım Adası, Kuzey Batı Yunanistan ve Romanya'dır. Balkan Yarım Adası'nda bulunan *Lilium carniolicum* özellikle polimorfik bir türdür (Tutin vd., 1980).

Lilium cinsinin, cins kategorileri sadece türlerin çiçek şekli ve görünüşü esas alınarak oluşturulmuştur (Smyth vd., 1980). Comber adlı bir araştırmacı tarafından bu cins 7 seksiyona ayrılmıştır. Bu seksiyonların oluşturulmasında türlerin çiçek özellikleri, tohum ağırlığı ve çimlenme modelleri, yaprakların düzenlenmesi, soğan büyüklükleri ve bunların özel olarak büyüme ve yetiştirme ortamları dikkate alınmıştır.

Lilium L. soğanlı ve çok yıllık bir bitkidir. Yaprakları saplı, çok sayıda, dağınık dizilişlidir. Yukarıya doğru yaprakların büyüklüğünde bir azalma vardır. Çiçekleri tek veya rasem olup, çiçeğin dış halkalarını oluşturan yaprakları 6 parçalıdır, bu

parçalar serbest bükülmez (sabit) ve petaloittir. Ayrıca periyant parçalarının tabanında nektar izleri de mevcuttur. Meyveler dikdörtgen biçimindedir. Meyve çok tohumlu ± 6 köşelidir ve kapsüldür. Tohumları yassıdır (Davis, 1984).

2.1.1. *Lilium candidum*'un (Mis Zambağının) Genel Özellikleri

Gövdeleri 50-130 cm boyundadır. Çiçekleri huni şeklinde olup karbeyazı renginde ve 2-12 çiçeklidir. Yapraklar spiral dizilişli, parlak ve tüysüdür. Flamentler 45-50, nadiren 57 mm, anterler ise 9-11 mm olup polenleri altın sarısıdır. Stilüs 35-50, nadiren 60 mm uzunluğundadır. Çiçeklenme zamanı Mayıs ayıdır (Davis, 1984).

Bu takson, kumlu ve taşlı topraklarda, yaprağını döken ağaçların bulunduğu taşlı orman alanlarında, otlu, yeşilli ve çimenli yerlerde, 10-1300 m'lerde yayılış gösterir (Davis, 1984).

Lilium candidum çok yıllık bir bitkidir. Çiçekler keskin kokulu, soğan ise sarımsı beyaz renklidir. Bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirildiği gibi Batı Anadolu'da (İzmir, Karaburun, Söke-Bafra Gölü, Marmaris-Bozburun) yabani olarak yetişir. Soğanları dahilen infüzyon halinde (%2), idrar arttırıcı ve balgam söktürücü olarak, haricen ise çıbanları olgunlaştırıcı olarak kullanılmaktadır.

Çiçeklerinden kokulu maddeler elde etmek için, eskiden beri, Batı Anadolu'da geniş miktarda yetiştirilmiştir. Bugün özellikle süs bitkisi olarak yetiştirilmekte ve soğanları dış ülkelere ihraç edilmektedir. Zambak çiçeğinin su buharı distilasyonu ile zambak suyu elde edilir. Haricen cilt lekelerinin ve sivilcelerin tedavisinde kullanılır. Zambak çiçeğinin bir müddet zeytinyağı içinde tutulması ile zambak yağı elde edilir. Koku verici olarak kullanılır. Diğer isimleri; ak zambak, bey zambağı (Marmaris), beyaz zambak ve mis zambağıdır (Baytop, 1984).



Şekil 2.1. *Lilium candidum*

2.2. Proteinler ve Amino Asitler

Proteinler bütün canlı varlıkların en önemli ve hücrelerin de en bol bulunan organik bileşikleridir. Bütün biyolojik olaylarda hayati görevleri vardır. Farklı biyolojik fonksiyonlarından en önemlileri şöyle sıralanabilir:

Enzimatik katalizleme: Biyolojik sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların hemen hemen tamamı enzim adı verilen spesifik makromoleküller tarafından katalizlenmektedir. Bu reaksiyonlardan bazıları, CO₂'nin H₂O ile birleşmesi gibi oldukça basit olmasının yanı sıra bazıları da mesela bir kromozomun tamamının eşleşmesi (replikasyon) gibi son derece karmaşıktır. Enzimlerin olağanüstü bir katalizleme gücü vardır. Bugün 2000 civarında enzim tanımlanmış olup, bazı katalitik RNA molekülleri hariç olmak üzere hepsinin de protein yapısında olduğu ortaya konulmuştur.

Taşıma ve depolama: Birçok küçük molekül ve iyonlar spesifik proteinler tarafından taşınmakta ve depolanmaktadır. Mesela, oksijen transportu kanda hemoglobinle gerçekleşirken, depolanması kaslarda miyogloblin tarafından sağlanır. Demir kan dolaşımında transferrin proteini tarafından taşınırken, yine karaciğerde ferritin adı verilen bir başka proteinle kompleks oluşturarak depolanır.

Mekanik hareket: Proteinler, kasların en başta gelen bileşenleridir. Kas kasılması iki çeşit lif yapısındaki proteinlerin kayma hareketiyle ortaya çıkmaktadır. Mitoz olayında kromozomların hareketi de bir takım proteinler sayesinde olmaktadır.

Mekanik destek: Deri ve kemik dokularının gerilmeye dayanıklılığı, fibröz bir bağ dokusu proteini olan kollagen tarafından sağlanmaktadır. Yine saç, kıl, tırnak, yün, pençe ve kaplumbağanın kabuğu gibi destek ve koruyucu yapılar α -keratin grubu proteinlerden oluşur.

Koruma: Antikorlar, vücuttaki virüs, bakteri ve diğer organizma hücreleri gibi yabancı maddeleri tanıyan ve onlara bağlanarak dolaşımdan uzaklaştırılmalarını sağlayan çok spesifik proteinlerdir. Ayrıca, kanama anında pıhtılaşmayı (koagülasyonu) sağlayan koagülasyonun faktörlerinin tamamına yakını protein yapısındadır.

Sinir uyarılarının üretimi ve iletimi: Spesifik uyarılara karşı sinir hücrelerinin cevabı reseptör proteinler aracılığı ile olmaktadır. Mesela, rodopsin, retinal çubuk

hücrelerinin fotoreseptör (ışık algılayıcı) proteindir. Sinir hücrelerinde uyarıları iletme görevini üstlenen reseptör molekülleri de protein yapısındadır.

Hormonlar: Metabolizma olaylarının koordineli biçimde yürümesini sağlayan hormonların büyük bölümü protein yapısındadır. Bunun yanı sıra bütün hormonlar, hedef hücrelerinde protein yapısında olan reseptör moleküllere bağlanarak etkilerini gösterirler.

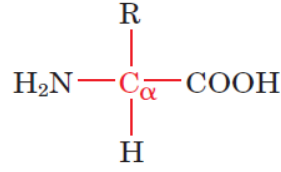
Büyüme ve farklılaşmanın kontrolü: Hücre çekirdeğindeki genetik bilginin kontrolü ve sıra ile ifadesi gerekir. Herhangi bir anda hücre genomunun belirli bir kısmı ifade edilir. Bakterilerde repesör (baskılayıcı) proteinler, hücre DNA'sının spesifik bölgelerinin ifade edilmeden kalmasını sağlayan kontrol molekülleridir (Keha ve Kührevioğlu, 2011).

Proteinler molekül ağırlıkları 5-10 binden birkaç milyona kadar değişen büyük moleküllerdir. Bazı proteinlerin molekül ağırlıklarına örnek olarak insülin 5500; ribonükleaz 13.700; tripsin 23.800; hemeglobin 68.000; fibrinojen 450.000; tiroglobin 630.000 ve virüsler birkaç milyon şeklinde verilebilir.

Proteinlerin %50'si karbon, %7'si hidrojen, %23'ü oksijen, %16'sı azot ve %0-3'ü kükürtten ibarettir. Bunların yanı sıra fosfor, demir, iyot, bakır, çinko ve mangan gibi bazı elementler de bir takım spesifik proteinlerde bulunur (Lehninger, 2005).

2.2.1. Amino Asitler

Basit proteinler asit, baz veya enzimler tarafından hidroliz edildikleri zaman, yapı taşları olan α -amino asitlere parçalanır. α -amino asitler, α -karbon atomuna bir amino grubu ($-\text{NH}_2$), bir karboksil grubu ($-\text{COOH}$), bir hidrojen atomu ($-\text{H}$) ve bir yan grubun ($-\text{R}$) bağlanmasıyla ortaya çıkan bileşiklerdir. α -amino asitler, birbirlerinden farklı R grubu ihtiva ederler. Buradaki R, organik kimyadaki alkil grubu anlamında olmayıp, α -karbona bağlı herhangi bir dördüncü yapıyı ifade etmektedir. Amino asitlerin iyonlaşmamış halde genel formülleri Şekil 2.2.'de verilmiştir. R- grubunun H dışındaki durumlarında α -karbon atomu asimetric olduğundan, amino asitler optikçe aktiftir. Birbirinin ayna görüntüsü olup, D- ve L- izomerleri adı verilen iki şekli vardır. Yalnız L-amino asitleri proteinlerin yapısında yer alır (Voet ve Voet, 2011).



Şekil 2.2. Amino asitlerin genel yapısal formülü

Proteinler, şekil, büyüklük, yük, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve kimyasal aktivite yönünden birbirlerinden farklı R gruplarını bulunduran 20 çeşit amino asidi içerir. Gerçekten bakteriden insana kadar bütün türlerin, proteinleri aynı 20 amino asitten yapılmış olup, bu protein alfabesi yeryüzünde hayatın başlangıcından beri geçerliliğini sürdürmektedir. Proteinlerin birbirinden son derece farklı fonksiyonları, aynen ciltler dolusu kitabın 29 harften yazılması gibi, sözü geçen amino asitlerin değişik dizilişleri ile ortaya çıkmaktadır (Lehninger, 2005).

Amino asitlerin en basiti glisindir ve R grubu yerinde hidrojen atomu yer alır. Bu yüzden α -karbonu asimetric değildir. Alanin ise yan grup olarak metil ihtiva eder. Hidrokarbon yapısında yan gruplara sahip diğer amino asitler ise, valin, lösin, izolösin ve prolindir. Bununla beraber prolin, diğer amino asitlerdeki primer amino grubu yerine sekonder amino grubu taşıdığından, aslında bir imino asittir. Prolindeki R grubu, hem α -karbonuna, hem de amino grubuna bağlanarak halkalı bir yapı oluşturur (Keha ve Kührevioğlu, 2011).

Serin ve treonin amino asitleri, alifatik hidroksil grupları içerir. Protein yapısındaki sözü geçen hidroksil gruplarının, biyolojik fonksiyon açısından, çok büyük önemi vardır.

R grubu aromatik benzen halkası içeren amino asitler üç tanedir: Fenilalanin, tirozin ve triptofan.

Yan gruplarında birer kükürt atomu taşıyan iki amino asit vardır: sistein ve metiyonin. Sistein protein yapısında çapraz disülfid kovalent bağlarını oluşturur. Metiyonin de yapısında tiyoeter grubu bulundurur ve protein sentezi ile metilasyon reaksiyonlarında önemli rolleri vardır.

Glisin, alanin, valin, lösin, izolösin, prolin, serin, treonin, fenilalanin, tirozin, triptofan, sistein ve metiyonin amino asitlerinin yan zincirleri fizyolojik pH'da yüksüzdür. Bunlardan yalnız tirozin ve sisteinin R grupları fizyolojik pH dışında

iyonlaşabilir. Serin, treonin ve tirozin haricindeki amino asitler apolar, yani hidrofobik yan zincirlere sahiptir. Burada, polar-apolar kavramları tam olarak kimyadaki dipol moment kavramları ile ($\mu=0$ ise apolar, $\mu>0$ ise polar) örtüşmemektedir. Apolar R grubuna sahip olmak demek, genellikle o amino asidinin proteinlerin globüler yapısında molekülün sudan kaçan iç kısmında yer alması anlamındadır.

Fizyolojik pH'da pozitif yan gruplara sahip amino asitler üç tanedir: lisin, arginin ve histidin. Bunlara bazik amino asitleri de denilir. Bunlardan aromatik özellikteki imidazol halkasına sahip olan histidin fizyolojik şartlarda yerleşim çevresine göre bazen pozitif yüklü bazen de yüksüzdür.

R grupları negatif yüklü, yani asidik olan amino asitleri glutamik asit ve aspartik asittir. Fizyolojik pH'da amino asitler negatif yüklü olduklarından, asit isimlerinden ziyade tuz, yani anyon isimleri ile anılırlar: aspartat ve glutamat gibi. Aspartat ve glutamatın R gruplarındaki karboksil üzerinden amid türevleri ise yüksüz olup, NH_4^+ iyonunun taşınmasında rol alır. Bu türev amino asitler asparagin ve glutamindir (Keha ve Kührevioğlu, 2011).

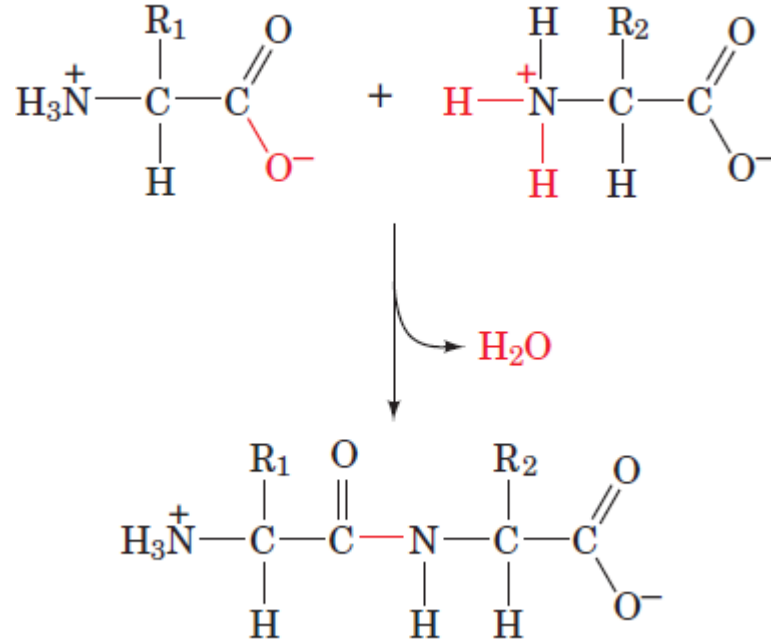
Bu amino asitlerin yanı sıra farklı hücre ve dokularda serbest veya birleşmiş olarak 300'den fazla çeşitte amino asitlere rastlanmıştır. Çoğu α -amino asidi olmasına rağmen β -, γ - ve δ -amino asitler de bilinmektedir. D-Glutamat gibi D-izomeri amino asitleri de bakteri hücre çeperinde bulunabilmektedir. β -Alanin, bir vitamin olan pantotenik asidin başlangıç bileşiği iken, sitrülün ve ornitin, hem üre devrinin ara bileşikleri, hem de arginin sentezinin ön maddeleridir. Protein yapısına girmeyen bazı diğer amino asitler de, γ -aminobütirik asit gibi, sinir uyarılarının iletiminde görev yaparlar (Keha ve Kührevioğlu, 2011; Lehninger, 2005; Voet ve Voet, 2011).

Mantarlar ve yüksek bitkiler, çoğunun fonksiyonları bilinmeyen çok sayıda ve bazıları çok değişik şekillerde amino asitler içermektedir. Bazıları bitkiler dışındaki canlılar için zehirlidir. Örneğin, kanavanin, dijenkolik asit ve β -siyanoalanin gibi.

2.2.2. Peptid Bağı ve Özellikleri

Proteinler, amino asitlerin birbirine bağlanması sonucu oluşur. Bu ise bir amino asidin α -karboksil grubu ile diğer amino asidin α -amino grubu arasında bir H_2O

molekölünün ortaya çıkmasıyla oluşan kovalent bir bağla gerçekleşir. Bu bağa peptid bağı denir. Peptid bağı bir çeşit amid bağıdır (Keha ve Kührevioğlu, 2011).



Şekil 2.3. İki amino asidin birleşmesiyle peptid bağı oluşumu

İki amino asidin birleşmesiyle oluşan bu bileşik bir dipeptid olup, tripeptid, tetrapeptid, pentapeptid vs. isimleri de üç, dört, beş, vs. amino asit içeren peptid zincirlerine denilir. Çok sayıda amino asidin meydana getirdiği uzun peptid zincirlerine polipeptid zinciri veya protein adı verilir. Bir polipeptid zincirinin serbest halde bir amino (-NH₂) bir de karboksil (-COOH) ucu vardır (Voet ve Voet, 2011).

Peptid zinciri, düzenli şekilde tekrar eden atomlardan (α -C, karboksil C, amino N) oluşan bir omurgaya sahiptir ve bu omurga her uzunluktaki protein zincirinde aynıdır. Yan gruplar bu omurganın çevresinde yer alır. Bir protein zinciri üzerinde amino asitler arasında peptid ve disülfid bağlarından başka kovalent bağlanma yoktur.

Proteinlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi belirli ve kararlı bir üç boyutlu yapıya sahip olmalarıdır. Gevşek veya gelişigüzel bir polipeptid zinciri için biyolojik aktiviteden bahsedilemez. Fonksiyon görebilme yeteneği proteinin belirli bir konformasyonundan, yani, fizyolojik şartlarda proteini oluşturan üç boyutlu uzayda belirli bir yapı içinde düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır. Amino asitlerin sıralanışı bir proteinin konformasyonundan birinci dereceden sorumludur.

1930'ların sonlarında, Linus Pauling ve Robert Corey, amino asitler ve peptidlerin yapılarını tam olarak ortaya koyabilmek için, X-ışını kristallografisi çalışmalarına başladılar. Amaçları peptid zincirlerinde bağ uzunlukları ve bağ açıları hakkında bir takım bilgiler elde etmek ve bunları protein konformasyonu üzerindeki yorumlamada kullanmaktı. Buradaki önemli buluşlardan birisi peptid bağının dönmeyen (rijid), düzlemsel bir yapıya sahip olması, diğeri de azota takılı hidrojen ile karbonil oksijenin trans konfigürasyonda bulunmasıdır (Keha ve Kührevioğlu, 2011).

2.2.3. Proteinlerin Yapısı

Sadece amino asitlerden oluşan bir protein molekülü her zaman biyolojik aktivite göstermeyebilir. Biyolojik fonksiyonunu yerine getirebilmek için bazen amino asit yapısında olmayan metal iyonları, karbohidratlar, lipidler, koenzimler, porfirin halkaları vs. gibi kimyasal birimlerle birleşir, bazen de birden fazla polipeptid zinciri bir araya gelerek belirli bir biyolojik görevi üstlenir. Örneğin kanda O₂ taşınmasını üstlenen hemoglobin, dört polipeptid zincirinden ibarettir. Bu tip proteinlerde zincirlerin her birine alt birim adı verilir. Hemoglobin dört alt birimin yanı sıra her bir alt biriminde, porfirin halkası ve demir iyonundan ibaret hem grubu adı verilen bir gruptan da dört adet içerir. Proteinlere yapışık olan bu tür yapılara prostetik grup adı verilir (Lehninger, 2005).

Yüzlerce amino asidin oluşturduğu protein molekülünün sulu çözelti içinde düz bir zincir halinde kalması mümkün değildir. Amino asitlerin yan grupları ve polipeptid zinciri üzerindeki polar bölgeler arasında bir takım etkileşimler vardır. Pauling ve Corey birçok polipeptid konformasyonunu, moleküler modellerini yaparak değerlendirdiler. Bu değerlendirmeye dayanarak iki tip periyodik polipeptid omurga yapısı olabileceğini ileri sürdüler. Bunlar α -sarmalı ve β -kırmalı tabaka yapılarıdır. (Keha ve Kührevioğlu, 2011).

α -sarmalı, çubuksu bir yapıdır. Sıkıca sarılmış polipeptid omurgası çubuğun iç kısmını teşkil ederken, R grupları da bir sarmal düzeninde dışarıya doğru uzanırlar. α -sarmalı, zincir omurgası üzerindeki NH ve CO grupları arasında oluşan hidrojen bağları ile stabilize edilirler. Her bir amino asidin -CO grubu, sıralanışta kendisinden dört rezidü sonra gelen amino asidin -NH grubuna hidrojen bağıyla bağlanır. Bu

şekilde protein omurgası üzerinde bulunan bütün CO ve NH grupları hidrojen bağları oluşturabilir.

β - kırmalı tabaka ise α -sarmalının çubuksu yapısının aksine tabaka halindedir. Polipeptid zinciri α -sarmalında olduğu gibi sıkı sarılmış halde değil tamamen uzamış yapıdadır. Bir diğer fark da β -kırmalı tabakanın farklı polipeptid zincirlerindeki NH ve CO grupları arasındaki hidrojen bağlarıyla stabilize edilmesidir. α -sarmalında ise hidrojen bağları aynı zincir üzerindeki peptid grupları üzerindedir. Bir β -kırmalı tabakada bitişik zincirler aynı (paralel) veya zıt (antiparalel) yöndedir. Antiparalel yapılardaki H-bağları nispeten doğrusal olduğundan, bu yapı daha karardır (Lehninger, 2005).

Üçüncü tip periyodik motif de kollagen sarmalıdır. Bu yapı deri, kemik ve eklemlerin başlıca proteini olan kollagenin yüksek gerilme gücünü sağlayan özelliğini verir. Kollagen moleküllerinde glisin tüm amino asitlerin üçte biri kadardır. Yine diğer proteinlerde görülmediği şekilde fazla miktarda prolin içerirler. Bunların yanında 4-hidroksiprolin ve 5-hidroksilislin amino asitlerinin de bol olması kollagen proteinlerinin bir karakteristiğidir. Bu yapıda üç polipeptid zinciri birbiri üzerine sarılmıştır. Her bir zincirin sarmal motifi α -sarmaldan tamamen farklıdır. Bu yapıyı stabilize eden hidrojen bağları, zincirlerin birisinin üzerindeki glisinin NH grupları ile bir diğer zincir üzerindeki amino asitlerin CO grupları arasında oluşur. Kollagen sarmalının kararlılığı prolin ve hidroksiprolin rezidülerinin kilitleme özelliğine ve yine hidroksiprolin üzerindeki hidroksil grubunun hidrojen bağı yapabilmesine de bağlıdır.

Proteinler, biyolojik fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için gerekli olan üç boyutlu şekillerini, dört basamakta kazanırlar:

1. Primer yapı: Bir proteindeki amino asitlerin sıralanışıdır ve proteinin omurgasını oluşturur. Bu yapı DNA'daki baz dizilişi tarafından şifrelenir ve proteininin üç boyutlu aktif konformasyonunu belirleyen en önemli unsurdur.

2. Sekonder yapı: Lineer dizilişte birbirine yakın amino asit rezidüleri arasındaki etkileşmeler sonucu meydana gelir. Bu etkileşmelerin bazıları periyodik ve düzenli bir özelliktedir. Örneğin α -sarmal, β -kırmalı tabaka ve kollagen sarmalı bu yapıya dahildir. Bir protein zincirinin bazı bölgelerinin maruz kaldığı bu yapılanmayı

hidrojen bağları oluştururken, amino asitlerinin R gruplarından kaynaklanan etkileşmelerde bu yapının proteinin hangi bölgelerinde olacağını belirler.

3. Tersiyer yapı: Lineer dizilişte birbirinden uzak noktadaki amino asitler arasındaki sterik etkileşmelerle ortaya çıkar. Bir protein zinciri içindeki kararlı katlanmalar sonucu, lineer dizilişte birbirlerinden uzakta olan amino asit rezidüleri bir araya gelir ve proteinin aktif bölgesini de oluşturur. Tersiyer yapıda belli bir düzenlilik ve periyodik şekil göze çarpmaz. Disülfid bağı bu yapıyı daha kararlı hale getirir.

4. Kuarterner yapı: Bu yapıya ise birden fazla polipeptid zincirine sahip oligomerik proteinlerde rastlanır. Polipeptid alt birimleri, sekonder ve tersiyer yapıları meydana getiren sterik etkileşmelerle oluşan bağlar vasıtasıyla bir arada tutulur (Keha ve Kührevioğlu, 2011; Lehninger, 2005; Voet ve Voet, 2011).

2.3. Enzimler

Enzimler, kimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Organizmalar hayatlarını sürdürebilmeleri için kendi kimyasal reaksiyonlarını seçici ve yeterli bir şekilde katalizleme yeteneğine sahip olmalı. Kataliz reaksiyonları olmadan yıllarca sürebilecek kimyasal reaksiyonlar katalizörler varlığında saniyeler içinde gerçekleşebilir. Enzimler benzer substratlar arasında inanılmaz derecede seçim yapabilen, reaksiyonun gerçekleşme hızını reaksiyon türüne göre yaklaşık 10^8 - 10^{20} kat kadar arttırabilen özgül biyomoleküllerdir. Bu nedenle hücredeki birçok reaksiyonun ancak enzimler sayesinde gerçekleşebileceği söylemek hiç de yanlış olmaz (Koolman ve Röhm, 2003; Lehninger, 2005).

Biyokimya tarihinde araştırmaların büyük bir bölümünü enzimler üzerindeki çalışmalar oluşturmuştur. Kataliz olayı ile ilgili ilk önemli denemeler 1760-1825 yılları arasında midedeki enzimatik sindirim üzerinde yapılmıştır. Belirli bir enzim üzerindeki ilk çalışma 1835 yılında İsveçli Kimyager S. S. Berzelius tarafından gerçekleştirmiş ve diastazın nişastayı “in vivo” olarak sülfürik asitten daha yüksek verimle hidrolizlediğini göstermiştir. 1860 yılında L. Pasteur fermantasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü deneylerle ispat etmiş bu nedenle enzimler için ferment

terimi kullanılmaya başlanılmıştır. Fakat, Pasteur enzimlerin sadece canlı hücre yapısı içinde görev yapabildiklerini zannetmiştir (Lehninger, 2005).

1897 yılında Eduard Buchner maya özütlerinin şekeri alkole dönüştürdüğünü ve bunun da hücrede dışında da işlevine devam eden moleküller tarafından sağlandığını keşfetmiştir. Frederic W. Kühne bu molekülleri enzimler olarak adlandırmış ve böylece yeni enzimlerin izolasyonu ve özelliklerinin araştırılması üzerine çalışmalar hız kazanmıştır (Lehninger, 2005).

Enzimoloji alanındaki en önemli gelişme 1926 yılında J. B. Sumner tarafından yapılan deney ile ortaya çıkmıştır. Sumner yaptığı çalışmalarda üreaz enzimini “Jack Bean” bitkisinden elde edip, kristallendirildikten sonra protein yapısında bir bileşik olduğunu ortaya çıkarmıştır. Önceden şüphe ile karşılanan bu sonuç 1930-1936 yılları arasında J. Nortrop’un pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristallendirmesi ve protein yapısında olduklarını kesin olarak ortaya çıkarması ile doğrulanmıştır. (Voet ve Voet, 1995).

Enzimlerin büyük bir çoğunluğu protein yapısındadır. Bir kaçı ise ribonükleoprotein veya ribonükleik asitlerdir. Katalitik mekanizma enzim ile substratın birbirine bağlandığı ve kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği göreceli olarak küçük olan aktif bir bölgede gerçekleşir. Enzimatik reaksiyonlarda ki temel olaylar enzim ve substratın direkt ve dinamik etkileşiminin gerçekleştiği bu bölgede meydana gelir. Aktif bölgede dipolar, elektrostatik, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları oluşur. Fonksiyonel gruplar içeren aminoasitlerin yan zincirleri glutamat, aspartat, lizin, histidin, arginin, serin, treonin, trozin ve sistein dizilerinin karboksi, amino, imidazol, hidroksi ve tiol grupları ile kimyasal katalizi gerçekleştirir. Bu fonksiyonel gruplar enzim ile substrat arasında elektrostatik etkileşmeyi sağlar, hidrojen bağları oluşturur ve bu şekilde asit-baz, nükleofilik, elektrofilik katalizi meydana getirir (Frey ve Hegeman, 2007).

Bazı enzimler katalizleme fonksiyonlarını yalnız protein yapılarıyla yerine getirirken, bazıları da protein yapısında olmayan “kofaktör” adı verilen gruplar varlığında yerine getirirler. Kofaktör bir metal iyonu (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+}) olabildiği gibi, “koenzim” denilen kompleks bir organik bileşik de (NAD^+ , FAD^+ , koenzim A) olabilir. Bazen aktivite için her ikisi de gerekebilir. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler Çizelge 2.1’de gösterilmiştir. Koenzimler ise

geçici taşıyıcı olarak işlev yaparlar ve çoğunlukla vitaminlerden türerler. Çizelge 2.2’de taşıyıcı olarak görev yapan bazı koenzimler ve transfer ettikleri gruplar verilmiştir (Lehninger, 2005; Voet vd., 1995).

Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken kofaktörler sıcaklığa dayanıklıdır. Katalitik olarak aktif olan enzim-kofaktör kompleksine “haloenzim” adı verilir. Kofaktörü kendisinden uzaklaştıran enzim aktitesini kaybeder. Enzimin yalnız protein kısmını içeren bu yapıya apoenzim veya apoprotein adı verilir (Onat ve Emerk, 1997).

Çizelge 2.1. Enzimler için kofaktör olarak görev yapan bazı inorganik elementler

Cu^{2+}	Sitokrom oksidaz
Fe^{2+} ve Fe^{3+}	Sitokrom oksidaz, Katalaz, Peroksidaz
K^{+}	Piruvat kinaz
Mg^{2+}	Hekzokinaz, Glukoz 6- fosfataz, Piruvat kinaz
Mn^{2+}	Arjinaz, Ribonükleotit redüktaz
Se^{2+}	Glutasyon peroksidaz
Zn^{2+}	Karbonik anhidraz, Karboksipeptidaz

Çizelge 2.2. Taşıyıcı olarak görev yapan bazı koenzimler

Koenzim	Tranfer edilen grup	Besin öncüsü
Biyositin	CO_2	Biyotin
Koenzim A	Açıl grupları	Pantotenik asit
FAD	Elektronlar	Riboflavin (B_{12} vitamini)
NAD^{+}	Hidrit iyonu (H^{-})	Nikotik asit (Niyasin)
Pridoksal fosfat	Amino grupları	Pridoksin (Vitamin B_6)
Tetrahidrofolat	Tek karbonlu gruplar	Folat
Lipoamit	Elektronlar ve açıl grupları	
Tiamin pirofosfat	Aldehitler	Tiamin (Vitamin B_1)

Birçok inorganik katalizör işlev gördükleri maddeler üzerinde çok az spesifik iken enzimler çok daha spesifiktir. Enzimlerin belirli bileşik ve benzer bileşik grupları üzerine etkili olup, başka bileşiklerle reaksiyon vermemesine enzim spesifikliğı denir. Bazı enzimler çok dar bir spesifiklik aralığına sahipken, özellikle grup reaksiyonlarını katalizleyen enzimler daha geniş bir spesifiklik aralığı gösterirler. Örneğin üreyi karbondioksit ve amonyağa parçalayan üreaz enzimi üre için mutlak bir spesifiklik gösterirken bir ince bağırsak proteazı olan kimotripsin ise substratına karşı çok daha az spesifiktir. Bu enzim için peptid bağımlı oluşturan diğer amino asitin hangisi olduğu önemli değildir. (Altan, 2000; Tekman ve Ömer, 1981).

Enzimler; enzim katalizli reaksiyonlarda ΔG 'yi düşürerek reaksiyonun gerçekleşmesini kolaylaştırır. Substratın ürüne dönüştüğü geçiş aşamasında ihtiyaç duyulan ortamı yaratır, aktivasyon enerjisini düşürürler. ES kompleksini oluşturmak için geçici olarak substrat ile reaksiyona girer ve reaksiyonun gerçekleşebilmesi için alternatif bir yol üretir. Substratı reaksiyon için uygun bir hale getirerek reaksiyonun entropisini düşürürler (Fersht, 1985).

Bir enzimin aktivitesini ifade etmek için IU (International Unit) tanımlaması kullanılır. Bir ünite enzim (EU), bir dakikada 1 μmol substratı ürüne dönüştüren veya 1 μmol ürün oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak ifade edilir. Enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan bir diğer birim spesifik aktivitedir. Spesifik aktivite 1 mg protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır.

$$\text{Enzim Ünitesi (EU)} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{L.dak}}$$

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{EU}}{\text{mg protein}}$$

Enzim katalizli reaksiyonların hızlarına etki eden faktörleri; pH, sıcaklık, iyonik şiddet, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, ortamda bulunan aktivatör ve inhibitörler olarak sıralayabiliriz.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'sı denir. Enzim çalışmalarında hidrojen iyonunun konsantrasyonunu elverişli durumda tutmak için tamponlar kullanılır (Özata ve Kutlu, 2000).

Enzimler ortamın asidik veya bazik olmasına karşı duyarlıdırlar. Örneğin pepsin pH:1,5-2,5 arasında en yüksek aktiviteye sahiptir. Enzimlerin çoğu pH'nın 1'e kadar

düşmesine veya 11'e kadar yükselmesine dayanamaz ve aktivitelerini kaybederler (Keskin, 1987).

Enzimatik reaksiyonlar için sıcaklığın etkisi değişkendir. Sıcaklık enzimatik reaksiyonun hızını yükseltir. Ancak enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapılı olduğundan sıcaklık yükseldiğinde denatüre olurlar ve aktivite göstermezler. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığa optimum sıcaklık denir (Özata ve Kutlu, 2000).

Enzimler 6 ana grup olarak sınıflandırılır:

1. Oksidoredüktazlar: Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize ederler. Substratları genellikle elektron ve hidrojen donörlerdir.

2. Transferazlar: Grup transfer reaksiyonlarını katalizlerler. P, C, N taşıyan bir fonksiyonel grup donörden bir akseptöre taşınır.

3. Hidrolazlar: Eter, ester, peptit, glikozit, anhidrit bağlarını hidrolitik olarak yıkan enzimlerdir. Proteolitik enzimler, nükleazlar, lipazlar, fosfatazlar ve glikozidazlar bu enzim grubuna dâhildir.

4. Liyazlar: Bir molekülden bir grubun ayrılarak çift bağ oluşturduğu ya da çift bağ içeren moleküllere başka grupların bağlanmasıyla bağın ortadan kalktığı reaksiyonları katalizlerler.

5. İzomerazlar: Mutaz, epimeraz, rasemaz özel adları ile verilen bu enzimler geometrik, optik ve yapısal izomerlerin birbirlerine dönüşüm reaksiyonlarını katalizlerler.

6. Ligazlar: Bir bağın kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla, iki metabolitin bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Kührevioğlu, 2005).

Hücre içinde enzimin katalizlediği reaksiyonun hızının belirlenmesi, metabolizmanın düzenlenmesindeki kontrol mekanizmalarının belirlenmesi, farklı organizmalarda ve dokulardaki izoenzimlerin karşılaştırılması, enzimin aktif bölgesindeki aminoasitlerin ve yan grupların belirlenmesi, aktivatör ve inhibitör olarak görev yapabilecek maddelerin saptanması enzimin kataliz mekanizmasını aydınlatmaya yardımcı olur (Temizkan ve Arda 2008).

Bir enzimatik tepkimenin maksimum hızını (V_{max}) bulmak için substrat konsantrasyonunu arttırmak ve bu şekilde serbest enzimlerin (E), substrata bağlanmış (ES) kompleksine dönüştürülmeleri gerekir. Enzimin maksimum hızında ES kompleksinin miktarı toplam enzim miktarına eşittir. Enzimin maksimum hızının yarısına ulaşması için gereken substrat miktarı Michaelis-Menten sabiti (K_M) olarak bilinir ve aynı zamanda K_M sabiti enzimin substratına olan ilgisinin bir ifadesidir. Diğer önemli bir parametre olan k_{cat} ise bir saniyede aktif bölgede değişime uğrayan substrat molekülü sayısını ifade eder.

İnhibitor, enzim katalizli meydana gelen reaksiyonların hızlarını azaltan veya reaksiyonları tamamen durduran küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzim inhibisyonu dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. İnhibitör enzime kovalent olarak bağlanır veya enzimle zor ayrışabilen bir kompleks oluşturursa bu dönüşümsüz inhibisyona örnek olur. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} azalır, K_M değişmeden kalır (Altan 2000).

Dönüşümlü inhibisyonda inhibitör ile enzim etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Yarışmalı, yarışmasız, yarı yarışmalı ve karışık tip inhibisyon olmak üzere 4 kısımda incelenir.

Yarışmalı inhibisyonda, substrat ile inhibitör enzime bağlanmak için bir yarış içerisindedir. İnhibitör yapısal olarak substrata benzer ve enzim üzerinde substratın bağlanabildiği bölgelere bağlanır. İnhibitörle substrat aynı anda enzime bağlanamaz. Substrat ile inhibitörün enzime bağlanması bir denge reaksiyonu olduğundan substrat konsantrasyonunun artırılması inhibisyon etkisini düşürür. Yarışmalı inhibisyonda maksimum reaksiyon hızı değişmez (V_{max}), ancak maksimum hıza ulaşmak için substrat konsantrasyonunun artırılması K_M değerinin artmasına neden olur (Price 1979).

Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör serbest enzim yerine ES kompleksine bağlanır. Oluşan EIS kompleksi enzimatik olarak inaktif olur. Bu inhibisyon çeşidine nadiren rastlanır, ancak multimerik enzimlerde görülebilir. EIS kompleksi ortamda sürekli olarak vardır ve bu V_{max} 'ın düşmesine neden olur. ES kompleksi miktarının azalması da K_M 'nin düşmesine yol açar.

Yarışmasız inhibitörler substratla aynı anda enzime bağlanabilir, fakat inhibitörün bağlandığı yer enzimin aktif bölgesi değildir. Oluşan hem EI hem de EIS

kompleksleri enzimatik olarak inaktiftir. Yüksek substrat konsantrasyonunda bile enzimden ayrılmayan inhibitör V_{max} değerini düşürür. Substrat enzime yüksek inhibitör konsantrasyonlarında bile bağlı olduğundan K_M değeri değişmeden kalır.

Karışık inhibisyon, yarışmasız inhibisyona benzer, ancak EIS kompleksi düşük de olsa enzimatik aktiviteye sahiptir. Bu tip inhibisyon çeşidi Michaelis-Menten eşitliğine uymaz.

Birçok organizmada inhibitörler feedback mekanizmasının bir parçası olarak görev alabilirler. Eğer bir enzim organizmada bir maddeden aşırı miktarda üretirse, aşırı miktarda üretilen madde bu maddeyi üreten enzimin inhibitörü gibi davranır ve bu şekilde aşırı bir üretimin önüne geçilmiş olur. Multienzim sistemleri reaksiyon hızlarını düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerde reaksiyonun son ürünü, konsantrasyonu belirli bir düzeye geldiğinde sistemin ilk enzimini veya enzim sistemindeki dallanma noktasındaki enzimi inhibe ederek feedback inhibisyonunu gerçekleştirir (Lehninger, 2005; Karlson vd., 1998; Bingöl 1983).

İnsanlar daha ilk çağlardan beri ekmek, şarap gibi gıda maddelerinin hazırlanmasında ve ilaç olarak farkında olmadan enzimlerden faydalanmışlardır. Enzimler, biyokimya bilim alanında geçmişte olduğu gibi günümüzde de en fazla araştırma yapılan konu olup, gelişen teknoloji sayesinde birçok endüstriyel alanda kendisine yer bulmuştur (Telefoncu, 1986; Harper, 1975; Onat ve Emerk, 1997).

Dünya genelinde mevcut endüstriyel enzim pazarı yaklaşık 2 milyar USD dolayında tutarla en yaygın tüketim alanlarından. Gıda, deterjan, kozmetik ve nişasta endüstrileri, endüstriyel enzim üretiminin %75'ini kullanmaktadır ve proteaz, amilaz, lipaz, selüloz, pektinaz gibi hidrolazlar en yaygın kullanılan enzim gruplarıdır.

2.3.1. Proteaz enzimi

Hidrolazlar ana grubuna dahil olan proteazlar (3.3.1.1), proteolitik enzimler olarak da bilinir. Proteazlar proteinlerin, peptitlere ve aminoasitlere hidrolizini katalizler. Endüstriyel kullanım potansiyelleri nedeniyle önemli bir enzim grubudur ve dünyada enzim pazarının %60'ına sahiptirler (Çalkı, 1999; Kalisz, 1988; Rao vd., 1998).

Proteazlar bitkilerden, hayvanlardan ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilir. Günümüzde hayvanlardan insanlara geçen bazı hastalıkların var olmasından dolayı

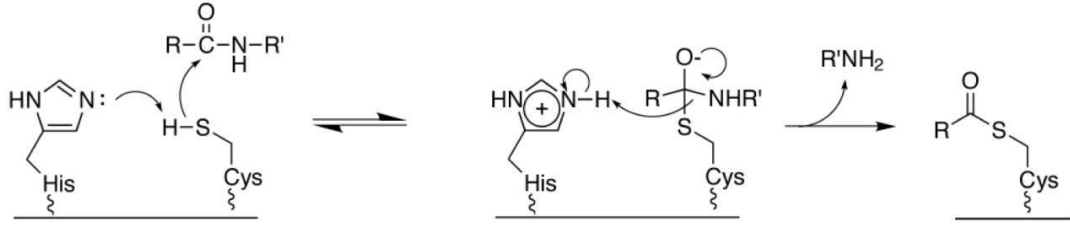
(SARS, deli dana, kuş gribi vs.), hayvansal proteazların özellikle gıda maddesi yapımında kullanımı konusunda kuşular oluşmuştur. Bundan dolayı araştırmacılar yeni bitkisel proteaz kaynakları aramaya yönelmişlerdir (Demir vd., 2005).

Proteazlar aktif oldukları bölgelere göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Reaksiyon mekanizmalarına göre ise sistein proteazlar, serin proteazlar, metalo proteazlar ve aspartik proteazlar olmak üzere dörde ayrılırlar. Serin ve sistein proteazlar nükleofilik olarak substrata saldırırken metalo ve aspartik proteazlar su moleküllerini aktive ederek peptid bağlarını parçalarlar (Barrett vd., 1998; Dubey vd., 2003).

Sistein proteazlar nükleofilik katalizörler gibi sistein kalıntıları ile birleşen peptid hidrolaz aileleri, kaspaz ailesi ve papain ailesini içerir. Bitkisel kaynaklı bir enzim olan papain, mekanik açıdan en kapsamlı incelenmiş papain türüdür. Papain bitkisel kaynaklı bir enzim olmasına rağmen, papain benzeri birçok enzim hayvanlarda da bulunur (Barrett vd., 1998).

Peptidazlar arasında bleomisin hidrolaz, katepsinler ve ubiquitin C-terminal hidrolazlar papain ailesindedir (Barrett vd., 1998). Kaspaz ailesi, diğer proteazlardan fonksiyonel aspartat sitelerinin varlığıyla ayrılan, apoptozis üzerindeki önemli rolünden dolayı hala üzerinde çalışılan ve kalsiyum-bağımlı sistein proteazlardır. Sistein proteazlar, ilaç endüstrisinde önemli bir hedef haline gelmiştir (Lecaille vd., 2002). Tüm sistein proteazların çalışma mekanizmasının benzer olduğu düşünülmektedir ve papain üzerinde yapılan yoğun çalışmalar proteazlar için önemli bir örnektir.

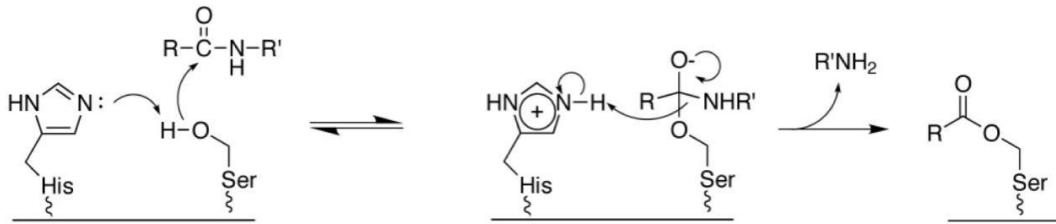
Papain (EC 3.4.22.2), 212 aminoasitten oluşan, papayadan izole edilmiş monomerik bir enzimdir ve peptidaz aktivitesi mekanizması, tripsin ve kimotripsin gibi proteazlara göre daha az bilinir (Glazer and Smith 1971). Papain, kimotripsin gibi ester ve tiyoester hidrolizini katalize eder. Papain iyodoasetat içeren alkilleyici ajanlar üzerindeki hassasiyeti yüzünden sistein kalıntılarına ihtiyaç duyar.



Şekil 2.4. Sistein proteazların genel reaksiyon mekanizması

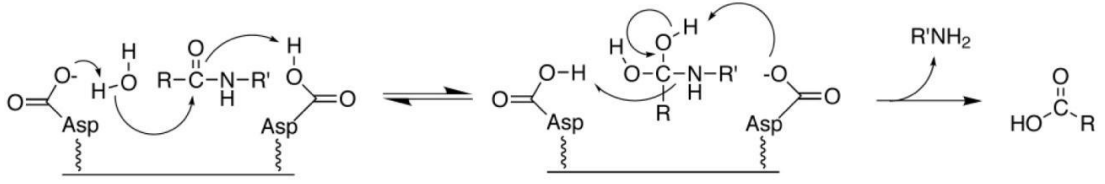
Serin proteazlar peptid bağlarının hidrolizini gerçekleştirirler. Peptid bağlarının hidrolizi; polipeptid hormon sürecinin, yeni taşınmış proteinlerden N-terminal metioninin taşınmasının, taşıyıcı proteinlerden lider dizilerin taşınmasının, apoptozisde hücrel protein sindiriminin, viral enfeksiyonda poliprotein sürecinin, yabancı proteinlerin sindirilmesinin, besin proteinlerinin sindiriminin ve diğer birçok sürecin temelini oluşturur.

Serinin hidroksil grubunun pK_a 'sı 13.4' tür. Hücredeki pH değeri nötr olduğundan zor bir süreç olan alkoksit iyonize olmalıdır (Bruice vd., 1962). Serinin nükleofilik reaksiyonunun, geçiş evresinde, hidroksil grubundan protonu koparmak için kuvvetli bir baza ihtiyacı vardır. Bunun için de serin proteazlar, pK_a 'sı 7 olan histidin (Şekil 2.5.) kalıntılarını devreye sokarlar.



Şekil 2.5. Serin proteazlarının genel reaksiyon mekanizması

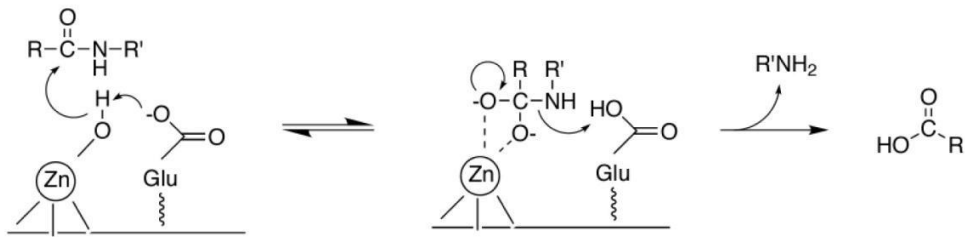
Aspartik proteaz aileleri, peptid bağlarının hidrolizini kataliz eden aktif sitelerinde, iki aspartik asit kalıntısına sahiptir. Bunlardan ilki, hayvanlarda protein sindirimini başlatan gastrik enzim pepsindir (EC 3.4.23.1). Pepsin homologları; lizozomlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunur. HIV proteazı (EC 3.4.23.16), retroviralde önemli bir rol oynayan aspartik proteazların başka bir ailesinin üyesidir.



Şekil 2.6. Aspartik proteazların genel reaksiyon mekanizması

Proteolitik enzimlerin en büyük ailesi metalloproteazlardır (Barret vd., 1998). Mononükleer çinko metalloproteazlar, iki çekirdekli metalloproteazları da içine alan proteaz ailesinin önemli örneklerindedir. Metalloproteazın aktif sitesindeki metal iyonun, peptid karbonil grubu ile nükleofilik reaksiyon tarafından peptid bağlarını ayıran su moleküllerini bağladığı düşünülür. Su ve metal iyon koordinasyonu, pK_a değerini düşürerek geçiş aşamasında hidroksit iyonunu oluşturmak için proton koparılmasını kolaylaştırır. Tetrahedral bir kompleks içinde su ile Zn^{2+} 'nin koordinasyonu, suyun pK_a 'sını 15'ten 9,6'ya kadar düşürür.

Bir ekzopeptidaz, polipeptidin N-terminal veya C-terminal amino asidinin hidrolitik koparılmasını kataliz eder. Lösin aminopeptidaz, N-terminal aminoasitlerini koparan iki çekirdekli metallopeptidazdır (Barrett vd., 1998). Karboksipeptidaz A (EC 3.4.17.1), hidrofobik C-terminal aminoasitleri için yüksek bir seçicilikle C-terminal aminoasitlerini koparan mononükleer çinko metallo peptidazdır. Karboksipeptidaz A aynı zamanda ester ve tiyoesterlerin hidrolizini de katalize eden proteolitik bir enzimdir.



Şekil 2.7. Çinko (metalloproteaz) genel reaksiyon mekanizması

Alkalin proteazlar fizyolojik ve ticari anlamda kullanılan çok önemli bir enzim grubudur. Bu grup yüksek derecedeki substrat spesifikliğı ile proteinlerin hidrolizinde önemli katalitik bir rol oynar ve mikrobiyal olarak büyük miktarlarda üretilirler. Proteazlar deterjan endüstrisi, deri endüstrisi, et ve süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. 1994 yılında 400 milyon dolarlık enzim endüstrisi

piyasaının 112 milyon doları deterjanlarda kullanılan proteaz enzimine ayrılmıştır (Zhang vd., 2010).

2.4. Aroma Bileşenleri

Aroma bileşenleri, bitkilerden veya bitkisel droglardan çeşitli yöntemlerle elde edilen, oda sıcaklığında sıvı halde olan, kolaylıkla kristalleşebilen su buharı ile sürüklenebilen, uçucu, kuvvetli kokulu yağimsı karışımlardır. Bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan, kendine özgü renk, tat, koku ve görünümleri ile uçucu özelliğe sahip olan bu maddeler uçucu yağ diye adlandırılmaktadır. Halk arasında uçan yağ, eterik yağ da denilen bu yağlarda terpenik hidrokarbonlar ve bunların oksijenli türevlerinin yanı sıra ketonlar, fenoller, alkoller ve organik asitler de bulunabilmektedir (Baytop,1986).

Aroma bileşenleri bitkinin herhangi bir organında bulunabildiği gibi familyaya göre bazı organlarda, örneğin salgı hücrelerinde, salgı kanallarında, salgı ceplerinde veya salgı tüylerinde de bulunabilmektedir. Uçucu yağların bitkide protoplazmada bulunduğu ya da hücre duvarının reçinemi tabakasının bozunması ile meydana geldiği ileri sürülmekle birlikte, glikozitlerin hidrolizi ile oluştukları yapılan çalışmalar sonucunda kesinlik kazanmıştır (Tetik,1996).

Aroma bileşenleri genellikle renksizdirler, fakat uzun süre bekletilirse oksitlenebildikleri ve reçineleşebildikleri için renkleri koyulaşır. Bu nedenle soğukta ve koyu renkli şişelerde saklanmalıdır. Suda az, organik çözücüler ve yağlarda kolaylıkla çözünürler. Sulu etanolde çözünebilme özellikleri ile uçucu yağlar sabit yağardan ayrılırlar. Yoğunlukları ise karanfil ve tarçın yağları dışında sudan daha azdır. Ayrıca optikçe aktifler ve kırılma indisleri yüksektir (Tetik, 1996).

Aroma bileşenlerinin bitkilerde biyolojik bir olaya katılmadığı, bitkinin yaralanması sırasında yaprak ve çiçekleri koruduğu, böceklere karşı çekici özellik gösterdiği ve çiçeklerin tozlaşmasına yardımcı olduğu sanılmaktadır (Tyler, 1988; Ewans, 1989).

Aroma bileşenlerinin büyük bir kısmı parfümeride koku verici madde olarak değerlendirilirken, gıda sanayinde de tat verici olarak kullanılmaktadır. Baharatın besinlere verdiği tat ve koku dışında, aroma bileşenlerinden ileri gelen koruyucu bir

etkisi vardır. Aroma bileşenlerinin antiseptik özelliği bakterilerin üremesini yavaşlatmakta ve besinlerin bozulmasını geciktirmektedir (Tanker, 1990).

Lamiaceae familyasında bulunan birçok Akdeniz bölgesi ve Avrupa bitkisi; *Thymus*, *Lavandula*, *Mentha*, *Melissa* vb türler, değerli aroma bileşenleri kaynaklarıdır (Tanker, 1990). Bu familyanın *Coridothymus*, *Dorystoechas*, *Lavandula*, *Origanum* ve *Thymbra* cinslerinden bütün türlerin ve *Mentha*, *Salvia*, *Satureja*, *Thymus* ve *Ziziphora* cinslerinden bazı türlerin oldukça değerli aroma bileşenleri ürettikleri kabul edilmektedir (Karadoğan, 2003).

Aroma bileşenleri içeriklerine göre Lamiaceae familyası için yapılan sınıflandırmalarda; *Lavandula*, *Origanum*, *Satureja* ve *Thymbra* türleri yüksek düzeyde (%2'den fazla), *Acinos*, *Calamintha*, *Cyclotrichium*, *Mentha*, *Nepeta*, *Rosmarinus*, *Salvia* ve *Thymus* türleri orta düzeyde (%0.5-2.0 arasında), *Ajuga*, *Ballota*, *Clinopodium*, *Lamium*, *Marrubium*, *Melissa*, *Micromeria*, *Phlomis*, *Scutellaria*, *Sideritis*, *Stachys* ve *Teucrium* türleri düşük düzeyde (%0.5'den az) aroma bileşen içerenler grubunda sınıflandırılmıştır (Karadoğan, 2003).

Aroma bileşenlerinin tanınması için, bu maddelerin birbirinden ayrılması gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli destilasyon ve kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Kromatografik yöntemler arasında en iyi sonuç GC ve GC/MS ile alınmaktadır. Gaz kromatografisinin kolon kısmında ayırım gerçekleştirildikten sonra bileşenler FID dedektöre gönderilmektedir. Elde edilen kromatogramın integrasyonu ile bileşenlerin konsantrasyonu tespit edilebilmektedir. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC/MS) ile ise bileşenlerin kimlik tespiti kesin olarak yapılabilmektedir. (Tetik, 1996).

2.4.1. Aroma Bileşenlerinin Eldesi

Son yıllarda tıbbi ve aromatik bitkilerin ilaç, kozmetik ve diğer sanayi alanında kullanımında büyük artış gözlenmektedir. Gelişmekte olan ülkeler uçucu yağ üretiminde büyük potansiyele sahiptir. Dünya üretiminin %55'i geliştirmekte olan ülkelerde, %35'i gelişmiş ülkelerde, %10'u ise doğu Avrupa ülkelerinde gerçekleştirilmektedir. Günümüzde bitkilerden elde edilen aroma bileşenlerinin kullanım alanlarının çok geniş olması nedeniyle, aroma bileşenlerinin izolasyonu ve saflaştırılması büyük önem taşımaktadır. Yaygın olarak kullanılan buhar destilasyon

çözücü ve ekstraksiyonu tekniklerinin bazı sakıncalarından dolayı yeni özütleme teknikleri geliştirilmiştir.

2.4.1.1. Su destilasyonu

Bitkisel materyalin su ile kaynatıldığında üründe bozunmanın olmadığı hallerde uygulanan yöntemdir. Bu yöntemle bitkilerden aroma bileşenleri elde edilebildiği gibi aromatik suda elde edilebilmektedir. Bitki materyali su destilasyonunda su ile birlikte kaynatılır, aroma bileşenleri ve su buharları bir soğutucuda yoğunlaştırılır. Soğutucudan seperatöre gelen yağ ve su birbirinden ayrılır. Su destilasyonunda bitkisel materyal her zaman su ile doğrudan temas halindedir, su miktarı az olursa materyal aşırı ısınmadan dolayı kavrulabilir ki bundan dolayı kazan içinde yeterli miktarda su bulunması gerekir (Curtis ve Williams, 1994).

2.4.1.2. Su-buhar destilasyonu

Su buhar destilasyonu, su destilasyonu yöntemine nazaran daha çok tercih edilen bir yöntemdir. Su buharı destilasyonunda, bitkisel materyal suyun hemen üstünde yer alan bir ızgara üzerine yerleştirilmiştir. Bu durumun dezavantajı kazan hacmini küçültmesidir. Ancak bu metot ile elde edilen aroma bileşenlerinin kalitesi yükselmektedir. Su-buhar destilasyonunda, bitkisel materyal kazanın altında bulunan ısı kaynağı ile doğrudan temas edemez. Bununla beraber kazanın cidarları ısıyı iyi iletir ve kazanın kenarına değen bitkisel materyalde sıcaklık nedeniyle bozunma meydana gelebilir.

Bu işlemin dezavantajı kullanılan buhar ıslak olduğu için bitkisel materyal tamamen ıslanır ve bu durum destilasyon hızının yavaşlamasına neden olur. Ayrıca kazanın alt kısmında suyun toplanması geri döngüye neden olur. Böylece kazanın alt kısmında suyun sürekli kaynaması ve yoğunlaşması bitkisel materyalin içinden buharın geçmesine engel olur ve aroma bileşenlerinin bir kısmını çözer. Rifleks (geri çevirme) kontrolünü sağlayan bir cihaz yerleştirilirse bunun önüne geçmek mümkündür (Lawrence, 1995).

Su buhar destilasyonunun su destilasyonuna olan avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Yağ verimi daha yüksektir.
- Yağın bileşikleri hidroliz ve polimerizasyona daha az maruz kalırlar.
- Rifleks kontrol edilirse polar bileşiklerin kaybı en aza iner.
- Su-buhar destilasyonu ile üretilen aroma bileşenlerinin kalitesinin yeniden üretilebilirliği daha yüksektir.
- Su destilasyonuna göre daha hızlı bir işlemdir.

2.4.1.3. Su buharı destilasyonu

Bu yöntemde diğer yöntemlerin aksine bitkisel materyal ile temas eden ısı 100°C den daha yüksek değildir. Bu yöntem, destilasyon kazanının dışında bulunan bir jeneratörde üretilen buharın kazanın içine yerleştirilmiş olan bitkinin içinden geçirilmesiyle uygulanır. Bitkisel materyal buhar girişinin üzerinde yer alan ızgara üzerine yerleştirilir. Buhar kazanının dışarıda olması buhar hızının kontrol edilebilmesini sağlar. Su buharı destilasyonu yönteminde sıcaklık 100 °C'yi geçmediği için bitkinin sıcaklıkla zarar görmesi engellenmiş olur. Buhar destilasyonu büyük ölçekte aroma bileşenleri üretiminde en çok tercih edilen işlemdir (Thapa, 1989; Varshney, 1993; Curtis ve Williams, 1994; Lawrence, 1995).

Ayrıca buhar destilasyonu, gliserin gibi yüksek kaynama noktalı bileşiklerin, yağ asitleri gibi kaynama halinde dekompoze olan ve terebentin gibi doğrudan ısıtma sonucunda yapısı bozulan maddelerin ayrımında ve saflaştırılmasında kullanılabilir.

2.4.1.4. Kuru destilasyon

Kuru destilasyon (parçalayıcı destilasyon) da bitkinin çeşitli kısımları (gövde, kabuk, dal gibi) doğrudan kuru bir şekilde ısıya maruz bırakıldığında bitki içinde bulunan uçucu maddeler kısmen oldukları şekilde, kısmense parçalanarak distile olurlar. Hiç uçucu olmayan maddelerde parçalanarak uçucu maddeler haline gelip distile olurlar. Kuru destilasyon işlemi özel destilasyon aparatlarında yapılır. Ağaç, odun ve dallar kurumaya bırakılır, parçalara bölündükten sonra kazanlara doldurulup distile edilir. Destilasyonla geçen kısımlar su ile soğutulan kondansatörlerde yoğunlaşırlar. Çeşitli kodekslerde bu şekilde elde edilmiş preparatlar vardır. Bunlara katran adı verilir, kayın ağacı katranı ve ardıç katranı örnek olarak verilebilir (Yalçındağ, 1965).

Toros dağlarında toprak içinde küçük çukurlar açılmak suretiyle katran üretilmektedir. Bunun için toprak içinde bir tanesi büyük iki çukur açılır ve içi çamur ile sıvanır. Daha sonra bu iki çukur dip kısmından bir boru ile birbirine bağlanır. Çıralı kök ve gövde parçaları büyük çukura doldurulup üzerleri çamur ile sıvanır. Bu esnada küçük bir yakma deliği bırakılır. Sıvama işlemi tamamlandınca fırındaki odun parçaları yavaş yavaş yanar ve meydana gelen katran dipteki boru yardımıyla küçük çukurda toplanır. Bu yöntemle “kara katran”, “sarı katran” ve “andız katranı” olmak üzere üç farklı bitkiden katran elde edilebilmektedir (Baytop ve Öztekin, 1984).

2.4.1.5. Hidrodifüzyon

Aroma bileşen üretiminde kullanılan yeni bir buhar destilasyon tekniğidir. Bu yöntemle elde edilen aroma bileşen verimi buhar destilasyonuyla elde edilenden daha yüksektir. Destilasyon süresi kısa ve daha az buhar harcandığı için daha az masraflıdır.

Bu yöntemin yararlarını şu şekilde sıralayabiliriz:

- Düşük basınçta ıslak buhar kullanılır.
- Bitkinin yüklenmesi ve boşaltılması kolaydır.
- Distillasyon süresi kısa olmakla beraber az buhar harcandığı için daha az masraflıdır.
- Yağ verimi geleneksel buhar destilasyonlarından daha yüksektir.
- Destilasyon süresinin kısa olmasından ve riflaks olayının gerçekleşmesinden dolayı yağ bileşikleri hidroliz olmazlar.
- Elde edilen aroma bileşenlerinin tüm özellikleri standartlara uygundur.

Bu yöntemin dezavantajı buhar ve kondanse olan su aşağı doğru hareket ederken uçucu olmayan veya uçuculuğu az olan lipitler, klorofil, yağ asitleri ve kumarinler gibi suda çözünen bazı maddeler yağa geçebilirler (Lawrence, 1995).

2.4.1.6. Maserasyon ile destilasyon

Bazı bitkilerden aroma bileşenlerin eldesinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu güçlükler aroma bileşenlerin yapısından kaynaklanmaktadır. Glikozit yapısında aroma bileşenleri içeren bitkiler, içerdikleri aroma bileşiklerinin açığa çıkması için

sıcak suyun içinde maserasyona bırakılır. Badem çekirdekleri, soğan, sarımsak, hardal tohumu gibi droglar bu özelliğe sahiptir (Lawrence, 1995).

2.4.1.7. Soğuk yağ ile özütleme (Anfloraj)

Yüksek absorpsiyon yeteneğine sahip olan aroma bileşenleri, koku maddesi taşıyan aroma bileşenleri ile temas ettirilirse içeriği kolayca absorplarlar. Bu yöntem Anfloraj denilmektedir.

Hasat edildikten sonra bir gün veya daha uzun süre fizyolojik aktivitelerini devam ettiren yasemin gibi çiçekler soğuk yağ ile özütlenirler. Yöntem için genellikle saflaştırılmış hayvan yağı, iç yağ karışımı gibi kokusuz ve uygun kıvamda bir yağ seçilir ve kenarları tahta çerçeve ile kaplanmış bir cam plak üzerine yayılır ve yağ kaplı bir plak bunun üzerine kapatılır. Taze olarak toplanmış çiçekler yağın üzerine serpilir, bir gün bekletilir ve yerine yenileri konur. Bu işleme yağ tamamen doyuncaya kadar devam edilir ve elde edilen ürüne 'pommat' denir. Pommat alkol ile özütlenir, alkolde çözülmüş durumdaki yağ süzülür ve alkol düşük basınçta destilasyonla uzaklaştırılır, ürüne 'Absolü' adı verilir (Guenther, 1948; Thapa, 1989).

2.4.1.8. Sıcak yağ ile özütleme (Maserasyon)

Bu yöntemin soğuk yağ ile özütlemekten belirgin farkı, koparma sonucu fizyolojik aktiviteleri hemen duran gül, mimazo, akasya, portakal çiçeği gibi çiçeklerin 60-70°C sıcaklıktaki yağa daldırılarak özütlenmesidir. Doygun yağ süzülerek 'pommat' elde edilir, soğuk yağ ile ekstraksiyona benzer yolla pomattan alkol özütü ve 'absolü' hazırlanır (Guenther, 1948; Thapa, 1989).

2.4.1.9. Organik çözücülerle özütleme

Bitki materyalleri, taze olarak petrol eteri, hekzan, metil klorür, benzen, aseton gibi saf çözücülerle, bazı özel durumlarda iki çözücü karışımı ile özütlenebilirler. Özüt, düşük basınçta konsantre yağ veya konkret olarak elde edilir (Thapa, 1989; Wijesekera, 1992).

Özellikle ısıya karşı hassas ve buhar destilasyonu ile elde edilemeyecek kadar küçük miktarda bulunan aroma bileşenleri bu yöntemle elde edilir. Ancak uçucu aroma

bileşenleri ile birlikte kullanılan çözücüde çözünebilen diğer maddeler de özütlenirler. Kullanılacak olan çözücü inert, düşük kaynama noktalı, seçici bir etkiye sahip, ucuz, kolay bulunur ve su ile karışmayan bir çözücü olmalıdır (Thapa, 1989; El-Gammal, 1991; Curtis ve Williams, 1994).

Çözücü ile özütlemenin başlıca sakıncası özütte çözücü artığının kalması ve bu nedenle toksik risk oluşturmalarıdır. Ayrıca verimli bir ekstraksiyon için uzun bir süre gerekmektedir. Ayrıca organik çözücüler düşük seçiciliğe sahiptir. Bu nedenle istenen bileşiklere ilave yüksek molekül ağırlıklı ve uçucu olmayan sabit yağlar, reçineler, mumlar ve renk maddeleri de ekstrakte olmaktadır.

2.4.1.10. Sıkma ile yapılan mekanik özütleme

Uçucu yağların bazıları kimyasal kompozisyonları ve doğaları gereği ısıdan etkilendiklerinden destilasyon işlemine tabi tutulmazlar. Örneğin, narenciye meyvelerinden uçucu yağların elde edilmesi için mekanik özütleme uygulanır. Önceleri meyveler kesilip iç kısımları alındıktan sonra kabukları kolayca özütleyebilmek için bir süre suda bekletilirdi. Presler kullanılarak turunc meyvelerinin kabuklarında bulunan eterik yağ bezleri parçalanır ve yağın açığa çıkması sağlanırdı. Yağ bir sünger yardımıyla alınıp bir kaba sıkılarak elde edilirdi. Bir miktar su içerdiğinden dolayı bulanık olan aroma bileşeni bir süre bekletilir ve süzülerek saf hale getirilirdi (El-Gammal, 1991).

2.4.1.11. Çizerek özütleme

Canlı çam ağaçlarında reçinenin ağaç bünyesinden alınmasında “yaralama tekniği” ve uyarıcılarla ‘tahrik tekniği’ kullanılır. Yaralama tekniğinin çeşitli yöntemlerinden biri olan “Oluklu Çizgi Yöntemi” ülkemizde 1950’li yıllardan günümüze kadar uygulanmıştır. 1980’li yıllarda ise asit-pasta tahrik tekniği uygulanmaya başlanmış, daha sonra yaralama tekniği tamamen terk edilerek, bu teknik yaygınlaştırılmıştır (Acar, 1996).

2.4.2. Aroma Bileşenlerinin Kimyasal Bileşimi

Kimyasal bileşimleri bakımından aroma bileşenleri elde edildikleri bitkilere göre farklılık gösterirler. Ancak içerdikleri maddelere göre sınıflandırabiliriz;

- Terpenik maddeler
- Aromatik maddeler
- Düz zincirli hidrokarbonlar
- Azot ve kükürt taşıyan bileşikler.

Aroma bileşenlerinin büyük çoğunluğu (%90) terpenik maddelerden oluşmuştur. Terpenik maddeler ise uçucu yağların içinde monoterpen, seskiterpen ve diterpen olarak bulunur. Terpenlerin oksitlenmesiyle meydana gelen oksijenli türevler, aroma bileşenlerinin kendine özgü kokusunu, tadını ve terapik özelliğini verir. Bu nedenle aroma bileşenleri içeren bitkiler incelenirken içerdikleri oksijenli bileşikler esas alınır.

Monoterpenleri üç grupta inceleyebiliriz. Bunlardan birincisi etken maddeleri asiklik monoterpen türevleri olanlardır ve bunlara örnek olarak ocimen, citral, citronellal, geraniol verilebilir. Bu bileşikler özellikle gül, bergamut, kismis, melisa, limon, safran gibi bitkilerden elde edebiliriz. Monoterpenlerin ikinci grubunda ise etken maddesi monosiklik monoterpen türevleri yer almaktadır. Bunlara örnek olarak nane, kimyon, okaliptus, defne gibi bitkilerden elde edilen terpinen, menthol, cuminal gibi maddeler yer almaktadır. Son grupta ise etken maddeleri disiklik monoterpen türevi olan maddeler yer alır. Sabinen, thujon, camphen örnek olarak gösterilebilirler. Bu bileşiklerin yaygın olarak bulunduğu bitkiler ise halk dilinde pelin otu, kuşdili, kedi otu, solucan otu, pire otu olarak bilinmektedir.

Aroma bileşenleri içerisinde monoterpenler olarak bulunabilenlere; geraniol, nerol, terpineol, menthol, limonen gibi maddeler örnek olarak verilebilir.

2.4.3. Aroma Bileşenlerinin Sınıflandırılması

Aroma bileşenleri koku ve tat özelliklerine göre, farmakolojik ve terapik etkilerine göre de sınıflandırılabilirler. Aromatik özelliklerine göre kısaca üç gruba ayırabiliriz;

- Aromatika (çok kokulu ve tadı iyi olanlar)
- Aromatika- aroma (kokulu ve tadı acı olanlar)
- Aromatika-acria (kokulu ve tadı keskin olanlar)

Bu özelliğe sahip aroma bileşenlerinin elde edildiği bitkiler ise Çin tarçını, Seylan tarçını, karanfil, anason, küçük hindistan cevizi, rezene ve kekik gibi bitkilerdir. Farmakolojik olarak ve terapik etkilerine göre de aroma bileşenleri gruplandırılabilirler.

Bu grupta yer alan aroma bileşenleri genellikle tedavi amaçlıdır ve alternatif tıbbın önem kazanmasıyla da önemleri artmıştır (Ceylan 1997).

2.5. Antioksidanlar

Vücudumuzdaki ve besinlerdeki karbohidratlar, proteinler, lipitler ve nükleik asitler oksidasyona uğrayabilir ve canlı organizmalar için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilirler (Papasa, 1996). Bu durum yaygın olarak “Oksidatif stres” şeklinde ifade edilir (Aruoma ve Cuppet, 1997).

Çizelge 2.3. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri

Radikal türler	Radikal olmayan türler
Süperoksit, O_2^-	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $\cdot OH$	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksi, RO_2^-	Ozon, O_3
Alkoksi, $RO\cdot$	Singlet oksijen, $^1\Delta_g \text{ } ^1O_2$
Hidroperoksi, HO_2^-	Nitröz asit, HNO_2
Azot Oksit, $NO\cdot$	Nitrozil Katyonu, NO^+
	Nitroksi Anyonu, NO^-

Reaktif oksijen ve azot türleri insan vücudunda çeşitli şekillerde meydana gelirler.

- Hücrenin normal solunumu sırasında yan ürün olarak reaktif oksijen ve azot türleri oluşur.

- Süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, bazı biyomoleküllerin (adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat, sitokrom P450 ve elektron transport zincirlerinin bazı bileşikeleri) oksijen tarafından doğrudan oksidasyonu ile artabilir (Fridovich, 1986; Halliwell, 1994).
- Vücudumuz, doğal ve insan kaynaklı radyasyona maruz kalabilir. Yüksek enerjili elektromagnetik ışın, suyu parçalayabilir ve hidroksi radikali oluşturur (Von-Sonntag, 1987).

Reaktif oksijen ve azot türleri dışarıdan da organizmaya alınabilirler. Sigara dumanının ana bileşiği NO₂'dir. NO₂ 'in sigara olefinleri ile reaksiyona girmesiyle karbon merkezli radikallerin oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca sigara içimi nötrofilleri aktive ederek dolaylı olarak serbest radikal üretimini artırmaktadır (Papas, 1996).

Yabancı organizmalara karşı koruyucu görev yapan fagositler (nötrofiller, monosiler, makrofajlar, eosinofiller) yabancı organizmayı öldürmek için süperoksit ve hidrojen peroksit üretirler. Bu önemli savunma sisteminin bozukluğu, doku hasarıyla sonuçlanan aşırı fagosit aktivesinin eşlik ettiği ramotoit artirit ve iltihaplı bağırsak hastalığı gibi bazı hastalıklara sebep olur (Moncada vd., 1991; Anggård, 1994).

Oksidasyon, radikalik zincir reaksiyonları üzerinden yürür. Radikaller eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için özellikle gevşek bağlı elektronları koparırlar. Bu özellikleri, radikallerin kimyasal olarak aktif olmalarını sağlar ve bunların organizmadaki varlığı biyomoleküllerin modifikasyonuna sebep olur. Reaktif oksijen ve azot türleri DNA bazlarını hasara uğratarak mutasyona sebep olur.

Antioksidanlar, oksidasyonu başlangıç ve/veya gelişme basamağında önleyen veya geciktiren maddelerdir. Canlı organizmalarda antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin bulunması yaşam için önemli bir ihtiyaçtır. Antimutajenik, antikarsinojenik, yaşlanmayı geciktirici gibi birçok etki canlılardaki antioksidan özellikteki maddelerden kaynaklanır (Cook ve Samman, 1996).

Antioksidan maddelerin eksikliğinde reaktif oksijen ve azot türleri kanser, diabet, kireçlenme, parkinson, AIDS, beyin ve kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın çıkmasına sebep olurlar (Packer ve Cadenas, 2002).

Doğal kaynaklı antioksidanlar, bitkilerde bulunan fenolik bileşikler (tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler), azotlu bileşikler (alkaloitler, klorofil türevleri,

proteinler, aminler), organik asitler ve karotenoitlerdir (Larson, 1988; Hudson, 1990). Sistein, metiyonin, histidin, triptofan ve lizin (Taylor, 1980) gibi aminoasitler ile sülfürlere zengin olan tiyoredoksin (Bunchanan vd., 1994) proteini de antioksidan özellik gösterirler.

Birçok epidemiyolojik çalışma bol meyve-sebze tüketiminin kalp-damar ve kanser hastalıklarını azalttığını ortaya koymuştur (Hertog vd., 1993; Stampfer vd., 1993). Sebze ve meyvelerin bu özellikleri içerdikleri antioksidan maddelere (askorbik asit, tokoferoller, karotenoitler, flavonoidler) dayandırılmaktadır. Örneğin yeşil çay yaprakları (-)-epikateşin, (-)-epikateşin gallat, (-)-epigallokateşin ve (-)-epigallokateşin gallat içerirler (Amarowicz, 1996; Ho, 1997) ve antihipertansif (Henry, 1984), antioksidatif (Ho vd., 1992), antiaterosklerotik (Hertog vd., 1993; Luo vd., 1997), antikarsinojenik (Luo vd., 1997; Wang vd., 1994) gibi etkilere sahiptirler. Kateşinler metal iyonlarını bağlayıcı ve oksijen radikalini tutucu antioksidanlar olarak tanınırlar (Husain vd., 1987; Chen vd., 1990).

Diğer taraftan sentetik antioksidanlar gıdaların bozunmasını önlemek ve raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadırlar. Günümüzde BHA (bütilenmiş hidroksianisol), BHT (bütilenmiş hidroksitoluen), PG (propil gallat) ve TBHQ (*t*-bütilhidrokinon) en çok kullanılan sentetik antioksidanlardır. Ancak sentetik antioksidanlar ve oluşturdukları yan ürünlerin çeşitli hastalıklara yol açabileceğini ortaya koyan çalışmalar vardır (Yamazaki vd., 2007; Tepe vd., 2007). Bu nedenle doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini tutabilecek yeni antioksidan maddelerin bulunmasına yönelik çalışmalar giderek önem kazanmış ve bu alanda yapılan araştırmalar artmıştır.

2.5.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

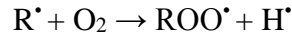
Antioksidanlar, reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. Bazı antioksidanlar ise birden fazla aktivite mekanizması gösterirler ve bunlar çok fonksiyonlu antioksidanlar olarak adlandırılırlar (Reische vd., 2002).

2.5.1.1. Birincil Antioksidanlar

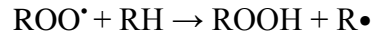
Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlangıç aşamasını erteleyen veya engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır. Bir lipit (alkil) radikali (R•) oluşturmak için, doymamış yağdan α -metilenik hidrojen ayrıldığında otooksidasyon başlar (Reische vd., 2002)



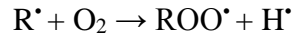
Oluşan lipit radikali çok reaktiftir, ilerleyen aşamalarda peroksi radikali (ROO•) oluşturmak için oksijenle reaksiyona girer.



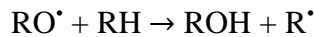
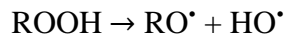
Reaksiyonun ilerleyen aşamalarında peroksi radikalleri lipitle reaksiyona girerek hidroperoksit ve yeni bir kararsız lipit radikali oluştururlar.



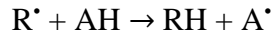
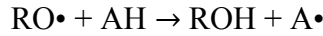
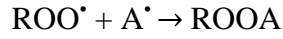
Daha sonra bu lipit radikali başka peroksi radikali oluşturmak üzere oksijen ile reaksiyona girecektir. Bu oksidatif mekanizma kendiliğinden katalizlenir ve böylece otooksidasyon devam eder.



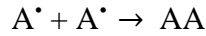
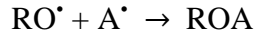
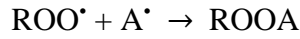
Hidroperoksitler (ROOH) kararsızdırlar ve bozunarak radikaller oluştururlar. Bu da reaksiyonun hızlanmasına neden olur.



Birincil antioksidanlar (AH) lipit radikali (R•) ve peroksi radikalleriyle (ROO•) reaksiyona girerler ve onları daha kararlı, radikal olmayan ürünlere çevirirler. Birincil antioksidanlar lipit radikallerine hidrojen atomları verirler ve lipit türevleri ile antioksidan radikaller meydana getirirler (A•). Hidrojen verici olarak birincil antioksidanlar peroksi radikallerine lipitlerden daha çok ilgi gösterirler. Bu yüzden otooksidasyon reaksiyonunda oluşan peroksi (ROO•) ve oksil (RO•) serbest radikalleri birincil antioksidanlar tarafından giderilirler. Antioksidanlar lipit radikalleriyle doğrudan da etkileşebilirler (Reische vd., 2002).



Hidrojenin verilmesiyle oluşan antioksidan radikali lipitlerle çok az reaksiyona girer. Oksijen veya lipitlerle antioksidan radikalinin reaksiyonu çok yavaş olduğundan reaksiyon hızı azalır. Kararlı rezonans hibritler oluşturmak için fenol halkasının çevresindeki ortaklanmamış elektronun delokalizasyonu ile antioksidan radikali kararlı hale getirilir. Antioksidan radikaller peroksi, oksijen ve diğer antioksidan radikaller ile sonlandırma reaksiyonlarına katılabilme yeteneğine sahiptirler (Reische vd., 2002).

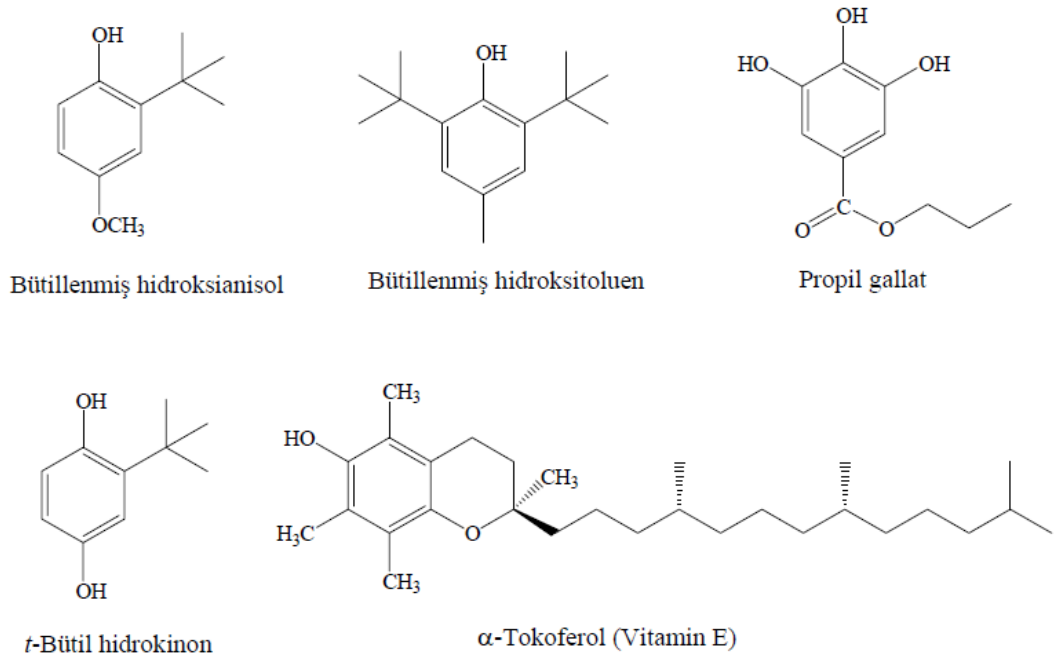


Katı ve sıvı yağlarda antioksidan dimerlerin oluşumu göze çarpar ve bu oluşum fenolik antioksidan radikallerin kolayca sonlandırma reaksiyonlarına uğradığını gösterir. Antioksidan dimerler, radikal olmayan şekillerinde ne kadar uzun süre kalırlarsa otokatalitik serbest radikal zincir mekanizmasını o kadar etkili şekilde durdururlar (Reische vd., 2002).

Otooksidasyonun başlangıcından önce, antioksidanların tüketildiği ve serbest radikallerin oluştuğu indüksiyon zamanı olmalıdır. Bu yüzden birincil antioksidanlar, otooksidasyon basamakları meydana gelmeden oksidasyonun indüksiyon ve başlangıç aşamalarında ilave edilirlerse daha etkili olurlar. Radikal gidermeye ilaveten birincil antioksidanlar, hidroperoksitleri hidroksi bileşiklerine indirgeyebilirler. Bununla beraber birincil antioksidanların esas antioksidatif mekanizması radikal gidermedir. Birincil antioksidanlar, çeşitli halka süstitüsyonlarına sahip mono veya polihidroksi fenollerdir. Fenoldeki hidroksil grubuna göre orto ve para konumuna elektron veren grupların süstitüsyonundan oluşan indüktif etki bileşiğın antioksidan aktivitesini artırır. Fenolik antioksidanlar, hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu arttırarak onun reaktifliğini azaltır. Hidroksil grubuna göre para konumunda etil veya bütıl grupların süstitüsyonu, antioksidan aktiviteyi artırır. Bununla beraber sterik engelleme nedeniyle para

pozisyonlardaki uzun zincir veya dallanmış alkil gruplarının varlığı antioksidan etkiyi azaltabilir. Orto pozisyonlardaki dallanmış alkil gruplarının süstitüsyonları kararlı rezonans yapılar oluşturarak fenolik antioksidanın etkisini arttırırlar ve antioksidan radikalinin reaksiyonlara katılma yeteneğini azaltırlar (Reische vd., 2002).

Sentetik birincil antioksidanlara örnek olarak bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksitoluen, propil gallat ve *t*-bütül hidrokinon verilebilir (Şekil 2.8.). Tokoferoller ve karotenoitler doğal kaynaklı birincil antioksidanlardır (Reische vd., 2002).



Şekil 2.8. Birincil Antioksidanlar

2.5.1.2. İkincil Antioksidanlar

İkincil (tip-2 veya koruyucu antioksidanlar) antioksidanlar çok çeşitli reaksiyon mekanizmalarına sahiptirler. Bu antioksidanlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar, fakat serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürmezler. İkincil antioksidanlar prooksidan metallere kelat yapabilirler ve onları deaktive edebilirler, hidroksiperoksitlerin radikal olmayan türlere parçalanmasını sağlayabilirler, singlet oksijeni deaktive edebilirler, ultraviyole radyasyonu absorbe edebilirler veya oksijen giderici olarak davranabilirler. Bu antioksidanlar, genellikle birincil antioksidanların aktivitesini arttırırlar. Sitrik asit, askorbik asit, askorbil palmitat, lesitin, tartarik asit,

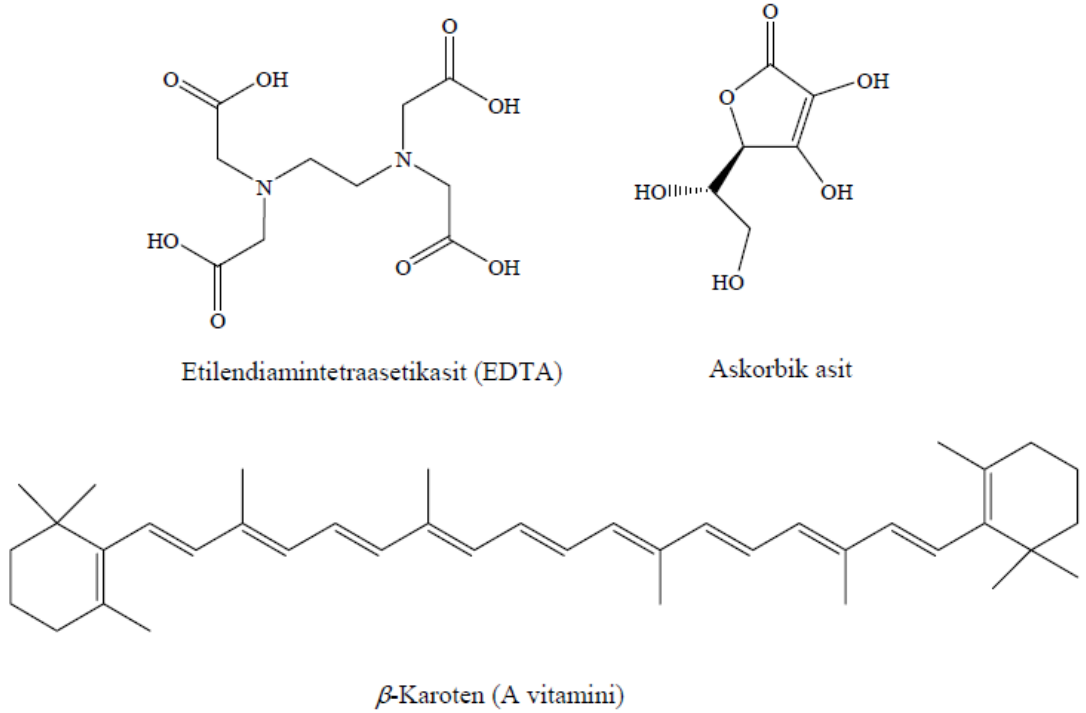
EDTA ve β -karoten ikincil antioksidanlara örnek olarak verilebilir (Şekil 2.9.) (Reischevd., 2002).

İkincil antioksidanlar en önemli etki mekanizmalarına göre başlıca üç gruba ayrılabilirler (Reische vd., 2002).

a) Kelat Yapıcılar: Sitrik asit, fosforik asit, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), tartarik asit.

b) Oksijen Gidericiler ve İndirgeme Ajanları: Askorbik asit, askorbil palmitat, eritorbik asit, sodyum eritorbat, sülfidler.

c) Singlet Oksijen Gidericiler: Karotenoitler (β -Karoten, likopen ve lutein).



Şekil 2.9. İkincil Antioksidanlar

2.6. Fenolik Bileşikler

Kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi bazı akut ve kronik klinik düzensizliklerin sebeplerinde ve ilerleyişinde oksidatif ve nitrosatif etkilerin varlığı, doğal antioksidanların profilaktik ajanlar olarak sağlık kazanımları sağlayabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır. Oksidasyon hasarını azaltan muhtemelen koruyucu

ajanlar olarak düşünöldüklerinde, bu antioksidanlar iç savunma sistemine yardımcı olabilir (Ferreira vd., 2010).

Fenolik bileşikler, besleyici değeri olmadığı halde özel sağlık etkilerine sahiptirler. Diyetimizde, hidrojen verme ve tekli oksijenin etkisini bastırma şeklinde ortaya çıkan indirgeme yeteneklerine bağlı olarak, kronik hastalık riskini azaltarak sağlığımıza katkı yapabilirler. Ayrıca fenolik bileşiklerin antioksidatif savunma mekanizmalarında olduğu gibi, gıda ürünlerinin dayanıklılıklarında da önemli bir rol oynar.

Tedavi edici tablet ve gıdalardaki fenolik maddeler, bitki bünyelerinde fenil alaninden veya bazı bitkilerde tirozinden türeyen sekonder metabolitlerin ana sınıflarındandır. Kimyasal olarak fenolikler, bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan, aromatik halkaya sahip bileşikler ve bunların fonksiyonel türevleri olarak tanımlanır. Hayvan dokularındaki ve bitki olmayan malzemelerdeki varlıkları, genellikle bitkisel gıdaların sindirimlerine bağlıdır (Shahidi, 2000; Shahidi, 2002).

Fenolik bileşikler böcek ve hayvan zararlarına karşı bitkiyi korurlar. Yapısal olarak büyük farklılıklarından dolayı bitkilerde ve bunlardan elde edilen ürünlerde binlerce farklı fenolik bileşik bulunmaktadır. Fenolik bileşikler bitki kökenli pek çok gıdanın tat ve aromasına katkıda bulunabilirler. Fenolik bileşikler doğal antioksidan madde özelliği de göstermektedirler. Serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonları durdurarak veya engelleyerek kanser, kalp hastalığı ve akciğer hastalıkları gibi pek çok hastalığın oluşumuna engel olurlar. Flavonoidlerin geniş bir grubu gıdaların renginden sorumludur. Flavonoidler arasında bulunan antosiyaninler doğal renk maddeleri olup sebzeler, meyveler, meyve suları ve şarapların, pembe, kırmızı, mavi ve mor renklerinden sorumludurlar (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Saldamlı, 2007; Nizamoğlu ve Nas, 2010).

Bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanan fenolik bileşikler bitkilerde en yaygın bulunan maddeler grubu olup, günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı tanımlanmıştır. Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanan fenolik bileşikler eklenmektedir. Fenolik bileşikler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunabilirler. Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Flavonoidler, bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. Fenolik bileşiklerin bir kısmı

meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında etkilidirler. Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin sarı, sarı-esmer, kırmızı-mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadırlar. Meyve ve sebzelerin işlenmelerinde enzimatik esmerleşme gibi değişik sorunlara da neden olmaktadır. Bu özellikler meyve ve sebzeler ile bunlardan elde edilen ürünler için son derece önemlidir (Kafkas vd., 2006, Cemeroğlu, 2004; Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Coşkun, 2006; Aydın ve Üstün, 2007; Güngör, 2007).

Meyveler, özellikle içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak sağlık üzerinde olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir. Fenolik bileşiklere, beslenme fizyolojisi açısından olumlu etkileri nedeniyle “biyoflavonoid” adı da verilmektedir. Bazı kaynaklarda P faktörü (permeabilite faktörü) veya P vitamini olarak da adlandırılmaktadır (Pehlivan ve Güler, 2004; Saldamlı, 2007; Cemeroğlu 2004).

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları, değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadırlar (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Nizamoğlu ve Nas, 2010).

Bitkisel materyallerde bulunan fenolik bileşikler, fenolik asitler (hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler) ve flavonoidler (antosyanidinler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, katekinler ve izoflavonoidler) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Cemreoğlu, 2004).

2.6.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, hidrosisinnamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki grupta incelenir. Fenolik asitler genel olarak serbest halde bulunmazlar. Karboksil grupları karbohidratlar, glikozidler, aminoasitler veya proteinlerle reaksiyona girebilirler ve alkollerle fenol esterler, amino bileşikleriyle de amidleri oluştururlar. Fenolik asitlerin, fenol halkasına bağlı hidroksil grupları da çok aktif olup, şekerlerle birleşerek glikozitleri oluştururlar.

2.6.1.1. Hidroksisinnamik asitler

Hidroksisinnamik asitler C₆-C₃-fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın bulunanları; kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asitlerdir. Bitkilerde büyük bir kısmı organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunurlar.

Hidroksisinnamik asitlerin ancak çok az miktarı serbest halde bulunurlar. Çoğunlukla asit türevleri halindedirler. Hidroksisinnamik asitin esterleri de gıdalarda çok yaygındır. Hidroksisinnamik asit glikozidleri ve amidleri birçok bitki bünyesinde bulunmaktadır (Balasunduram vd., 2006).

2.6.1.2. Hidroksibenzoik asitler

Hidroksibenzoik asitler bitkisel gıdaların yapısında genellikle eser miktarda bulunur. Bunlar arasında salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, p-hidroksibenzoik asit, gallik ve vanilik asit gibi asitler sayılabilir.

2.6.2. Flavonoidler

Flavonoidler, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısındadırlar. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir. Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan polifenollerdir. Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bilinmektedir. Flavonoidler yapısal olarak sekiz gruba ayrılırlar (Bilaloğlu ve Harmandar 1999; Nizamoğlu ve Nas, 2010).

2.6.2.1. Flavonlar

Flavonlar, flavonoidlerin bitki aleminde yaygın olarak rastlanan bir sınıfıdır. Bu bileşiklerin hetero halkasında C-2 ve C-3 atomları arasında çift bağın bulunması karakteristiktir. Flavonlar, flavononların 2,3-dehidro türevleridir. Bitkilerde hem serbest (aglikon), hem de glikozitleri halinde bulunurlar. Flavonların basit üyeleri, aromatik halkalarda hidroksil veya metoksi grupları içeren türevleridir. Yapılarında yalnız oksijen fonksiyonu içermelerinden dolayı, bu grup bileşiklere, oksijenli veya

O-substitue flavonlar da denir. Flavonlar yapılarında bulunan, *O*-substitüentlerin sayısına bağlı olarak gruplandırılmaktadır (Bilaloğlu ve Harmandar 1999; Nizamoğlu ve Nas, 2010).

2.6.1.2. Flavonoller

Flavoneller, C halkasının en fazla yükseltgendiği flavonoidler sınıfıdır. Bunlar, C-3 pozisyonunda hidroksil grubu içeren 2-fenilbenzo- γ -piran çekirdeğini içerirler. Bu nedenle, flavonollere 3-hidroksiflavonlar da denilmektedir. Flavonoller, flavonoidlerin bitkilerde en çok bulunan ve yapı çeşidi en fazla olan sınıfıdır.

Flavonoller, kristal veya amorf özellikli olup, flavonlar gibi açık sarı veya sarı renklidirler. Bu bileşikler genellikle oksijenli ortamda, flavonlara göre daha dayanıksızdırlar. Flavonoller de, flavonlar gibi, yapılarında bulunan hidroksi veya metoksi gruplarının sayısına bağlı olarak gruplandırılabilirler. Flavonol grubu bileşikler gıdalarda yaygın olarak glikozid formunda bulunmaktadır. Bunların başlıcaları, kaemferol, kuersetin ve mirisetin'dir (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

2.6.1.3. Flavanonlar

Flavanonların çekirdek yapısını dayanıksız dihidro- γ -piron halkası oluşturur. Bu nedenle flavanonlar baz veya asit etkisiyle kolayca parçalanarak uygun halkonlara dönüşürler. Flavanon yapısında bir asimetric karbon atomu bulunduğundan, iki optik izomer ya da rasem karışım halinde bulunurlar. Bitkilerde genellikle sola çeviren flavanon izomerleri ile karşılaşılır (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

Flavanonlar da doğada genellikle glikozid formda bulunurlar. Flavanon glikozidleri turunçgil meyvelerinde çok yaygın olarak bulunurlar. Örneğin; naringin, hesperidin, naringenin gibi. Naringin turunçgil sularına acımsı bir lezzet verir (Cemreoğlu, 2004).

2.6.1.4. Flavanoller (Katekinler)

Hemen her meyvede bulunan katekinler, flavonoid biyosentezinde ara ürün olarak yer alırlar. Gıdalarda en yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluştururlar.

Katekinler, C3 atomuna bir OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak adlandırılırlar. Katekinlerin yapılarında iki asimetrik karbon atomu bulunduğundan dört izomerleri bulunmaktadır. Katekinler, hem kimyasal hem de enzimatik olarak havadaki oksijen ile kolaylıkla reaksiyona girerler. Reaksiyon sonucunda kondanse olarak proantosiyanidinleri oluştururlar (Shahidi ve Nacz, 1995).

2.6.1.5. Antosiyanidinler

Doğada serbest halde bulunmazlar, şekerlerle glikozit yapmış olarak bulunurlar ve antosiyanın adını alırlar. Antosiyaninler meyve ve sebzelerin pembe, kırmızı ve mor tondaki çeşitli renklerini veren suda çözünebilir nitelikteki renk pigmentleridir. Pek çok meyve ve sebze yaygın olarak bulunurlar. Antosiyaninler bağlanan şekerlere ve bağlanma pozisyonuna göre adlandırılırlar. Antosiyaninler bir aglikon (antosiyanidin), şeker ve bazen fenolik ve minör organik asitlerden oluşur. Şeker kısmı genellikle ramnoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdan meydana gelir (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999; Shahidi ve Nacz, 1995).

Bitki dokularında bulunan antosiyaninler; bitkinin genetik mirasına, büyümesi sırasındaki çevresel faktörlere, bitkinin mağruz kaldığı stres koşullarına, kullanılabilir su miktarına ve topraktaki mineral ve organik bileşiklerin varlığı ve miktarına bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda sentezlenmektedirler. Ayrıca yetiştirme yılı ile olgunluk derecesi ve hasat sonrası depolama süresi ve sıcaklığı da yapıdaki antosiyanin miktarı üzerine etkilidir (MacDougall, 2002).

2.6.1.6. İzoflavonoidler

İzoflavonoidler biyogenetik bakımdan flavonoidlerle yakın ilişkilidir. Bu bileşikler 1,2-difenilpropan iskeleti içerirler. 1,2-difenilpropan yapısındaki propan zincirinin uçtaki karbon atomu, oksijen atomu üzerinden, A aromatik halkasına yatkındır (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

2.6.1.7. Neoflavonoidler

Neoflavonoidler yapısal ve biyogenetik bakımdan flavonoid ve izoflavonoidlerle yakından ilgilidirler ve bunların izomerik bir sınıfı olarak bilinirler. Neoflavonoidler 1,1-difenilpropan türevleridir. Neoflavonoidlerin küçük bir grubunun çekirdek iskeleti 1,1-difenilpropan yapısına olefinik bağ takılmasından oluşan 1-fenilallilbenzen yapısındadır. Neoflavonoidlerin çoğunluğu 1,1-difenilpropan yapısındaki propan zincirinin uçtaki karbon atomunun, oksijen köprüsü üzerinden A halkasıyla oluşturdukları üç halkalı 4-fenilkroman iskeletini içerirler (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

2.6.1.8. Flavonoid glikozitler

Flavonoid glikozitler, aglikon molekülünün farklı pozisyonlarına bir veya birkaç şeker kalıntısının bağlanmasıyla oluşan bileşiklerdir. Flavonoid glikozitler, şeker kalıntısının aglikon molekülüne bağlanma özelliğine göre *O*- ve *C*-glikozitler olarak iki gruba ayrılırlar. Flavonoid *O*-glikozitler şeker veya şekerlerin, aglikonun fenolik veya alkolik hidroksil grubuna, hemiasetal bağ aracılığı ile bağlanmasından oluşan bileşiklerdir. *C*-glikozitler ise şeker biriminin C-1 atomu üzerinden, karbon karbon bağı ile flavonoid molekülüne doğrudan bağlanmasında oluşurlar. *O*-glikozitler doğada *C*-glikozitlere göre daha yaygındır (Bilaloğlu ve Harmandar 1999).

2.7. Vitaminler

Vitaminler beslenmede önemli rol oynayan gıdaların minör bileşikleridir. Çoğu vitamin bazı işleme ve depolama şartlarında kararsızdır. Bugün vitamin sınıfına giren maddelerin birçoğu amin yapısında olmamasına rağmen, bu isim kullanılmaktadır. Vitaminlerin diğer organik besin maddelerinden farkı, doku yapısına girmemeleri ve organizmaya enerji sağlamamalarıdır. Vitaminler bazı organizmalar tarafından yapılamaz, dolayısıyla dışarıdan diyetle alınması gereken (eksojen veya esansiyel) maddelerdir.

Vitaminler suda çözünenler veya yağda çözünenler olarak iki büyük sınıfa ayrılır (Çizelge 2.4.). Suda çözünen vitaminler; B grubu vitaminleri ve C vitaminidir. C

vitamini hariç bütün suda çözünen vitaminlerin koenzim fonksiyonları vardır. Yağda çözünen vitaminler ise A, D, E ve K vitaminleridir. Bu vitaminleri hayvanlar beslenme yoluyla dışarıdan temin edebilmektedirler (Keha ve Kührevioğlu, 2012). Vitamin eksikliklerinin ciddi hastalıklara sebep olduğu fark edilmiştir. Ancak aynı zamanda özellikle yağda çözünen vitaminlerin aşırı dozda alınması, ciddi toksik etkilere de neden olmaktadır (deMan, 1999).

Çizelge 2.4. Vitaminler ve Fonksiyonları

Vitamin tipi ve adı	Koenzim veya aktif formu	Fonksiyonu
SUDA ÇÖZÜNENLER		
Tiamin	Tiamin pirofosfat (TPP)	Aldehit grubu taşınması
Riboflavin	Flavin mononükleotid (FMN)	Hidrojen atomu (elektron) taşınması
	Flavin adenin dinükleotid (FAD)	Hidrojen atomu (elektron) taşınması
Nikotinamid	Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD ⁺)	Hidrojen atomu (elektron) taşınması
	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP ⁺)	Hidrojen atomu (elektron) taşınması
Pantotenik asit	Koenzim A (CoA)	Açıl grubu taşınması
Piridoksin	Piridoksal fosfat	Amino grubu taşınması
Biyotin	Biyositin	Karboksil grubu taşınması
Folik asit	Tetrahidrofolat	C ₁ -gruplarının taşınması
Vitamin B ₁₂	Koenzim B ₁₂	Hidrojen atomlarının 1,2-kayması
Lipoik asit	Lipoillisin	Hidrojen atomu ve açıl grubu taşınması
Askorbik asit	-	Hidroksilasyonlarda kofaktör
YAĞDA ÇÖZÜNENLER		
A vitamini	11-cis-Retinal	Görme siklüsü
D vitamini	1,25-dihidroksikelo-kalsiferol	Kalsiyum ve fosfat metabolizması
E vitamini	-	Antioksidan
K vitamini	-	Protrombin biyosentezi

2.7.1. Suda Çözünen Vitaminler

2.7.1.1. Thiamin (B₁ Vitamini)

Tiamin, çoğu omurgalılar ve bazı mikroorganizmalar için zorunlu olan bir vitamindir. Tiamin, bir metilen grubu üzerinden substitüe bir tiyazol halkasının bir substitüe pirimidine bağlanması ile meydana gelmiştir. Hücrelerde büyük oranda aktif koenzim formu olan tiamin pirofosfat (TPP) halinde bulunur.

Tiamin pirofosfat, metabolizmanın iki tip reaksiyonunda koenzim rolü oynar; (1) α -keto asitlerin dekarboksilasyonu ve (2) α -keto cisimlerinin oluşumu veya yıkımında. Bu reaksiyonlarda TPP, tiyazol halkasına kovalent ve aktifleşmiş halde bağladığı aldehit gruplarının uzaklaştırılması ve/veya taşınması fonksiyonunu görür. Bu esnada koenzim kofaktör olarak Mg^{+2} 'a ihtiyaç gösterir.

Tiamin pirofosfatın α -keto asitlerinin dekarboksilasyonunda oynadığı rolünü, piruvik asidin asetaldehide dönüşme reaksiyonu örneği ile açıklayalım: Tiyazol halkasının 2 pozisyonundaki hidrojeni bir karbanyonun oluşumuyla iyonlaşır. Karbanyon iyonu, piruvatın karbonil karbon atomuyla reaksiyona girer ve CO_2 çıkışıyla birlikte tiyazol halkasının hidroksietil türevine dönüşür. Bu hidroksietil grubu ya asetaldehide dönüşecek şekilde hidroliz olur veya okside olarak bir açıl grubuna çevrilir.

Tiamin en çok bira mayasında ve buğday, pirinç, arpa gibi tahılların kabuğunda bulunur. Bundan başka fasulye, bezelye, ceviz vb.' de beslenme bakımından yeter miktarda vardır (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.1.2. Riboflavin (*B₂ Vitamini*)

B_2 vitamini ilk defa süttten elde edildiği için laktoflavin adını da alır. Bütün bitkiler ve birçok mikroorganizmalar tarafından sentezlebildiği halde hayvanlarca sentezlenemez.

Riboflavin bir izoalloksazin türevidir. 10 nolu azota, ribozun indirgenmesiyle meydana gelen ribitol takılıdır.

Riboflavinin ribitol grubunun 5'-karbon atomuna ester bağıyla fosfat bağlanması sonucu flavin mononükleotid (FMN), buna da adenilat (AMP) takılmasıyla (adenilasyon) flavin adenin dinükleotid (FAD) meydana gelir. Flavinnükleotidler, flavoproteinler veya flavoenzimler olarak bilinen redoks enzimlerinin prostetik gruplarıdır. Bu enzimler piruvatın, yağ asitlerinin, amino asitlerin oksidatif yıkımına ve elektron taşınma olayına katılırlar. Çoğu flavoenzimlerde flavinnükleotidi proteine kovalent olmayan, fakat sıkı bir şekilde bağlanır. Süksinat dehidrogenazda farklı olarak, FAD, proteine bir histidin üzerinden kovalent bağlıdır. Bazı flavoproteinler, ek kofaktör olarak, bir veya daha fazla metal iyonu ihtiva eder. FMN ve FAD, koenzimi oldukları enzimin katalitik etkisi sırasında, izoalloksazin

halkasının dönüşümlü bir indirgenmesine maruz kalır. Bu nükleotidlerin indirgenmiş halleri FMNH₂ ve FADH₂ şeklinde gösterilir.

Besin maddelerinin oksidasyonunda bazı dehidrogenazların koenzimi olarak rol alan FAD, FADH₂'ye dönüşür ve FADH₂ de elektronlarını solunum zincirine aktararak ATP sentezlenmesini sağlar. FADH₂ enzime sıkı bağlı olduğundan, elektronlarını mitokondri iç membranında bulunan solunum zincirine (elektron transport sistemi, ETS) iletebilmesi, bu enzimlerin de mitokondri iç membranı üzerinde ve solunum zincirinin bitişiğinde yer almasıyla mümkündür.

Farklı flavoproteinlerin okside şekilleri oldukça renklidirler. Görünür bölgede kuvvetli absorpsiyon bantlarından dolayı karakteristik sarı, kırmızı veya yeşil renkleri sahiptirler. İndirgenmeyle flavoproteinler renksizleşir; bu değişiklikten yararlanarak bu enzimlerin aktivite ölçümleri gerçekleştirilir.

Riboflavin, en çok süt, bira ve ekmek mayası, karaciğer, ıspanak, kuru fasulye, balık ve yumurtada bulunur (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.1.7.3. Nikotinamid (B₃ Vitamini)

Niasinamid adı da verilen B₃ vitamininin diğer adı PP vitamindir. Bu ad pellegra adı verilen bir hastalığı önlemesi sebebiyle "pellegra preventive"den baş harfleri alınarak verilmiştir. Nikotinik asidin de vitamin etkisi vardır; organizmada nikotinamid de nikotinik aside çevrilebilir.

Bitkiler ve çoğu hayvanlarda nikotinik asit, değişik yollarla özellikle triptofandan sentezlenir. Hayvanlar triptofanca zengin proteinlerle beslenirlerse nikotinik asit eksikliği görülmez.

Nikotinamid ihtiva eden başlıca iki koenzim vardır: Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP⁺). Her iki koenzimpiridin koenzimi veya piridin nükleotidi olarak da adlandırılır. NADP⁺'da NAD⁺'den farklı olarak, adenine bağlı riboz biriminin 2'-hidroksil grubu fosfat ile ester yapmış haldedir.

NADP⁺ ve NAD⁺, piridine bağımlı dehidrogenaz enzimlerinin koenzimi olarak fonksiyon görür. Bu koenzimler enzim molekülüne nispeten gevşek bağlıdır. Substrat moleküllerinde hidrojen atomlarının uzaklaştırılması sırasında elektron alıcısı rolünü

oyunlar. Bu reaksiyonlarda substrat üzerindeki hidrojen atomlarından birisi doğrudan koenzimin okside şeklinin nikotinamid kısmına (NAD^+ ve NADP^{+} 'ye) aktarılırken, diğeri de H^+ iyonu halinde çözeltilmeye geçer. Yani, bu koenzimler 1 tane H^+ ve 2 tane de elektron bağladığından, bir H^- (hidrür) iyonu bağlamış olur.

Genellikle piridine bağımlı dehidrogenazlar ya NAD^+ veya NADP^+ için spesifiktir; bununla birlikte glutamat dehidrogenaz gibi bazıları ise her iki koenzimle de çalışabilir. NADPH tamamen indirgeyici biyosentez olaylarında görev alırken, bunu koenzim olarak kullanan enzimlere 'redüktazlar' denir. NADH ise elektronlarını solunum zincirine aktarır ve ATP sentezini sağlar. Biyosentez olaylarının büyük bölümü sitoplazmada ve ER membranının sitoplazmaya bakan yüzeyinde gerçekleştirildiğinden, NADP^{+} 'li enzimler daha çok sitoplazmada, NAD^{+} 'li dehidrogenazlar ise çok defa mitokondri matriksinde yer alır. Piridin nükleotidli dehidrogenazla katalizlenen reaksiyonlar genelde dönüşümlüdür. NAD^+ ve NADP^+ 'nin indirgenmiş formları 340 nm de maksimum absorpsiyon gösterir ve bu özelliklerinden piridin nükleotide bağımlı reaksiyonların gerçekleşme derecesini takip etmede yararlanılır.

B_3 vitamini en çok ette ve özellikle karaciğerde bulunur. Bundan başka bira mayası, yeşil sebzeler, çay, kahve, ceviz, fındık, buğday, çavdar, baklagiller de bu vitamin için iyi bir kaynaktır (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.1.7.4. Pantotenik Asit (B_5 Vitamini)

Bir β -alanin türevi olan pantotenik asit, 2,4-hidroksi-3,3-dimetil bütirik asit olan pantotenik asidin karboksil grubuyla β -alaninin amino grubunun amid bağı ile bağlanmasından meydana gelmiştir. Bitkiler ve çoğu mikroorganizmalar tarafından sentezlenen pantotenik asit, omurgalılar için de mutlak esansiyel bir vitamindir.

İnsan ve hayvan organizmasında pantotenik asidin önemi, koenzim A (CoA)'nın yapısında bulunmasından ileri gelir. Koenzim A başlıca üç birimden oluşmuştur: β -merkaptotilamin, pantotenik asit ve ribozom 3'-hidroksil grubu fosforillenmiş ADP . Aktif kısmı uçtaki sülfidril (tiyol,-SH) grubudur. Koenzim A açıl grubu taşıyıcısı olarak şu enzimatik reaksiyonlara iştirak eder; yağ asitlerinin oksidasyonu, yağ asitlerinin sentezi, piruvatın oksidasyonu ve biyolojik açılma reaksiyonları. CoA 'ya açıl grubu olarak en fazla bağlanan asetil grubudur.

Asetil CoA çok negatif bir hidroliz ΔG° değerine sahiptir. Diğer bir deyişle, asetil CoA'nın asetil grubu transfer potansiyeli yüksektir. ATP, aktifleşmiş fosfat taşıyıcısı olduğu gibi, CoA da aktifleşmiş açıl ve asetil grupları taşıyıcısıdır. Açılma ve asetilleme reaksiyonlarında gerekli olan enerji tiyoester bağının hidroliziyle sağlanır.

Pantotenik asit, karaciğer, böbrek, yumurta, bira mayası, bezelye, kuru fasulye, süzme bal, karnabahar ve lahanada çok miktarda mevcuttur (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.1.5. Piridoksin (*B₆ vitamini*)

2-Metil-3-hidroksi-4,5-hidroksimetil piridin yapısında olan piridoksin (piridoksol), biyolojik olarak piridoksal ve pridoksamine dönüşebilir. *B₆* vitamininin aktif koenzimleri de piridoksal fosfat ve piridoksamin fosfattır.

Piridoksin koenzimleri çok yönlü fonksiyona sahiptirler ve çok çeşitli enzimatik reaksiyonlara katılırlar. Piridoksal fosfatın zorunlu koenzim olarak katıldığı genel bir enzimatik reaksiyon tipi transaminasyondur; bu reaksiyon tipinde bir amino asidin α -amino grubu bir α -keto asidin α -karbon atomuna taşınır. Bu gibi reaksiyonları katalizleyen enzimler transaminazlar veya aminotransferazlar olarak adlandırılır. Transaminasyon reaksiyonlarında, bir amino asidin α -amino grubuyla enzim bağlı piridoksal fosfat arasında bir Schiff bazı oluşur. Daha sonra bu amino grubu amino asitten ayrılır ve bir α -keto asit ortaya çıkar. Meydana gelen enzime bağlı piridoksamin fosfat, bir başka α -keto asidiyle reaksiyona girer; sonuçta yeni bir amino asit ve piridoksal fosfat enzim kompleksi oluşur.

Piridoksal fosfatın transaminasyon reaksiyonları dışında amino asitlerin ara metabolizmasının şu reaksiyonlarında da koenzim rolü vardır: α -amino asitlerin dekarboksilasyonu, molekülden H_2O ve H_2S 'in uzaklaştırılması ve rasemizasyon. Yine glisin ve serinin birbirine dönüşmesinde koenzim olarak etki eden tetrahidrofolik asitle beraber piridoksal fosfata da ihtiyaç vardır.

B₆ vitamini en çok maya, pirinç kabukları, yumurta sarısı, tahıl ve sebzelerde ve daha az miktarda karaciğer, böbrek, balık ve sütte bulunur (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.1.6. Biotin

Biyotine H vitamini veya koenzim R de denir. Biotin, birbiriyle kondanse olmuş bir imidazol ile bir tiyofen halkasından ve tiyofen halkasına bağlı bir valerik asitten ibarettir.

Biyotin, CO₂'nin enzimatik taşınmasında rol alan ve ayrıca β-keto asitleri dekarboksile eden enzimlerde kovalent bağlı bir prostetik grup olarak bulunur. Mesela, biyotin propiyonil CoA karboksilaza enzimin yapısındaki spesifik bir lisinin ε-amino grubuna amid bağıyla bağlanır. Bu bileşik biyotinlisin veya biyositin olarak adlandırılır. Propiyonil CoA karboksilaz, asetil CoA karboksilaz gibi belirli karboksilleci enzimlerde biyotin, CO₂'in taşıyıcısı rolünü oynar; bu esnada çok dayanıksız olan karboksi biyotin halinde bulunur.

Biyotin en çok yumurta sarısında, karaciğerde, sütte, böbrekte ve mayada bulunur. Çiğ yumurta yendiği zaman organizma biyotinden yararlanamaz. Çünkü yumurta beyazında bulunan avidin adı verilen glikoprotein, biyotinle birleşerek sindirilmeyen bir kompleks meydana getirir ve dışkı ile atılır. Pişmiş yumurtada avidin denatüre olur ve biyotini bağlayamaz ve etki de ortadan kalkar (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.1.7. Folik Asit (B₁₀ veya B₁₁ Vitamini)

Folik asit, ilk olarak ıspanakta bulunmuş olup, bitkilerde oldukça yaygındır. Bağırsaklardaki mikroorganizmalar tarafından da sentezlenir. Memelilerce sentezlenemezler; eksikliğinde üreme zayıflığı ve aneminin (kansızlık) farklı şekilleri oluşur. Folik asit üç çeşit yapı taşından oluşur: Substitüe bir pteridin, p-aminobenzoik asit ve glutamik asit. Folik asit, pteroilglutamik asit olarak da adlandırılır. Bazen glutamik asidin γ-karboksil grubu üzerinden bir veya daha çok sayıda glutamik asit bağlıdır. Folik asidin türevi tetrahidrofolik asittir (FH₄ veya THF); bu ise folik asidin 5,6,7 ve 8 nolu atomlarının hidrojenasyonu ile meydana gelir. Besinlerde bulunan folik asit organizmada tetrahidrofolik aside dönüşebilir. Tetrahidrofolik asit, bir karbonlu birimlerin taşınması reaksiyonlarında koenzim olarak görev yapar.

Tetrahidrofolat tarafından taşınan bir karbonlu birimler, 5 veya 10 nolu azot atomu veya her ikisine birden bağlanırlar. Söz konusu birimler üç oksidasyon durumuna

sahip olabilirler. En çok yükseltgenmiş bir karbon birimi olan CO₂'in ise biyotin tarafından taşındığı yukarıda anlatılmıştır.

Çizelge 2.5. THF tarafından taşınan bir karbonlu birimler

Oksidasyon derecesi	Grup
En çok indirgenmiş	-CH ₃ , metil
Az indirgenmiş	-CH ₂ -, metilen
En çok yükseltgenmiş	-CHO, formil
	-CH=NH, formimino
	-CH=, metenil

Çizelge 2.5.'de sıralanan bir karbonlu birimler birbirlerine çevrilebilirler. Örneğin; N5, N10-metilentetrahidrofolat, N5-metiltetrahidrofolata indirgenebilirken, N5, N10-meteniltetrahidrofolata da yükseltgenebilir ve bu da aynı oksidasyon basamağındaki N5- formiminotetrahidrofolat ve N10- formiltetrahidrofolata çevrilebilir. N10-formiltetrahidrofolat aynı zamanda format ve ATP'den de sentezlenir.

Metabolizma olaylarında en önde gelen bir karbonlu birim kaynağı serin olup, bu birim glisine dönüşürken verir. Tetrahidrofolat türevlerinin katıldığı reaksiyonlara örnek olarak pürin halkasının sentezi, metiyoninden homosisteinin oluşumu reaksiyonlarını verebiliriz. Folik asit, en çok yeşil yapraklarda ve karaciğerde bulunur (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.1.8. Lipoik Asit

Bitkilerin çoğunda ve tiroid hariç bütün hayvansal dokularda bulunan lipoik asit, 1,2-ditiolen-3-valerik asit kimyasal yapısındadır ve iki şekilde mevcuttur: Siklik bir disülfid yapıda olan lipoik asit ve 6 ile 8 pozisyonlarında birer sülhidril grubu taşıyan indirgenmiş açık zincirli dihidrolipoik asit. Redoks reaksiyonlarıyla bu iki şekil birbirine dönüşebilir.

Lipoik asit, piruvat ve diğer α -keto asitlerinin oksidatif dekarboksilasyonunda koenzimlerden biri olarak etki eder; bu kompleks reaksiyonlara birçok koenzim katılır. Piruvat, önce karboksil grubunu kaybeder ve enzime bağlı tiaminpirofosfatın hidroksieril türevi oluşur. Son olarak dihidrolipoil transasetilaz enzimine bağlı lipoik asitle reaksiyon olur; bu sırada elektronlar ve açıl grubu taşınarak 6-asetil dihidrolipoik asit oluşur. Daha sonra lipoik asit rejenere olur; açıl grubu koenzim A

üzerine taşınır ve tiyol grupları elektron transferiyle tekrar okside olarak siklik yapıda lipoik asit meydana gelir. Lipoik asit, dihidrolipoil transasetilaz üzerindeki spesifik bir lisinin ϵ -amino grubuyla bir amid bağıyla bağlanır; bu lipoamid olarak adlandırılır (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.1.9. Kobalamin (B_{12} Vitamini)

Siyanokobalamin olarak adlandırılan B_{12} vitamini iki kısımdan ibarettir. Bunlardan birisi, hemoglobinin porfirin halka sistemine benzeyen korrin halka sistemidir; hem grubundan farklı olarak dört pirol halkasından ikisi birbirine metenil köprüsü olmaksızın doğrudan bağlıdır. Halka sisteminin içinde merkezi pozisyonda bulunan kobalt atomu, dört pirrol halkasının azot atomlarından birindeki hidrojenin yerine geçmiş ve diğer üç azot atomu ile koordine kovalent bağ meydana getirmiştir. B_{12} vitamininin ikinci bileşeni, D-riboza α -N-glikozid bağıyla bağlanmış 5,6-dimetil benzimidazol bazıdır. Bu diğer nükleotidlerde karşılaşılanlardan farklı olarak α -N-glikozid yapıdadır. Ribonükleotid, diğer azot atomuyla kobalt atomuna bir koordinasyon bağı ile, 3'-fosfat grubu ile de korrin halkasının yan zincirine bir ester bağıyla bağlanır. Kobalt atomunun altıncı koordinasyon yerinde bir siyanür iyonu bağlanmışsa, siyanokobalamin adını alır. Siyanür iyonu yerine nitrit, sülfid ve hidroksit iyonlu benzer kompleksler de bilinmektedir. Koenzim B_{12} de siyanür ligandı yerine 5'-deoksiadenozil grubu geçmiştir. Bu bileşikte 5'-deoksiadenozil grubunun C-5 atomu merkezdeki kobalt atomuna kovalent bir bağ ile bağlıdır. B_{12} vitamininin diğer bir şekli olan pseudovitamin B_{12} , ribonükleotidinde 5,6-dimetilbenzimidazol yerine adenin ihtiva eder.

Hayvanlar ve bitkiler B_{12} vitaminini kendileri sentezleyemez, ancak belirli mikroorganizmalar tarafından sentezlenir. Besinlerde bulunan B_{12} vitamini, mide öz suyunda bulunan "intrinsik faktör" adı verilen spesifik bir glikoprotein tarafından bağlanır ve ince bağırsaktan emilir; daha sonra transkobalamin proteinince bağlanarak dokulara taşınır.

Koenzim B_{12} , değişik enzimlerin etkileri için gereklidir. Koenzim B_{12} 'nin katıldığı enzimatik reaksiyonlarda, substrat molekülünün bir karbon atomuna bağlı bir hidrojen atomunun komşu karbona 1,2-kayması gözlenir; aynı zamanda, hidroksil, amino, alkil veya karboksil grubu gibi bir diğer farklı olarak 2,1-kayması gösterir.

B₁₂ vitamininin katıldığı ikinci sınıf bir sınıf enzimatik reaksiyonlarda koenzim, kobalt atomunun 6. koordinasyon pozisyonunda 5'-deoksiadenozil grubu yerine bir metil grubu ihtiva eden metilkobalamindir. Bu reaksiyonlarda metilkobalamin, N⁵-metiltetrahidrofolat ile birlikte bir metil grubunun belirli akseptör moleküllere taşınmasında taşıyıcı rolü oynar. Bu akseptör moleküllerinin başında metiyonine dönüşen homosistein gelir.

B₁₂ vitamini etkisinin gösteren maddelere en çok akciğer ve böbrekte olmak üzere et, süt, yumurta ve balıkta bulunur (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.1.10. C Vitamini

C vitamini askorbik asit olarak da adlandırılır. Yapı itibarıyla en basit vitaminlerden biridir. Bir şeker asidinin laktonundan ibarettir. Birçok hayvan ve bitki askorbik asidi glukozdan ve diğer basit ön basamaklardan sentezleyebilir. Mikroorganizmalarda askorbik asit yoktur. İnsan dahil bazı omurgalılar için esensiyeldir.

Askorbik asit, kolayca hidrojen atomu veren ve bu sırada dehidroaskorbik aside dönüşen kuvvetli bir indirgeyici ajan, yani, antioksidandır. Dehidroaskorbik asit de vitamin etkisine sahiptir. Bu aktivite, dehidroaskorbik asidin lakton halkasının diketogulonik aside hidroliziyle kaybolur. Besinlerin ısıtılması sırasında askorbik asit büyük ölçüde etkisini kaybeder.

Diğer suda çözünen vitaminlerle karşılaştırıldığında, askorbik asit hayvansal ve bitkisel dokularda oldukça yüksek konsantrasyonlarda mevcuttur. İnsan kan plazması 100 ml'de 1 mg kadar askorbik asit ihtiva eder. Narenciye ve domates askorbik asitçe oldukça zengindir.

Dokularda askorbik asit konsantrasyonu nispeten fazla olmasına ve nispeten basit yapısına rağmen, vitamin olarak esas önemi henüz bilinmemektedir. Kofaktör olarak, prolinin hidroksiproline enzimatik hidroksilasyonu gibi hidroksilasyon reaksiyonlarına katılır; bununla birlikte bu reaksiyonlar için hiçbir spesifitesi yoktur ve antiskorbit özellikte olmayan diğer indirgeyici bileşikler de yerini tutabilir.

C vitamini kılcal damar duvarlarının geçirgenliğini azaltır. Eksikliğinde deride kanamalar meydana gelir; devam ederse skorbit adı verilen bir eksiklik hastalığı

meydana gelir. Bu hastalıkta diş etlerinde şiddetli kanamalar olur (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.2. Yağda Çözünen Vitaminler

Yağda çözünen vitaminler A, D, E ve K vitaminlerinin hepsi de izopren birimlerinden meydana gelmişlerdir. Üzerlerinde çok yoğun araştırmalar yapılmasına ve insan besininde çok yaygın bulunmasına rağmen, spesifik biyolojik fonksiyonları hakkında suda çözünen vitaminlere göre daha az şey bilinmektedir. Şimdiye kadar yağda çözünen vitaminlerin hiçbirisi için spesifik bir koenzim fonksiyonu bulunmamıştır ve sadece A ve D vitaminlerinin etkisinin moleküler mekanizması tanımlanabilmiştir.

2.7.2.1. A vitamini

A vitamini tabiatta iki yaygın şekliyle mevcuttur: memeli dokularında ve deniz suyu balıklarında bulunan A₂ vitamini veya retinol₂. Her ikisi altı üyeli bir karbon halkası ve 11 karbonlu bir yan zincirden ibarettir.

Memelilerde sadece retinol A vitamini aktivitesi göstermez; aynı zamanda bitkilerde çok yaygın olan belirli karotinoidler (özellikle α -, β - ve γ - karoten) de A vitamini aktivitesi gösterir. Bu karotinoidler bağırsak zarında ve karaciğerdeki enzimatik reaksiyonlarla A vitaminine dönüşür. Simetrik bir yapıya sahip olan β -karoten ortadan bölünür ve iki molekül retinol meydana gelir. Retinol, memeli hayvan dokularında bulunur ve kanda uzun zincirli yağ asidiyle ester oluşturarak taşınır.

A vitamini eksikliği genç hayvanlarda, büyüme geriliği, kemik ve sinir sisteminin doğru gelişmemesine sebep olur, deri kurur ve kalınlaşır; böbrekler ve değişik bezler dejenerasyona uğrar ve kısırlık görülür. A vitamini eksikliğinden en fazla etkilenen gözlerdir. Genç hayvanlar ve küçük çocuklarda vitamin eksikliğinin erken belirtisi olarak kseroftalmi diye bilinen hastalık ortaya çıkar ve bazı tropikal bölgelerde körlüğe götürür. Yetişkinlerde A vitamini eksikliği gece körlüğü şeklinde ortaya çıkar. Gece körlüğü, karanlığa adapte olamama durumudur.

İnsanın günlük A vitamini ihtiyacı bir miligramın altındadır; bu ihtiyaç büyük oranda salata, ıspanak, patates gibi yeşil ve sarı bitkisel besinlerden karşılanır. Bunların

hepsi de karotence zengindir. A vitamininin fazla alınması toksikdir ve çocuklarda kolay kırılan kemiklerin oluşmasına sebep olur (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.2.2. D vitamini

D vitamini birkaç formda bulunur, en önemli iki formu D₂ (ergocalciferol) ve D₃ (cholecalciferol) vitaminleridir. D₂ ve D₃ vitaminin öncülleri sırasıyla ergosterol ve 7-dehidrokolesterold r. Bu  nc ller yani provitaminler UV ışığı ile D vitaminine dönüşebilirler. Bu iki ana provitamine ek olarak ışınla uyarıldıklarında D vitamini aktivitesi gösteren steroller vardır. Provitaminler insan derisinde güneş ışığına maruz kalarak D vitaminine dönüşebilirler. Çok az miktarda gıda D vitamini için kaynak olduğundan dolayı diğer vitaminlere nazaran insanların D vitamini eksikliği yaşaması ihtimali daha yüksektir. Bazı gıdalara yapılan D vitamini ilavesi eksikliğinde ortaya çıkan raşitizm hastalığını yok etmede yardımcı olmaktadır.

Yetişkin bir insanın D vitamini ihtiya ı günlük yaklaşık 20  g'dır. D vitamini, karaciğerde yeteri kadar depolanabilir ve haftalarca kullanılabilir. A vitamininde olduğu gibi, D vitaminin de aşırı alınmasında kemik iskeletinin kırılabilirliği artar; bu gözlemler her iki vitaminin kalsiyumun biyolojik transportunda ve depolanmasında rol oynadığını göstermektedir.

D vitaminleri, kalsiyum ve fosfat iyonlarının ince bağırsaklardan emilmesini hızlandırır. Kolekalsiferol bu etkiyi organizmada bazı değişikliklere uğradıktan sonra göstermektedir.  nce kolekalsiferol, karaciğerde daha aktif bir madde olan 25-hidroksikolekalsiferole ve bu da böbreklerde çok daha aktif olan 1,25-dihidroksikolekalsiferole dönüşür (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.2.3. E vitamini

E vitamini etkisi gösteren bileşikler  -,  -,  -,  -tokoferoller olarak bilinirler. Tokoferoller içinde en bol bulunan ve en aktif olanı  - tokoferoldür. Tokoferoller bir kroman halka sistemi ve izoprenoid bir yan zincir ihtiva ederler. Kroman halka sistemi, bir benzen halkası ile bir piran halkasının koordinasyonundan meydana gelir. 2-Metil-2-fitol-6-hidroksi kromana tokol denir. Bütün tokoferoller tokol türevidir.

Tokoferoller antioksidan olarak bilinirler. Moleküler oksijene maruz bırakılan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bu gibi oksidasyonlar doymamış yağ asitlerinin polimerleşmesine sebep olur. Gerçekten, hayvanlarda tokoferol eksikliğinin bazı belirtileri, antioksidan özellikli bazı bileşiklerle de giderilebilir. Buna göre tokoferollerin fonksiyonlarından birisi biyolojik membranların lipitlerindeki birçok doymamış yağ asitlerini moleküler oksijenin bozucu etkisine karşı korumaktır. Tokoferoller en çok buğday tanesi yağında bulunurlar (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

2.7.2.4. K vitamini

Naftokinon halkası ihtiva eden K vitamininin etkisini gösteren doğal ve sentetik birçok bileşik vardır. K₁ (phylloquinone) ve K₂ (menaquinone) vitamini şeklinde gösterilen iki doğal K vitamini bilinmektedir. K₂ vitamini aktif şekil olarak gösterilmektedir. Sentetik K vitamini olan K₃ vitamini (menadione) uzun yan zincir ihtiva etmez.

K₁ ve K₂ vitamini birlikte bulunur. K₁ vitamini özellikle ıspanak, kaba yonca gibi yeşil yapraklarda bulunur. Ayrıca, lahana, karnabahar, domates, soya fasulyesi, pirinç kepeği ve yulaf filizlerinde de bulunur. K₂ vitamini, aynı zamanda, bağırsak bakterilerinin bir metabolizma ürünüdür. K₁ vitamini atmosferik oksijenli ortamda yavaş bozunur ancak ışık altında bu bozunma çok hızlı olur. Isıya karşı kararlıdır ama alkali ortamda kararsızdır.

Yetişkin bir insanın günlük ihtiyacı 4 mg dır. Menadione (2-metil 1,4-naphtaquinone) doğal olarak bulunan K vitamininin iki katı aktiviteye sahip sentetik bir üründür (Keha ve Kührevioğlu, 2012).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmalarımızda kullandığımız kazein, azokazein, azoalbumin, hemoglobin, standart serum albumin, jelatin, etanol, metanol, amonyum persülfat, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, bromfenol mavisi, glisin, N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin, n-butanol, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, sodyum dodesil sülfat, asetik asit, Sephadex G-100, CM-Sephadex, gliserin, sodyum klorür, sodyum asetat, fosforik asit, sülfürik asit, sodyum fosfat, Coomassie brilliant blue G-250, Coomassie brilliant blue R-250, protein standartları, trikloro asetik asit (TCA) kimyasalları Sigma-Aldrich Chemia GmbH Steinheim Germany'den temin edilmiştir.

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Çözeltilerin Hazırlanması

Araştırma boyunca kullanılan tamponların ve çözeltilerin hazırlanması, kullanım yerleri aşağıda belirtilmiştir.

1. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan tampon: 0,05 M CH₃COONa, pH:6. 4,1 g (0,05 mol) CH₃COONa alınarak 950 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak pH:6'ya ayarlandı ve daha sonra toplam hacim saf su kullanılarak 1 litreye tamamlandı.

2. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan TCA çözeltisi: %5'lik TCA çözeltisi, 5 g trikloroasetik asit (TCA) alınarak 90 mL saf suda çözüldü. Toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.

3. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 0,1 M fosfat tamponundan (pH:7) 90 mL alındı ve içerisinde 1 g kazein çözüldü. Son hacim 100 mL'ye aynı tampon kullanılarak tamamlandı. Hazırlanan çözelti 15 dakika boyunca kaynayan suyun içerisinde bekletildi. Hazırlanan çözeltinin stabilitesi yaklaşık bir hafta olarak belirlendi.

4. Optimum pH çalışmaları için kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması:

pH:4-5 aralığı için 0,1 M asetat tamponu (CH_3COONa) kullanıldı. 1,36 g CH_3COONa alınarak 90 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH:6-7 aralığı için 0,1 M fosfat tamponu kullanıldı. 1,42 Na_2HPO_4 alınarak 90 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH:8-9 aralığı için 0,1 M Tris-HCl tamponu kullanıldı. 1,21 g Tris alınarak 90 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

pH:10'da 0,1 M borat tamponu kullanıldı. 1,38 g borik asit alınarak 90 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

5. Substrat spesifikliğinin belirlenmesi için gereken çözeltilerin hazırlanması:

%1'lik Azokazein çözeltisi: 1 g azokazein alınarak 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda çözüldü ve son hacim yine aynı tamponla 100 mL'ye tamamlandı.

%1'lik Hemoglobin çözeltisi: 1 g hemoglobin alınarak 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda çözüldü ve son hacim yine aynı tamponla 100 mL'ye tamamlandı.

%1'lik Azoalbümin çözeltisi: 1 g azoalbümin alınarak 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda çözüldü ve son hacim yine aynı tamponla 100 mL'ye tamamlandı.

%1'lik Jelatin çözeltisi: 1 g jelatin alınarak 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda çözüldü ve son hacim yine aynı tamponla 100 mL'ye tamamlandı.

6. Proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

10 mM FeCl_3 : 0,162 g FeCl_3 alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM FeCl_2 : 0,126 g FeCl_2 alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM MnCl_2 : 0,125 g MnCl_2 alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM MgCl₂: 0,095 g MgCl₂ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM CaCl₂: 0,111 g CaCl₂ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM NiCl₂: 0,130 g NiCl₂ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM HgCl₂: 0,472 g HgCl₂ alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Çalışmalarımız için kullandığımız 1 mM'lık FeCl₃, FeCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, NiCl₂ ve HgCl₂ çözeltilerini hazırlamak için daha önceden hazırladığımız 10 mM'lık çözeltilerden 10 mL alındı ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0,1 mM'lık FeCl₃, FeCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, NiCl₂ ve HgCl₂ çözeltilerini hazırlamak için 1 mM'lık çözeltilerden 10 mL alınarak hacim 100 mL'ye tamamlandı.

7. Proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin incelenmesi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

10 mM EDTA: 0,292 g EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) alındı ve 95 mL saf suda çözüldü, son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM SDS: 0,288 g SDS (Sodyum dodesil sülfat) alındı ve 95 mL saf suda çözüldü, son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM β-merkapt etanol: 69 µL β-merkapt etanol alındı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM iyodasetamid: 0,185 g iyodasetamid alındı ve 95 mL saf suda çözüldü, son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

1 mM'lık EDTA, SDS, β-merkapt etanol ve iyodasetamid çözeltilerini hazırlamak için daha önceden 10 mM'lık olarak hazırlanan çözeltilerden 10 mL alındı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0,1 mM'lık EDTA, SDS, β-merkapt etanol ve iyodasetamid çözeltilerini hazırlamak için daha önceden 1 mM'lık olarak hazırlanan çözeltilerden 10 mL alındı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

8. İyon değişim kolonu (CM-Sephadex) dengeleme tamponu: 4,1 g CH₃COONa alınarak 900 mL saf suda çözüldü, pH:5,7'ye kadar 1 M'lık HCl ile titre edildi ve son hacim saf su kullanılarak 1 L'ye tamamlandı (0,05 M CH₃COONa pH:5,7).

9. SDS-Elektroforezinde kullanılan ayırma jelinin hazırlanması: 15 mL Tris-HCl (1 M, pH:8,8), 13,2 mL, %30'luk akrilamid-%0,8'lik Bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetra metil etilen diamin), 9,4 mL saf su karıştırıldı, son olarak 0,8 mL %1,5'luk amonyum persülfat (APS) ilave edildi.

10. SDS-Elektroforezinde kullanılan yığma jelinin hazırlanması: 1,24mL Tris-HCl (1 M, pH:6,8) 1 mL, %30'luk akrilamid-%0,8 lik bisakrilamid, 0,1 mL %1'lik SDS, 0,1 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetra metil etilen diamin), 7,8 mL saf su karıştırıldı, son olarak 0,2 mL %1,5'luk amonyum persülfat (APS) ilave edildi.

11. SDS-Elektroforezinde kullanılan numune tamponunun hazırlanması: 1 mL 0,63 M Tris-HCl (pH:6.75), 1 mL gliserol, 1 mL %10'luk SDS, 1 mL %0,1'lik bromofenol mavisi alındı ve son hacim 10 mL'ye saf su ile tamamlandı. Numune tamponu kullanılmadan önce 1 mL başına 50 µL olacak şekilde β-merkapt etanol eklendi.

12. SDS-Elektroforezinde kullanılan yürütme tamponunun hazırlanması: 6 g Tris ve 28,8 g Glisin alınarak 200 mL saf su içerisinde çözüldü. Son olarak 20 mL %10'luk SDS ilave edildi ve toplam hacim saf su ile 2 L'ye tamamlandı.

13. SDS-Elektroforezinde kullanılan fiksatif çözeltinin hazırlanması: 500 mL metanol, 100 mL asetik asit (glasiyel) alındı ve hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

14. SDS-Elektroforezinde kullanılan boyama çözeltisinin hazırlanması: 1 g Coomassie brillant blue R-250 tartıldı ve 500 mL metanolde çözüldü. 100 mL asetik asit ilave edildikten sonra hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

15. SDS-Elektroforezinde kullanılan renksizleştirme çözeltisinin hazırlanması: 125 mL metanol ve 175 mL asetik asit alındı, son hacim saf su ile 2,5 L'ye tamamlandı.

16. Jel filtrasyon kromotografisinde kullanılan tampon çözeltinin hazırlanması: 0,05 M Na₃PO₄ / 1 mM Ditiyoeritrotiyol (DTT) (pH:7), 7,8 gram Na₃PO₄ ve 0,15 g DTT tartıldı ve 950 mL saf su içerisinde çözüldü. 1 M HCl ile pH:7 oluncaya kadar titre edildikten sonra hacim saf su kullanılarak 1 L'ye tamamladı.

17. C vitamini tayininde kullanılan %0,1'lik diklorofenolindofenol (DCPIP) çözeltisinin hazırlanması: 0,01 g diklorofenolindofenol alındı 10 mL saf suda çözüldü.

18. E vitamini tayininde kullanılan 0,01 M tetrazolium blue çözeltisinin hazırlanması: 0,107 g tetrazolium blue alındı ve 50 mL saf su içerisinde çözüldü.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Protein Tayini

3.3.1.1. Kalitatif protein tayini

Kromotografi işlemleri sırasında toplanan tüplerde kalitatif protein miktarı tayini 280 nm'de absorbans okunarak gerçekleştirildi. Bu metot trozin triptofan ve fenilalanin gibi halkalı bir grup ihtiva eden aminoasitlerin 280 nm'de maksimum absorbans göstermeleri esasına dayanmaktadır (McIntosh 1969). Eşit hacimde toplanan fraksiyonlar kuarts küvetlere alındı ve absorbansları spektrofotometrede okundu. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı.

3.3.1.2. Bradford yöntemiyle protein tayini

Homojenatta, amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ve kromotografi işleminden sonraki aktif eluatlardaki protein miktarı tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bu yöntem boyanın farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde farklı şiddette mavi renk oluşturmasından faydalanılarak geliştirilmiştir. Coomassie brilliant blue G-250 fosforik asitli ortamda proteinlerin yapısındaki, arginin gibi bazik aminoasitlere ve aromatik halka içeren aminoasitlere bağlanır ve oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Yöntemin hassasiyeti 1-100 µg aralığında değişmektedir (Bradford 1976).

3.3.2. Mis Zambağı Çiçeklerinden (*Lilium candidum*) Proteaz Enziminin Saflaştırılması

3.3.2.1. Örneklerinin toplanması

Mis zamabağı çiçekleri (*Lilium candidum*) mayıs-haziran aylarında Muğla kırsalından toplanmış ve çalışmalarımızda kullanılincaya kadar -80°C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.3.2.2. Homojenatin hazırlanması

-80°C’de muhafaza edilen mis zambağı çiçeklerinden 25 g tartıldı. Sıvı azot ile muamele edildikten sonra mekanik olarak parçalandı ve hacminin yaklaşık olarak 3 katı kadar (60 mL) saf su içerisine alındı. Proteinlerin çözeltiye geçmesi için manyetik karıştırıcıda 20 dakika boyunca karıştırıldı ve süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. Katı kısım atıldıktan sonra 6000 rpm’de 20 dakika boyunca santrifüjlendi, çökelek atıldı, süpernatant çalışmalarımızın ilerleyen aşamalarında kullanıldı.

3.3.2.3. Amonyum sülfat çöktürmesi

Zambaktan elde edilen homojenatta %0 ile %100 arasındaki doygunluk oranlarında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Bu çöktürme işlemi 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 ve 80-100 şeklinde gerçekleştirildi.

Çöktürme işleminde kullanılan amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Amonyum Sülfat (gr)} = \frac{1.77 \times V \times (S - S_0)}{3.54 - S}$$

V: Çözeltinin Hacmi

S₀: 1’in kesri olarak amonyum sülfat doygunluğu

S: 1’in kesri olarak istenen amonyum sülfat doygunluğu

Yapılan amonyum sülfat çöktürmelerinde 0-20 aralığında aktivite görülmezken 20-40, 40-60, 60-80 ve 80-100 doygunluklarında proteolitik aktivite gözlemlendi. 60-80

doygunluk oranındaki çökelekteki proteolitik aktivitenin diğer doygunluk oranlarından daha fazla olduğu gözlemlendi. İlk olarak homojenata doygunluk %60 oluncaya kadar katı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ azar azar eklendi, ekleme sırasında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve ortam sıcaklığı düşürüldü. 18000 rpm'de 15 dakika santrifüjlemeden sonra çökelek atıldı ve süpernatant %80 doygunluğa ulaşuncaya kadar aynı işlem tekrarlandı. Her çöktürme işleminin sonunda çökelekte ve süpernatantta proteolitik aktivite tayini yapıldı %80 doygunluktan elde edilen çökelek uygun tamponda çözülerek saflaştırmanın diğer basamaklarında kullanıldı.

3.3.2.4. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen çökelek 0,05 M CH_3COONa tamponunda çözüldükten sonra ilk olarak 1 saat boyunca 0,05 M asetat tamponuna (pH:5.7) karşı diyalizlendi. Diyaliz süresi boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra 3 saat boyunca ikinci kez aynı tampona karşı diyaliz işlemine tekrarlandı. Diyaliz işlemleri $+4^\circ\text{C}$ 'de yapıldı ve diyaliz süresince manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Bu işlem sonunda enzim çözeltisi CM-Sephadex iyon değişim kolonuna yüklemeye hazır hale geldi.

3.3.2.5. CM-Sephadex iyon değişim kolonunun hazırlanması

İyon değişim kromatografisinin temeli katı destek materyali ile proteinlerin yüklü grupları arasında olan elektrostatik etkileşimlerdir. Proteinlerin sahip oldukları değişik yüklerdeki aminoasit dizileri kolon materyaline farklı kuvvetlerde bağlanırlar, pH ve tuz gradientleriyle yapılan elüsyonlarda bağlanma şiddetleri farklı olan proteinler, farklı pH aralıklarında veya farklı tuz konsantrasyonlarında kolon materyalinden ayrılacağından proteinlerin birbirinden ayrımını mümkün kılar.

Anyon değiştiriciler pozitif yüklü işlevsel gruplar ihtiva eder ve (-) yüklü proteinlerin ayrılmasında kullanılır. Aminoetil ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_2$) ve dietilaminoetil ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$) sıklıkla kullanılan anyon değiştiricilerdir. Katyon değiştiriciler ise negatif yüklü işlevsel gruplar ihtiva eder ve (+) yüklü proteinlerin ayrılmasında kullanılır. Karboksimetil (CH_2COO^-) katyon değiştiricilere örnek olarak verilebilir.

Çalışmalarımızda CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi kullanıldı. İlk olarak 5 gram kuru CM-Sephadex tartıldı ve saf su içerisinde bir gece boyunca şişmeye

bırakıldı. CM-Sephadex materyalinin aktif gruplarının (CH_2COO^-) ortaya çıkarılması için 0,5 M NaOH ile yarım saat boyunca muamele edildi. 0,5 M HCl ile nötrleştirildikten sonra kolon materyali kolona (2,5x30) dolduruldu. 4 saat boyunca kolon 0,05M asetat tamponu (pH:5.7) ile dengelendi.

3.3.2.6. *Mis zambağı çiçeklerinden (Lilium candidum) elde edilen homojenatın CM-Sephadex iyon değişim kolonuna tatbiki ve proteaz enziminin elüsyonu*

0,05 M asetat tamponu (pH:5.7) ile dengelenen CM-Sephadex kolonuna enzim çözeltisi yüklendi ve yine aynı tampon çözelti kullanılarak yıkandı. 0,1-0,5 M NaCl ihtiva eden 0,05 M asetat tamponu (pH:5.7) ile gradientli mikser kullanılarak enzim elüe edildi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 40 mL/saat'e ayarlandı. Elüsyon işlemine, toplanan elüatlarda 280 nm'de absorban görülmeyinceye kadar devam edildi. Elüatlar her bir tüpte 5 mL olacak şekilde toplandı ve her bir tüpte proteolitik aktivite ölçümü yapıldı. Aktif olan elüatlar toplandı ve karakterizasyon işlemi için saklandı.

3.3.3. **Proteaz Enzimi İçin Aktivite Tayini**

Beyaz zambaktan saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivitesi %1'lik kazein varlığında kazeinin sindirimi metoduna göre belirlendi. 1 g kazein 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda (pH:7) çözüldü ve hacim yine aynı tamponla 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 15 dakika boyunca 95°C'deki su banyosunda bekletildi ve kullanılmaya hazır hale getirildi. Proteolitik aktivite ölçümünde 1 mL substrat (kazein), 0,5 mL enzim çözeltisi eklendi ve toplam hacim tampon çözeltiyle 2,5 mL'ye tamamlandı. Enzim ilave edilen tüpler 20 dakika boyunca 40°C'deki su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra 3 mL %5'lik TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Çökmenin tamamen gerçekleşmesi için 30 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford metodu ile belirlendi. Proteolitik aktivite enziminin dakikada parçaladığı μg protein/mL olarak hesaplandı (Fadıloğlu 2001).

3.3.4. SDS-PAGE İle Enzim Saflığının Kontrolü ve Alt Birimlerin Belirlenmesi

Laemmli tarafından geliştirilen SDS-PAGE ile saflaştırılan proteaz enziminin saflığı ve alt birimi olup olmadığı kontrol edildi (Laemmli 1970).

Elektroforez plakaları saf su ile iyice yıkandı ve kuruması beklendi. İkinci yıkama işlemi alkol kullanılarak yapıldı ve plakalar jel hazırlama cihazına konuldu. Plakalar sıkıştırıldıktan sonra yaklaşık 2 cm yüksekliğe kadar ısıtılmış agaroz plakaların arasına döküldü. Agaroz tamamen donduktan sonra hazırlanan ayırma jeli enjektör yardımıyla plakalara döküldü. Jel yüzeyinin düzgün olması için 1 mL n-bütanol hazırlanan ayırma jelinin üzerine döküldü ve 30 dakika boyunca jelin katılaşması beklendi. Jel katılaşınca üzerindeki n-bütanol döküldü ve saf su ile yıkandı. Daha sonra plakaların üst kısımlarına kadar yığılma jeli döküldü. Tarak dikkatlice yığılma jeline yerleştirildi. Jel tamamen katılaştıktan sonra tarak çıkarıldı ve tarak yuvaları saf su kullanılarak iyice yıkandı.

Numuneler 20 µg/mL olacak şekilde hazırlandı ve 1/1 oranında numune tamponu ilave edildi. 3 dakika boyunca hazırlanan numuneler kaynayan suda bekletildi. 3 dakika sonunda numunelerin soğuması beklendi ve otomatik pipet yardımıyla numuneler tarak yuvalarına yüklendi. Elektroforez tankının alt ve üst kısımlarına akım geçecek yüksekliklere kadar yürütme tamponu eklendi, elektroforez cihazının soğutma hortumları musluğa bağlandı ve su akışı başlatıldı. Tank kapağı kapatılarak anot, katot bağlantıları yapıldı ve voltaj 80 V'a ayarlandı. Proteinlerin tamamı ayırma jeline geçtiğinde voltaj 100 V'a yükseltildi ve elektroforez işlemi sonlanana kadar bu şekilde sabit tutuldu.

Elektroforez sonlandırıldıktan sonra plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve 2 saat boyunca çalkalayıcıda fiksatif çözelti içinde bekletildi. Fiksatif çözülden alınan jel boyama çözeltisi içerisinde çalkalayıcıda 30 dakika süresince boyandı ve boyama işlemi bittikten sonra jel tekrar 2 dakika fiksatif çözelti ile yıkandı. Daha sonra fiksatif çözülden alınan jel renksizleştirme çözeltisine alındı ve çalkalayıcıda, protein bantları görünür hale gelinceye kadar yıkama işlemine devam edildi. Protein bantları görünür hale geldiğinde jelin fotoğrafı çekildi (Laemmli 1970).

3.4. Mis Zambağı Çiçeklerinden (*Lilium candidum*) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmalar

Mis zambağı çiçeklerinden (*Lilium candidum*) saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratına karşı K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Kinetik özelliklerini araştırmak üzere saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri bulundu. Enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve kimyasalların etkisi araştırıldı. Azokazein, azoalbümin, jelatin, hemoglobün, kazein substratları için V_{max} ve K_M değerleri belirlendi.

3.4.1. Optimum pH'nın Belirlenmesi

Mis zambağı çiçeklerinden (*Lilium candidum*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için kazein substratına karşı proteolitik aktivitesinden yararlanıldı. Optimum pH'nın belirlenmesinde pH:4-5 için asetat tamponu, pH:6-7 için fosfat tamponu, pH:8-9 için Tris-HCl tamponu, pH:10 için ise borat tamponu kullanıldı. Tampon çözeltilerin pH'sı 1 M HCl ve 1 M NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlandı. Her bir numune tüpüne 1 mL kazein çözeltisi, 500 µL enzim çözeltisi ve 1 mL uygun pH'daki tampon çözelti eklendi. Kör olarak her bir numuneye karşılık 1 kör çözelti hazırlandı, kör çözeltilerde enzim yerine tampon kullanıldı.

3.4.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Mis zambağı çiçeklerinden (*Lilium candidum*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirleyebilmek için 0-90°C aralığında 10°C artırırlarak aktivite tayini yapıldı. Her sıcaklık denemesi için 1 kör ve 1 numune olmak üzere 2 tüp hazırlandı. Numune tüplerine 1 mL kazein çözeltisi, 500 µL enzim çözeltisi eklendi ve son hacim tampon çözelti ile 2,5 mL'ye tamamlandı. Kör, tüp ve numune; 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra 3 mL %5'lik TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Çökmenin tamamen gerçekleşmesi için 30 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra,

süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford Metodu ile belirlendi (Bradford 1976).

3.4.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Molekül Ağırlığı Tayini

Mis zambağından proteaz enzimi saflaştırdıktan sonra jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak molekül ağırlığı tayin edildi. 4 gram kuru Sephadex G-100 saf suda çözüldü ve 1 gece boyunca oda sıcaklığında şişmeye bırakıldı. Daha sonra jel (1x30) kolona yüklendi.

0,05 M Na_3PO_4 /1mM DTT tamponu ile kolonda 280 nm'de absorbans gözlenmeyinceye kadar dengeleme işlemi yapıldı. Kolon dengelendikten sonra 0,2 mg/mL olacak şekilde BSA (66 kDa), CA (sığır) (29 kDa), α -laktalbumin (14 kDa) çözeltileri yüklenerek 0,05 M Na_3PO_4 /1mM DTT tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu. Kolon tekrar dengelendikten sonra saflaştırılan proteaz enzimi kolona yüklendi ve yine aynı tampon kullanılarak kolondan elüe edildi. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 20 mL/saat'e ayarlandı. Eluatlar her tüpte 4 mL olacak şekilde toplandı. Oluşturulan standart grafik yardımıyla enzimin moleküler ağırlığı belirlendi.

3.4.4. Enzimin V_{\max} ve K_M Değerlerinin Belirlenmesi

Mis zambağından saflaştırılan proteaz enziminin V_{\max} ve K_M değerlerini belirlemek için enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanıldı. 100 mL'sinde 1 g kazein bulunan çözeltiden her bir tüpe 100 μL , 200 μL , 400 μL , 600 μL , 800 μL ilave edildi. Tüplere 500 μL enzim çözeltisi ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Tüpler 40°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi ve bu süre sonunda tüplere 3 mL %5'lik TCA çözeltisi eklendi. 30 dakika sonunda çöken proteinler 6.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi ve daha sonra filtre edilerek, süpernatant içerisinde bulunan protein miktarı Bradford metodu ile belirlendi. Kör aynı substrat konsantrasyonlarında enzimsiz olarak hazırlandı, enzim yerine tampon çözelti kullanıldı.

1/V'ye karşılık 1/[S] Lineweaver Burk grafiği çizildi. Elde ettiğimiz sonuçlardan V_{\max} ve K_M değerleri hesaplandı.

3.4.5. Mis Zambağı Çiçeklerinden (*Lilium candidum*) Saflaştırılan Proteaz Enziminin Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi

Hemoglobin, jelatin, azoalbümin, azokazein substratlarına karşı, mis zambağı çiçeklerinden (*Lilium candidum*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliği, enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanılarak belirlendi.

Enzimin aktivitesini belirleyebilmek için %1'lik hemoglobin, jelatin, azoalbümin ve azokazein çözeltilerinden 100 µL, 200 µL, 400 µL, 600 µL, 800 µL alındı ve hacim saf su kullanılarak 1 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan her bir tüpe 0,5 mL enzim çözeltisi ilave edildi ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde tampon çözelti eklendi. 20 dakika boyunca 40°C'de inkübe edildi. Daha sonra 3 mL %5' lik TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Çökmenin tamamen gerçekleşmesi için 30 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm' de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra, süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford Metodu ile belirlendi (Bradford 1976). Enzim için proteolitik aktivite parçaladığı µg protein/mL. dakika olarak hesaplandı (Pauling et al. 1973).

3.4.6. Mis Zambağı Çiçeklerinden (*Lilium candidum*) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Katyonların Etkisinin İncelenmesi

Zambaktan saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisini belirlemek için konsantrasyonu 10 mM olan; HgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, FeCl₂, FeCl₃, NiCl₂, MgCl₂ çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,4 mM, 0,8 mM, 1,2 mM, 1,6 mM ve 2 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL alındı.

Konsantrasyonu 1 mM olan; HgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, FeCl₂, FeCl₃, NiCl₂, MgCl₂ çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,04 mM, 0,08 mM, 0,12 mM, 0,16 mM ve 0,20 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL alındı ve saflaştırılan proteaz enzimi üzerine etkisi belirlendi.

Konsantrasyonu 0,1 mM olan; HgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, FeCl₂, FeCl₃, NiCl₂, MgCl₂ çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,004 mM, 0,008 mM, 0,012 mM, 0,016 mM ve 0,02 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL alındı ve saflaştırılan proteaz enzimi üzerine etkisi belirlendi.

Proteolitik aktivite %1'lik kazein varlığında kazeinin sindirimi metoduna göre belirlendi. Her bir tüpe 1000 µL substrat (%1 lik kazein), 500 µL enzim çözeltisi, 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM katyon çözeltilerinden 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL eklendi ve son hacim 2,5 mL'ye tamamlandı. Tüpler karıştırıldıktan sonra su banyosunda 40°C'de 20 dakika inkübe edildi. 20 dakika sonunda her bir tüpe 3 mL %5'lik TCA çözeltisinden eklenerek 30 dakika süreyle beklemeye bırakıldı. 15 dakika boyunca 6.000 rpm de santrifüjlendi ve süpernatant filtre edildi. Süpernatant içerisindeki parçalanmış ürün miktarı Bradford metodu ile belirlendi.

3.4.7. Mis Zambağı Çiçeklerinden (*Lilium candidum*) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin Araştırılması

Mis zambağı çiçeklerinden (*Lilium candidum*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine SDS (Sodyum dodesil sülfat), iyodasetamid, EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) ve β-merkapt etanolün etkileri incelendi. Bunun için saflaştırılan enzimin kazein substratına karşı proteolitik aktivitesinden yararlanıldı.

0,1 mM, 1 mM ve 10 mM'lık hazırlanan SDS, EDTA, iyodasetamid ve β-merkapt etanol çözeltilerinden 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL alındı, 1 mL %1'lik kazein çözeltisi ve 0,5 mL enzim çözeltisi eklendi. Hacim tampon çözelti kullanılarak 2,5 mL'ye tamamlandı. Enzimin dakikada parçaladığı protein miktarı Bradford Metodu ile hesaplandı (Bradford 1976).

3.5. Bitki Ekstraksiyonu

Küçük parçalara ayrıldıktan sonra sıvı azot ve liyofilizatör yardımı ile 24 saatte kurutulan mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçekleri, metanol kullanılarak ekstrakte edildi. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçekleri metanol içinde her seferinde 24 saat bekletilerek, toplam 5 defa ekstraksiyona tabi tutuldu. Metanol rotary evapotatörde buharlaştırıldıktan sonra, ham ekstraktlar elde edildi.

Elde edilen metanol ekstraktları suda çözülerek, artan polaritelerine göre, önce hekzan sonra etil asetat ile geri ekstraksiyon yapıldı. Daha sonra çözücüler uçurularak, her bir çözücüye ait ham ekstraktlar elde edildi. Bu ayırma işlemlerinden geriye kalan

kısmı su fraksiyonu denildi ve çözücüsü liyofilizatör kullanılarak uzaklaştırıldı. Bu ekstre ve fraksiyonların miktarları tartılarak belirlendi.

3.6. Fenolik Bileşiklerin UPLC-MS/MS İle Belirlenmesi

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden yaklaşık 3g alınarak, 200mL sıvı azot ile parçalanmaları sağlandı. Üzerine 30mL aseton:su (80:20) karışımı ilave edildi ve -86 °C' de 6 saat ekstraksiyona bırakıldı. Soğutucudan çıkartılan karışım ultrasonik banyoda 15 dakika tutulduktan sonra, ekstrakt 4000rpm'de 20°C'de 10 dakika santrifüjlendi. Whatman No 4 filtre kağıdından süzüldü ve daha sonra kalıntı 2 kez daha 30 mL' lik aseton:su karışımları ile ekstraksiyona tabi tutuldu. Birleştirilen ekstraktlardaki aseton düşük vakum altında, 40°C'de buharlaştırıldı (Rotary Evaporator Heidolph Basis Hei-VAP ML). Sulu faz, 3 kez 30mL n-hekzan ve ardından dietileter ile yıkandıktan sonra 3 kez 30mL etilasetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Organik fazlar birleştirildi. 40°C'de buharlaştırılarak kurutuldu ve su: metanol (80:20) karışımında tekrar çözüldü. Çözelti Macherey-Nagel Chromafil Xtra PTFE-20/25 0.20µm filtrelerden geçirilerek UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı ile analiz edildi.

3.7. Serbest Amino Asit İçeriğinin UPLC-MS/MS İle Belirlenmesi

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçekleri küçük parçalara ayrıldıktan sonra sıvı azot ve liyofilizatör yardımı ile 12 saat kurutuldu. 1g homojen örnek üzerine 5ml % 20'lik (v/v) metanol çözeltisi içinde % 0.1'lik (v/v) formik asit içeren çözelti ilave edildi. Karışım 10 dakika vortekslendi ve ardından 10 dakika boyunca 4°C de 14.000rpm de santrifüjlendi. Üst kısım Macherey-Nagel Chromafil Xtra PTFE-20/25 0.20µm filtreden süzüldü ve UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı ile analiz edildi. Xevo TQ-S MS/MS Cihaz Parametreleri Fenolik Bileşiklerde kullanılan değerler ile aynıdır.

Çizelge 3.1. Xevo TQ-S MS/MS Cihaz Analiz Şartları

Xevo TQ-S MS/MS Cihaz Parametreleri	
Ion Mode	ESI (+) yada ESI(-)
Capillary Voltages	3000 V
Cone Voltages	10-50 V
Source Offset	60 V
Desolvation Temperature	500°C
Desolvation Gas Flow	1000 (L/hr)
Cone Gas Flow	150 (L/hr)
Nebuliser	7.0 bar
Source Temperature	150°C
LM Resolution 1	3
HM Resolution 1	15
Ion Energy 1	1
LM Resolution 2	3
HM Resolution 2	15
Ion Energy 2	1
Collision Gas Flow	0.17
Collision Energy	0-40

3.8. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinin Aroma Verici Uçucu Organik Bileşenlerin Headspace GC/MSD İle Belirlenmesi

Parçalara ayrılan taze mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçekleri 20mL'lik headspace vialine 5.00g olacak şekilde tartıldı. Daha sonra üzerine susuz magnezyum sülfat (MgSO₄) ilave edildi ve mantar ile tamamen karışması sağlandı. Vial headspace örnekleycisine yerleştirildi ve 90°C'de 30 dakika sürecek olan ekstraksiyon işlemine başlandı. 30 dakika sonunda headspace sampler tarafından GC Split/Splitless inlete bir transferline ile 1 dakika boyunca vial üst kısmındaki uçucu bileşenler helyum gazı ile transfer edildi.

Çizelge 3.2. Headspace GC/MSD Cihaz Analiz Parametreleri

Oven Parameters	
Equilibration Time	2 min
Max Temperature	300°C
Oven Program	60°C for 1 min then 10°C/min 100°C for 1min then 10°C/min to 260°C for 8 min
Run Time	30 min
MMI Inlet Parameters	
Mode	Split
Heater	250°C
Thermal Aux (Tranfer Line)	
Heater	On
Temperature	250°C
Column	
Name	Agilent J&W 19091S-431UI HP-5MS UI (15mx250µmx0.25µm)
Pressure	21.801 psi
Flow	1.8 mL/min
MS Acquisition Parameters	
Acquisition Mode	Scan
EM Voltage	1200
Low Mass	35.0
High Mass	400.0
Threshold	150
MS Source	230°C max 250°C
MS Quadrupole	150°C max 200°C
Headspace Parameters	
Oven Temperature	95°C
Loop Temperature	110°C
Tranfer Line Temperature	120°C
Vial Equilibration	30 min
Injection Duration	1 min
GC Cycle Time	40 min
Vial Size	20 mL
Fill Mode and Pressure	Pressure / 14psi
Fill Time	0.5 min
Extraction Mode	Multiple Extraction

3.9. B Grubu Vitamin İçeriğinin UPLC-MS/MS İle Belirlenmesi

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçekleri yaklaşık 3g alınarak üzerine 30mL H₂O:CH₃CN (80:20) karışımı ilave edildi ve +4°C’de 6 saat ekstraksiyona bırakıldı. Soğutucudan çıkartılan karışım ultrasonik banyoda 15 dakika tutulduktan sonra, ekstrakt 4000rpm’de 20°C’de 10 dakika santrifüjlendi. Whatman No 4 filtre kağıdından süzüldü ve daha sonra kalıntı 2 kez daha 30 mL’lik H₂O:CH₃CN karışımları ile ekstraksiyona devam edildi. Birleştirilen ekstraktlardaki asetonitril düşük vakum altında, 40°C’de buharlaştırıldı (Rotary Evaporator Heidolph Basis Hei-VAP ML). Çözelti Macherey-Nagel Chromafil Xtra PTFE-20/25 0.20µm filtrelerden geçirilerek UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı ile analiz edildi.

Çizelge 3.3. Xevo TQ-S MS/MS Cihaz Analiz Şartları

Xevo TQ-S MS/MS Cihaz Parametreleri	
Ion Mode	ESI (+) yada ESI(-)
Capillary Voltages	3000 V
Cone Voltages	10-50 V
Source Offset	60 V
Desolvation Temperature	500°C
Desolvation Gas Flow	1000 (L/hr)
Cone Gas Flow	150 (L/hr)
Nebuliser	7.0 bar
Source Temperature	150°C
LM Resolution 1	3
HM Resolution 1	15
Ion Energy 1	1
LM Resolution 2	3
HM Resolution 2	15
Ion Energy 2	1
Collision Gas Flow	0.17
Collision Energy	0-40

3.10. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri

3.10.1. Toplam Antioksidan Aktivite: β -Karoten Renk Açılım Yöntemi

Toplam antioksidan aktivite, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan β -karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlendi (Miller, 1971). Bu yöntem, β -karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. 250 mL'lik şilifli bir balonda, 0.5 mg β -karoten 1 mL kloroformda çözüldü ve üzerine 200 mg Tween 40 ve 20 μ L linoleik asit ilave edildi. Döner buharlaştırıcı ile kuruluğa kadar çözücüsü uzaklaştırılan karışımın üzerine 100mL oksijen ile doyurulmuş su ilave edilerek balon kuvvetlice çalkalandı. 500 μ g ile 4000 μ g arasında değişen konsantrasyonlardaki 1mL örnek içeren çözeltilerin üzerine 4mL β -karoten karışımı ilave edildi. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbansları 470nm'de ölçüldü. Kontrol olarak 1mL metanol kullanıldı. Tüpler 50°C'de inkübasyona bırakıldı ve kontrol olarak kullanılan tüpteki β -karotenin rengi kayboluncaya kadar yaklaşık 120dk inkübasyona devam edildi. β -karoten renk açılım oranı (R), aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t}$$

ln: doğal logaritma,

a: başlangıç absorbansı,

b: inkübasyondan sonraki absorbans,

t: inkübasyon süresi (dk)

Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$AA (\% \text{ İnhibisyon}) = \frac{R_{Kontrol} - R_{Örnek}}{R_{Kontrol}} \times 100$$

$R_{Kontrol}$ kontrolün renginin açılma hızı ve $R_{Örnek}$ örneğin renginin açılma hızıdır.

3.10.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçekleri ekstrelerinin serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Blois, 1958). 500µg ile 4000µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1mL örnek içeren örneklerin üzerine etanolde çözülmüş %0,004'lük DPPH çözeltisinden 4mL ilave edildi. Kontrol olarak 1mL etanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra 517nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin Absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

A_{Kontrol} kontrolün absorbansı, $A_{\text{Örnek}}$ örneğin absorbansıdır.

3.10.3. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

Ekstrelerinin katyon radikali giderim aktiviteleri ABTS (2,20-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) kullanılarak belirlendi (Re vd., 1999). 7mM ABTS 2.45mM K₂SO₈ ile etkileştirilerek 5mL ABTS radikali oluşturuldu. Katyon radikalının oluşması için karışım 16 saat karanlıkta bekletildi. Bu radikal çözeltisinden 1mL alınarak absorbansı yaklaşık 0,700 olacak şekilde etanol ile seyreltilerek ayarlandı. 500µg ile 4000µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1mL örnek içeren örneklerin üzerine etanolde hazırlanmış ABTS çözeltisinden 4mL ilave edildi. Kontrol olarak 1mL etanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra 734nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin Absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

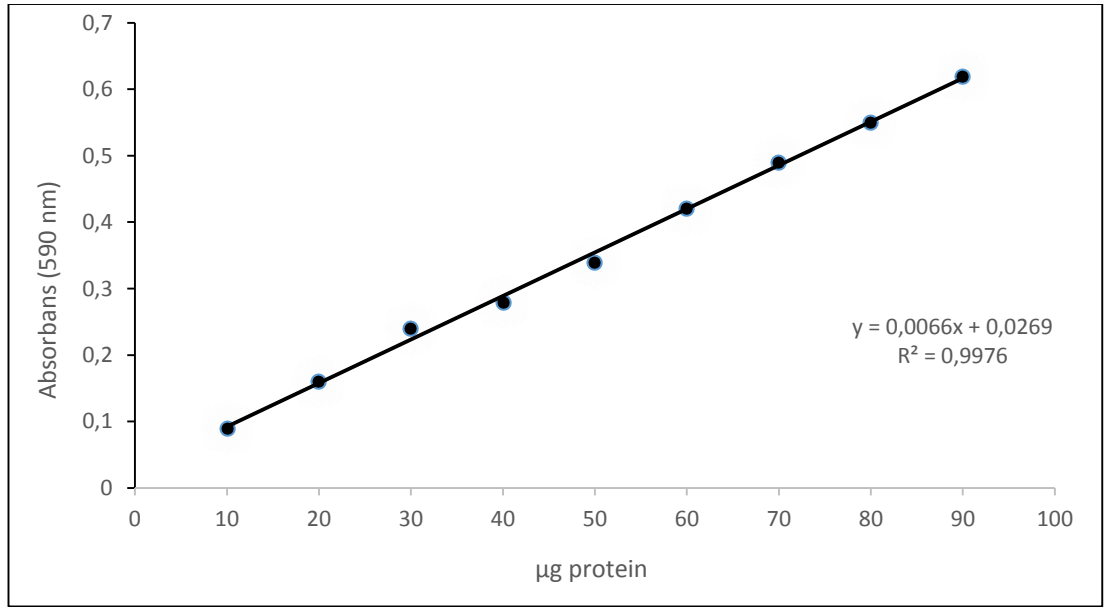
$$\text{ABTS}^+ \text{ Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

A_{Kontrol} kontrolün absorbansı, $A_{\text{Örnek}}$ örneğin absorbansıdır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Coomassie brilliant blue yöntemi kullanıldı. BSA kullanılarak ilk önce standart eğri hazırlandı. Homojenatlarda, saflaştırılan enzim çözeltilerinde, proteolitik aktivitenin belirlenmesinde bu eğri kullanıldı. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

4.2. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması Sonuçları

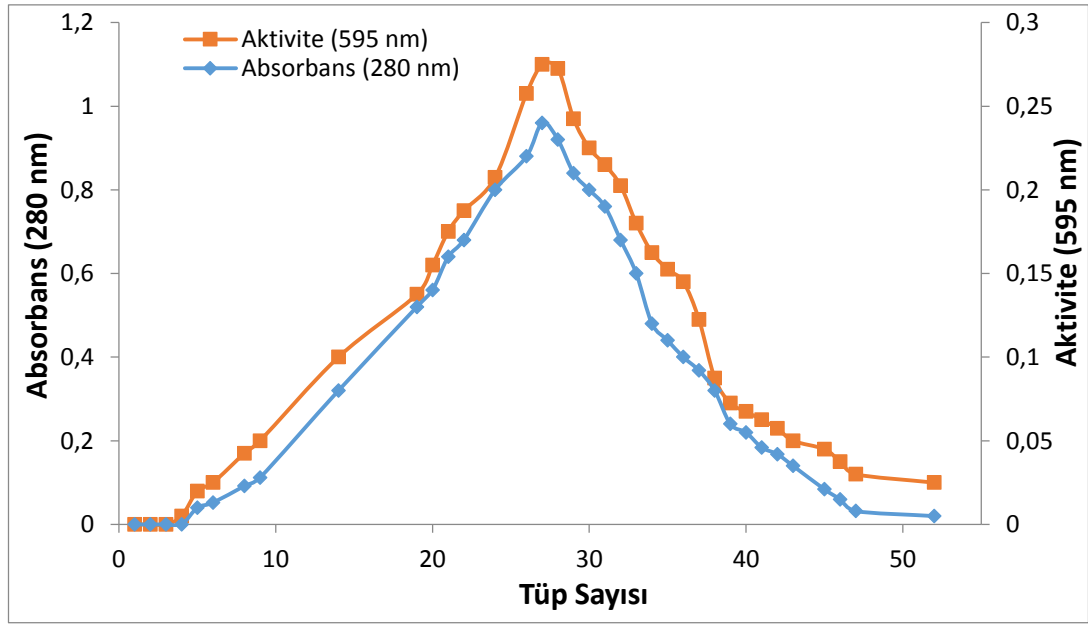
4.2.1. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden Proteaz Enziminin CM-Sephadex İyon Değişim Kromatografisi İle Saflaştırılması Sonuçları

Proteaz enzimi mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden iki basamakta saflaştırıldı.

1. basamakta homojenatta %0-%100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. %60-%80 aralığındaki çökelek 0,05 M asetat tamponunda (pH:5.7) çözüldü, aktivite tayini yapılıncaya yüksek proteolitik aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. Yüksek proteolitik aktivite gösteren enzim çözeltisi 4 saat boyunca, +4°C’de, 2 kez 25 µM asetat tamponuna (pH:5.7) karşı diyalizlendi.

2. basamakta homojenat 0,05 M asetat tamponu (pH:5.7) ile dengelenen CM-Sephadex iyon değişim kolonuna yüklendi. Kolon 150 mL 0,05 M asetat tamponu (pH:5.7) ile yıkandı. Enzimin kolondan elüsyonu 0,1–0,5 M NaCl konsantrasyonu içeren yine aynı tampon kullanılarak yapıldı. Toplanan elüatlarda proteolitik aktivite ölçüldü. Aktif elüatlar birleştirilerek enzim havuzu oluşturuldu.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği Şekil 4.2.’de gösterildi.



Şekil 4.2. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden CM-Sephadex iyon değişim kolonu ile saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği

4.2.2. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden proteaz enziminin saflaştırma basamakları sonuçları

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden elde edilen homojenatta, amonyum sülfat çöktürmesinden sonra, CM-Sephadex iyon değişim kromatografisinden elde edilen aktif eluatlarda Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı ve her basamakta

proteaz enziminin kaç kat saflaştırıldığı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.1.'de gösterildi.

Çizelge 4.1. CM-Sephadex kolonundan Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden elde edilen proteaz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve homojenattan saflaştırılan proteaz enziminde enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.

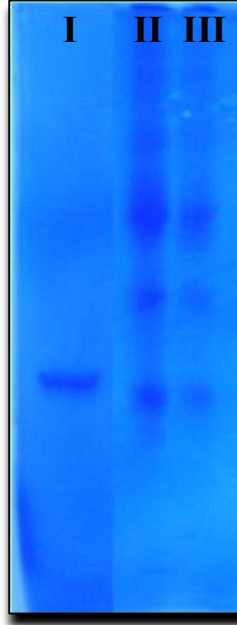
Enzim Fraksiyonu	Hacim mL	Aktivite EU/mL	Total Aktivite		Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite EU/mg	Saflaştırma Oranı
			EU	%			
Ham ekstrakt	100	1.22	122	100	3.29	0.37	-
% 60 (NH ₄) ₂ SO ₄	90	0.86	77.4	63.44	1.09	0.79	2.14
CM-Sephadex	20	2.45	49	40.2	0.11	22.27	60.19

4.2.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları

Saflaştırılan proteaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Kesikli SDS-PAGE'ne saflaştırılan proteaz enzimi yerleştirildi.

Proteaz enziminin yanı sıra elektroforeze molekül ağırlığı bilinen standart proteinler yüklendi. Sonuçlar mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin 29,7 kDa ağırlığında tek birimi olduğunu gösterdi.

Protein bantlarının fotoğrafı Şekil 4.3'te gösterildi.



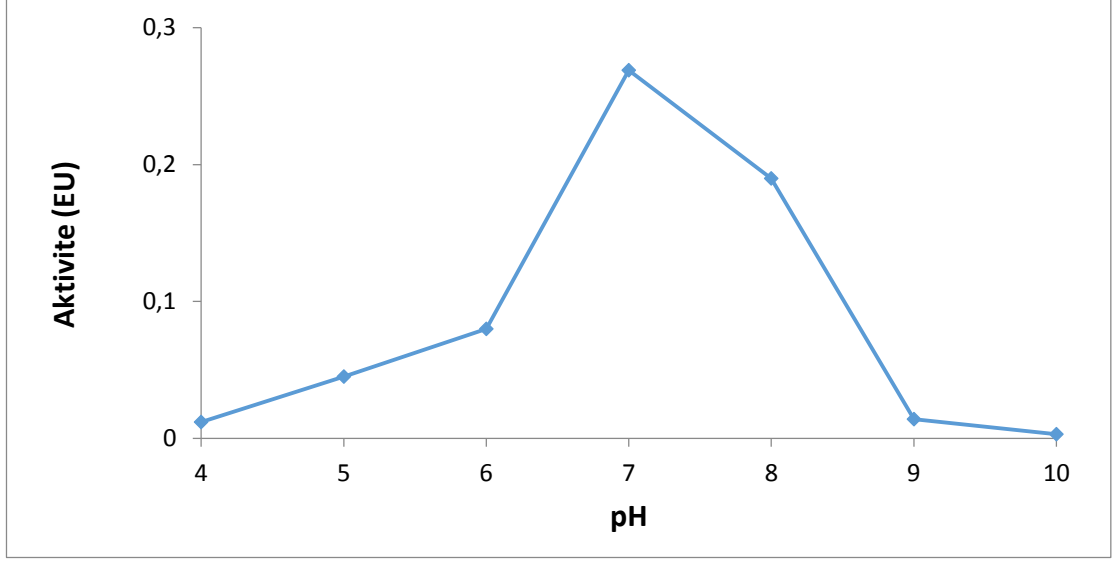
Şekil 4.3. CM-Sephadex iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

(I: Mis zambağı çiçeklerinde saflaştırılan proteaz enzimi; II, III (standart protein karışımı): BSA 66kDa, yumurta albümin 45 kDa, CA 29 kDa)

4.3. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden Saflaştırılan Proteaz Enzimi Üzerine Kinetik Çalışmaların Sonuçları

4.3.1. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden Saflaştırılan Proteaz Enziminin Optimum pH Sonuçları

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sını belirleyebilmek için pH 4-9 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. pH 4-5 aralığında 0,1 M asetat tamponu, pH 6-7 aralığında 0,1 M fosfat tamponu, pH 8-9 aralığında 0,1 M Tris-HCl, pH:10'da ise 0,1 M borat tamponu kullanıldı. Proteaz enzimi için pH değişimine karşı proteolitik aktivite miktarı Şekil 4.4.'te verildi.

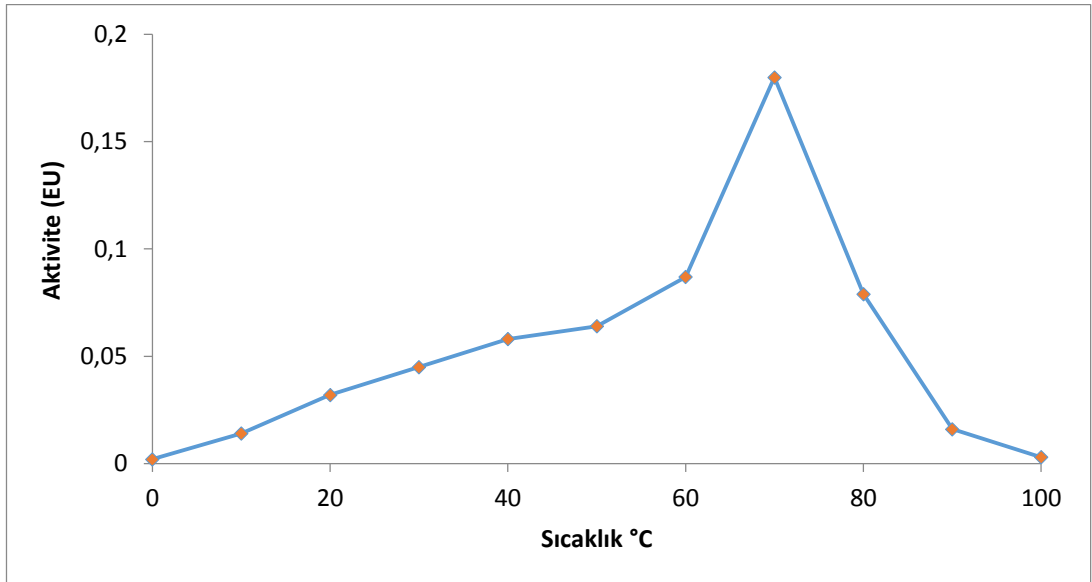


Şekil 4.4. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

4.3.2. Optimum Sıcaklık Sonuçları

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C ve 90°C' de aktivite ölçümleri yapıldı.

Aktivite – Sıcaklık grafiği Şekil 4.5.'te verildi.

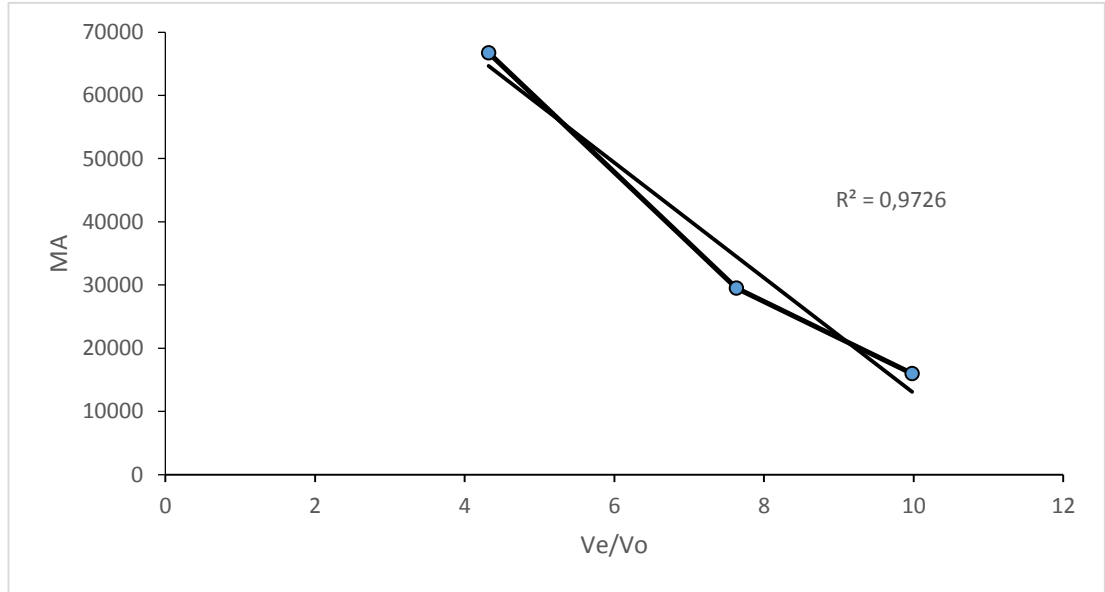


Şekil 4.5. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.3.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi İle Molekül Ağırlığı Tayini Sonuçları

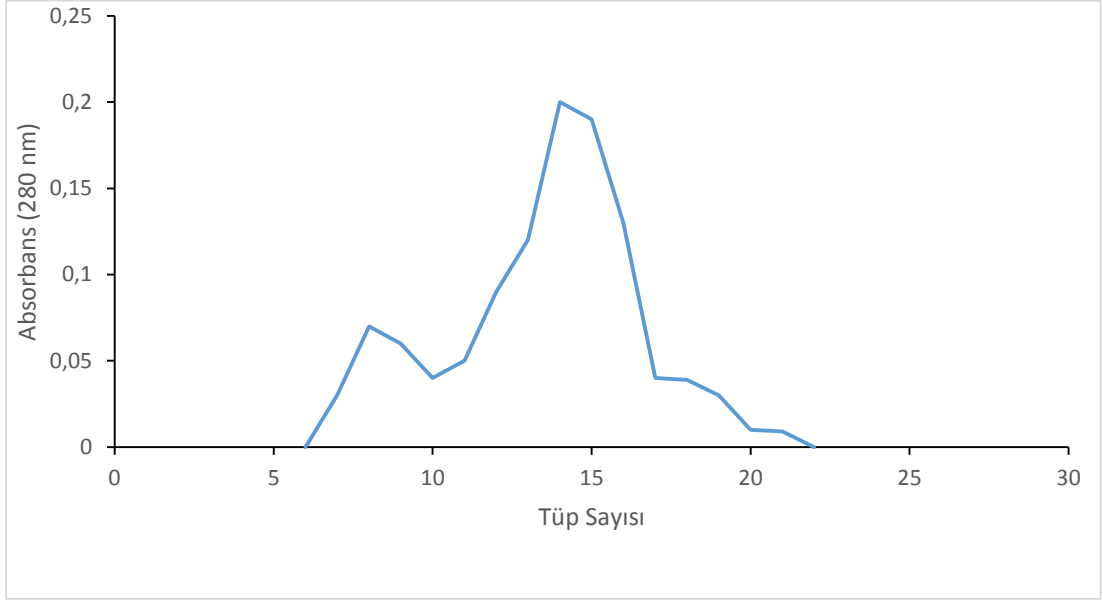
Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi ile belirlendi. 0,05 M Na₃PO₄/1 mM DTT (pH:7) tamponu ile dengelenmiş kolona ilk olarak BSA (66 kDa), CA (29 kDa) ve α-laktalbümin (14 kDa) protein standartları yüklendi ve aynı tamponla elüe edilerek standart grafik oluşturuldu. Daha sonra saflaştırılan proteaz enzimi kolona yüklendi ve 0,05 M Na₃PO₄/1 mM DTT (pH:7) tamponu ile elüe edildi. Sonuçlar standart grafik ile karşılaştırıldı.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı 29.7 kDa olarak belirlendi. Molekül ağırlığı tayini için hazırlanan standart grafik Şekil 4.6.'da, enzimin absorbans grafiği Şekil 4.7'de verildi.



Şekil 4.6. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği

*(Sephadex G-100, BSA (66 kDa), CA bovine (29 kDa), α-laktalbümin (14 kDa))



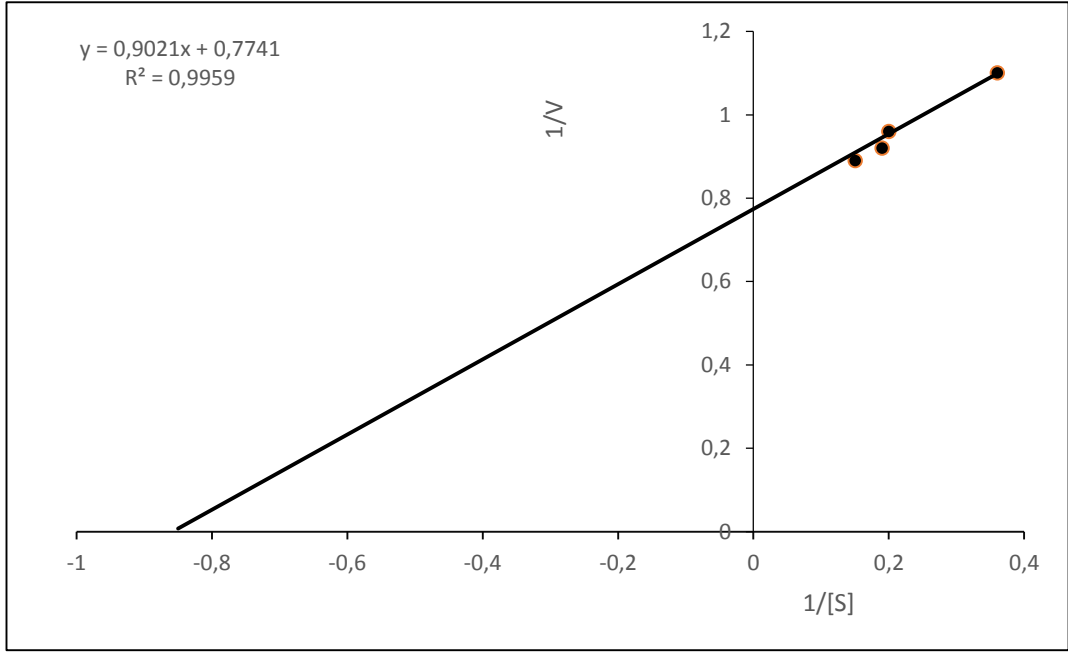
Şekil 4.7. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbans grafiği

4.3.4. Kazein Substratına Karşı K_M ve V_{max} Değerlerinin Hesaplanması

Sonuçları

V_{max} ve K_M değerlerini belirlemek için enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanıldı. 100 mL'inde 1 g kazein bulunan çözeltilerden her bir tüpe 100 μ L, 200 μ L, 400 μ L, 600 μ L, 800 μ L ilave edildi. Tüplere 500 μ L enzim çözeltisi ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde tampon çözelti ilave edildi. Tüpler 40°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi ve bu süre sonunda tüplere 3 mL %5'lik TCA çözeltisi eklendi. 30 dakika sonunda çöken proteinler 6.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi ve daha sonra filtre edilerek, süpernatant içerisinde bulunan protein miktarı Bradford metodu ile belirlendi. Kör aynı substrat konsantrasyonlarında enzimsiz olarak hazırlandı, enzim yerine tampon çözelti kullanıldı.

1/V'ye karşılık 1/[S] Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Elde ettiğimiz sonuçlardan V_{max} ve K_M değerleri hesaplandı. Mis zambağı çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,17 μ M ve 1,11 μ g/mL.dak olarak belirlendi.



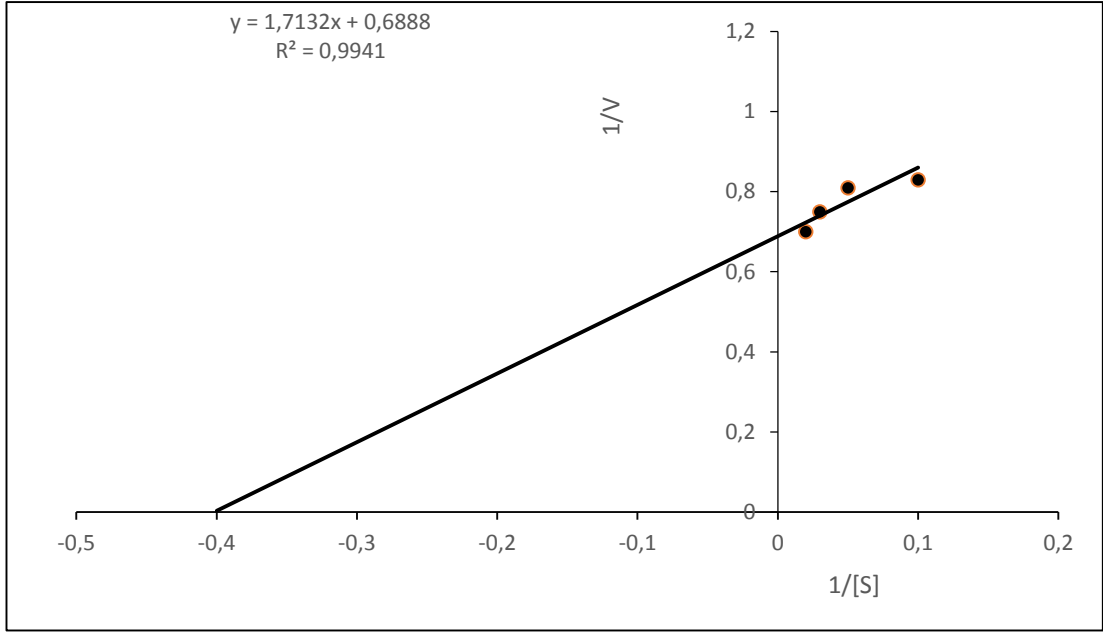
Şekil 4.8. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi için kazein substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

4.3.5. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden Saflaştırılan Proteaz Enziminin Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi Sonuçları

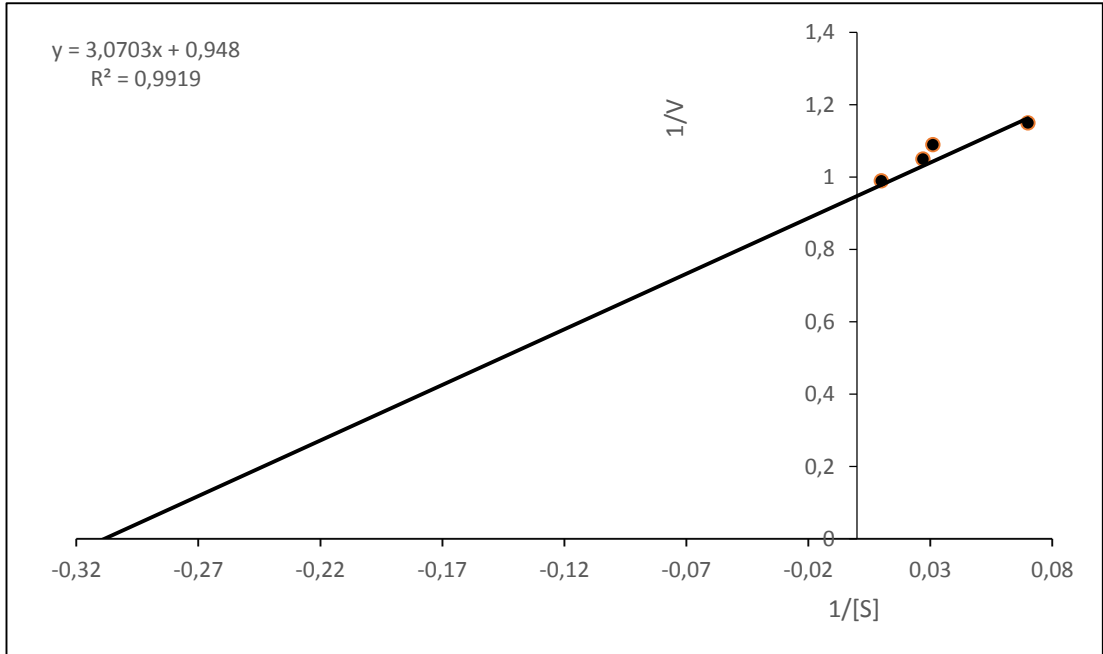
Hemoglobin, jelatin, azoalbümin, azokazein substratlarına karşı, Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliği, enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanılarak belirlendi.

Enzimin aktivitesini belirleyebilmek için %1'lik hemoglobin, jelatin, azoalbümin ve azokazein çözeltilerinden 100 µL, 200 µL, 400 µL, 600 µL, 800 µL alındı ve hacim saf su kullanılarak 1 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan her bir tüpe 0,5 mL enzim çözeltisi ilave edildi ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde tampon çözelti eklendi. 20 dakika boyunca 40°C'de inkübe edildi. Daha sonra 3 mL %5'lik TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Çökmenin tamamen gerçekleşmesi için 30 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra, süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford Metodu ile belirlendi.

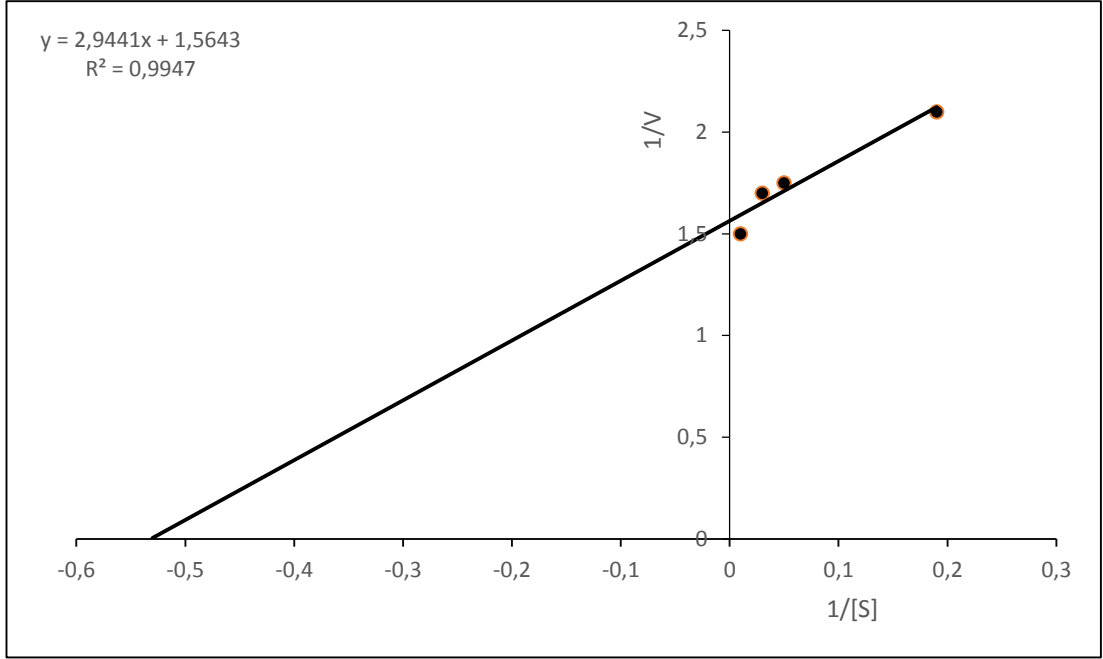
Sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.



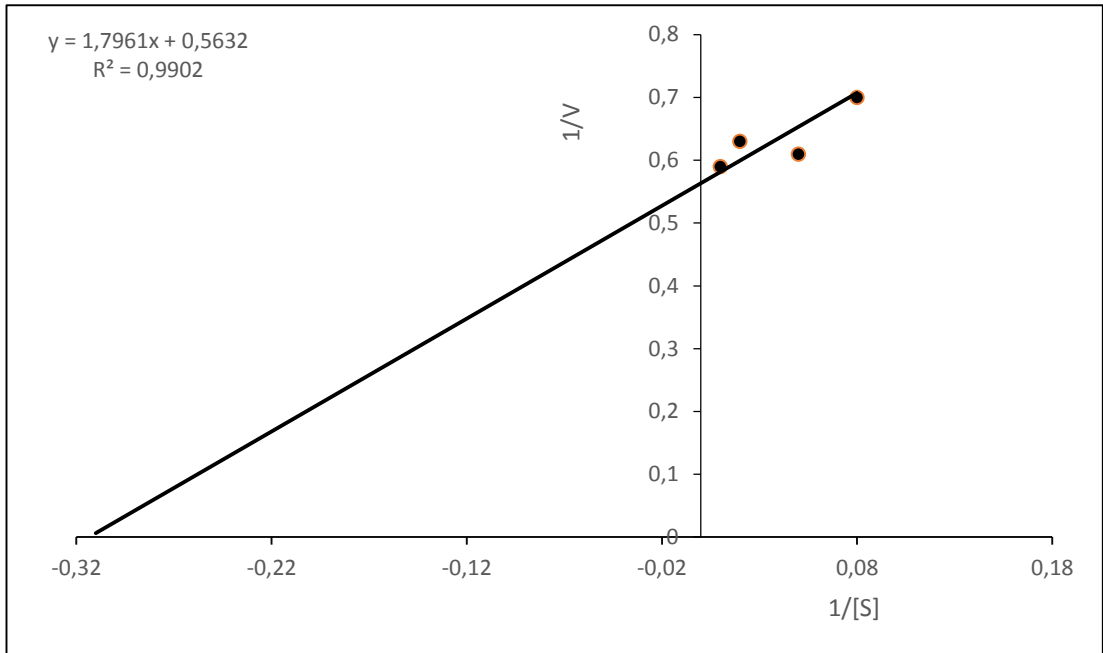
Şekil 4.9. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi için hemoglobin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.10. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi için jelatin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.11. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi için azoalbümin substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.12. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi için azokazein substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.2. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğı sonuçları

Substrat	K _M (µM)	V _{max} (µg/mL.dak)
Kazein	1,18	1,11
Hemoglobin	2,5	1,45
Jelatin	3,23	1,05
Azoalbumin	1,89	0,64
Azokazein	3,23	1,78

4.3.6. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden Saflaştırılan Proteaz Enzimin Aktivitesi Üzerine Bazı Katyonların Etkisinin İncelenmesi Sonuçları

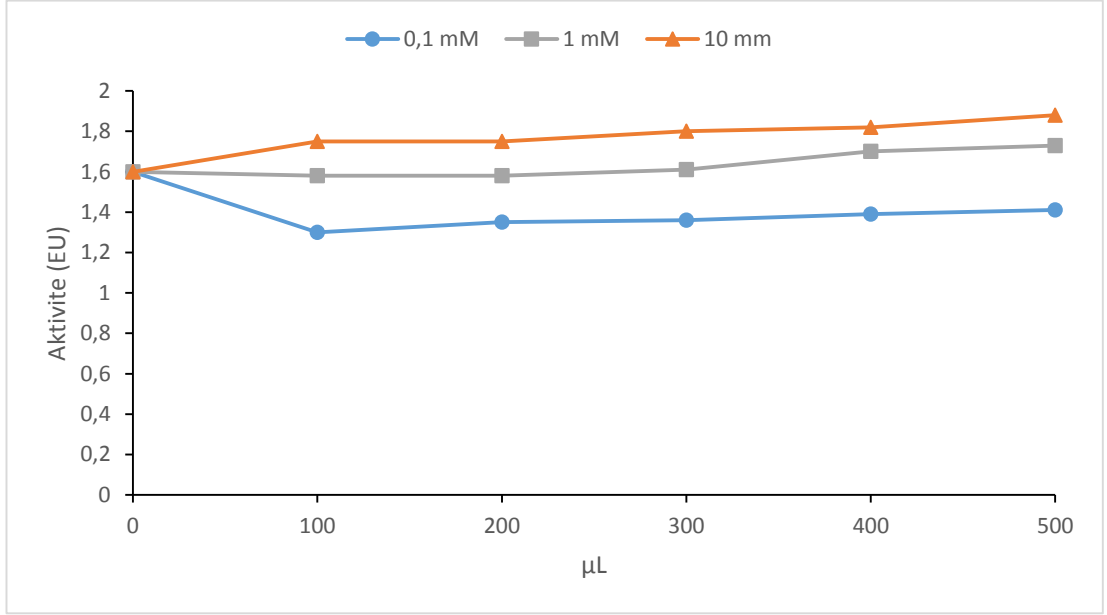
10 mM olan; MnCl₂, CaCl₂, FeCl₂, FeCl₃, NiCl₂, MgCl₂, HgCl₂ çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,4 mM, 0,8 mM, 1,2 mM, 1,6 mM ve 2 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL alındı.

Konsantrasyonu 1 mM olan; MnCl₂, CaCl₂, FeCl₂, FeCl₃, NiCl₂, MgCl₂, HgCl₂ çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,04 mM, 0,08 mM, 0,12 mM, 0,16 mM ve 0,20 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL alındı ve saflaştırılan proteaz enzimi üzerine etkisi belirlendi.

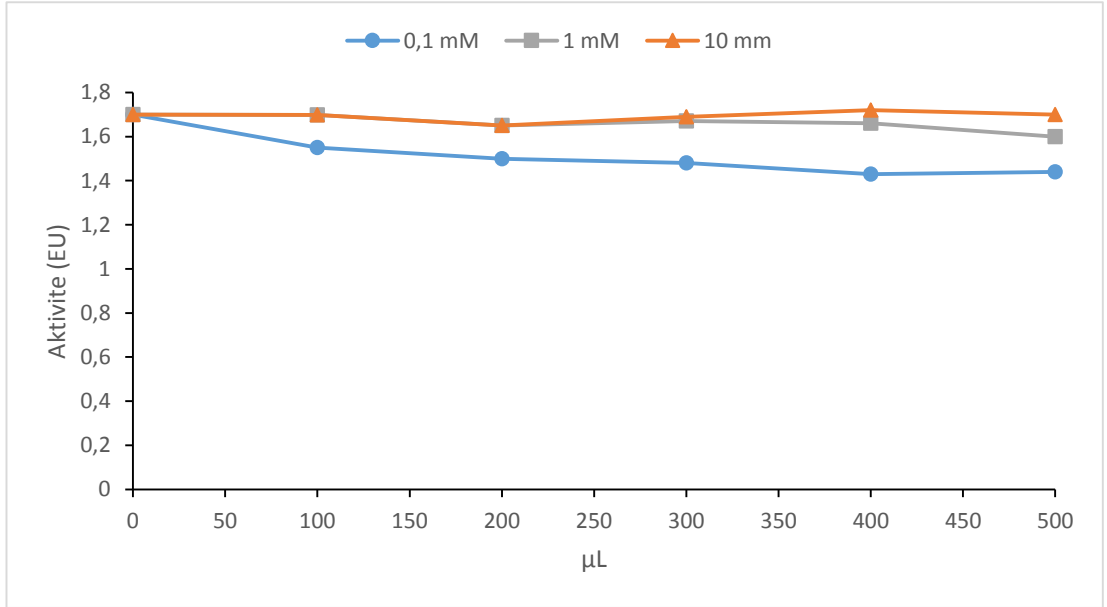
Konsantrasyonu 0,1 mM olan; MnCl₂, CaCl₂, FeCl₂, FeCl₃, NiCl₂, MgCl₂, HgCl₂ çözeltileri hazırlandı. Son konsantrasyonlar 0,004 mM, 0,008 mM, 0,012 mM, 0,016 mM ve 0,02 mM olacak şekilde bu çözeltilerden 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, 500 µL alındı ve saflaştırılan proteaz enzimi üzerine etkisi belirlendi.

Proteolitik aktivite %1'lik kazein varlığında kazeinin sindirimi metoduna göre 3.5.6'da anlatıldığı gibi belirlendi.

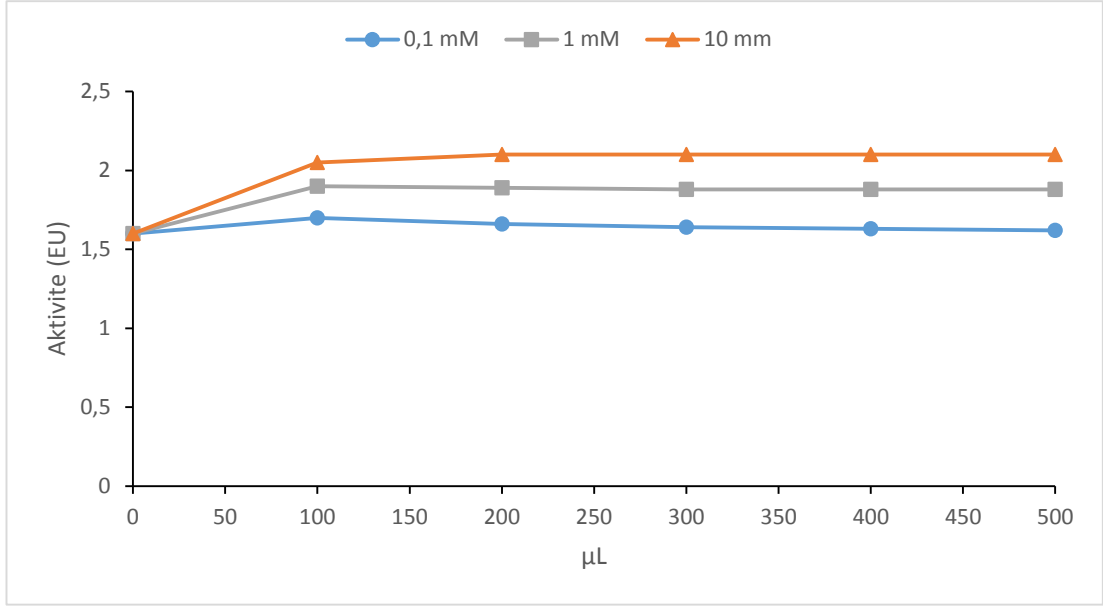
Sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.



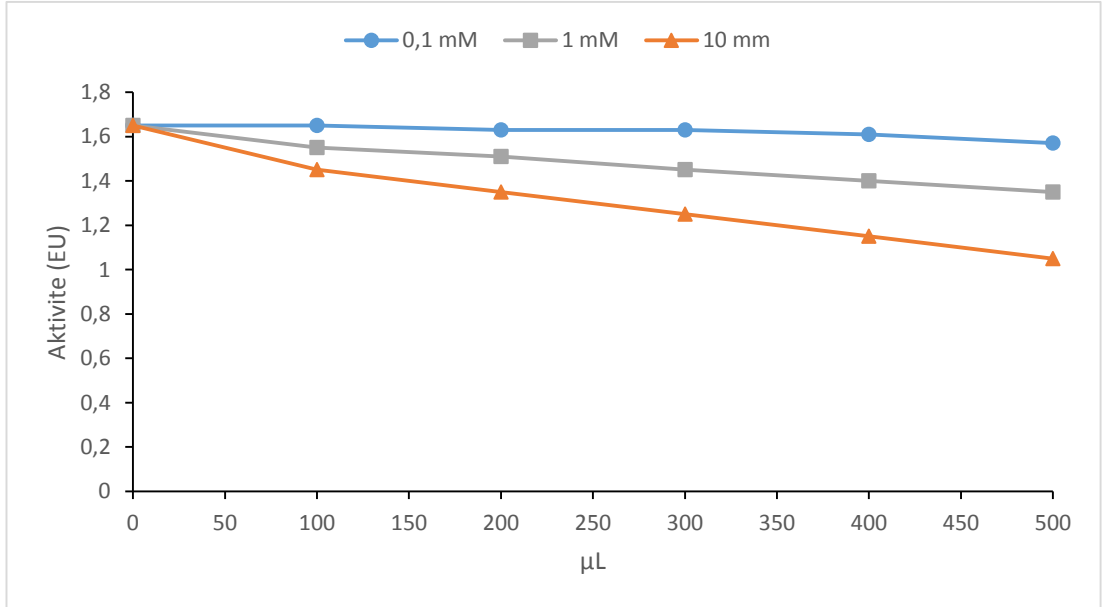
Şekil 4.13. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM FeCl₂'ün etkisinin sonuçları



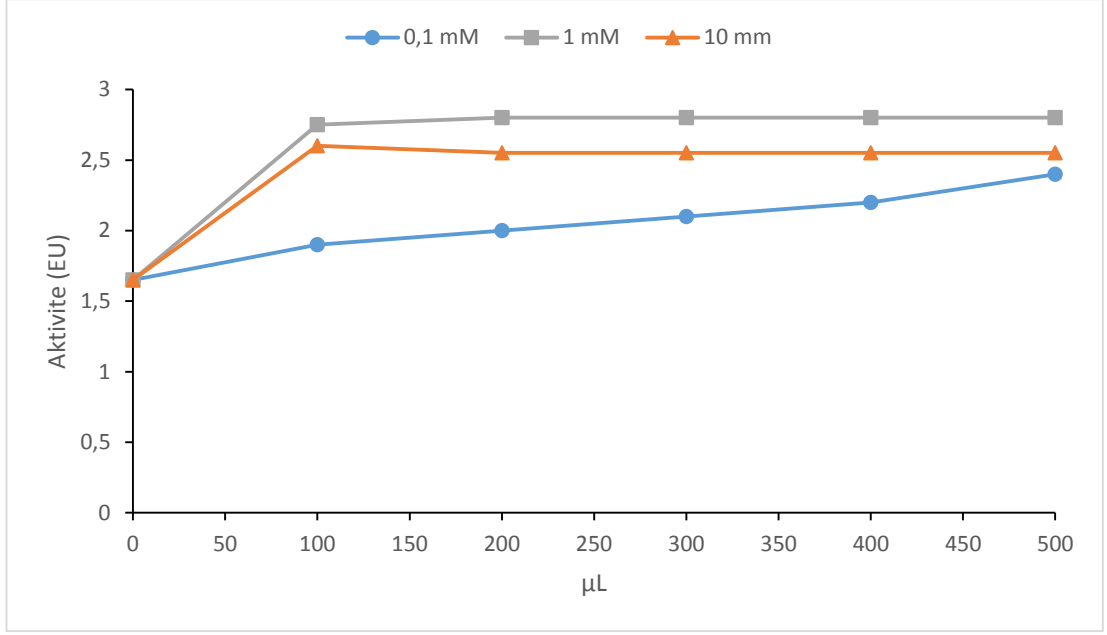
Şekil 4.14. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MnCl₂'ün etkisinin sonuçları



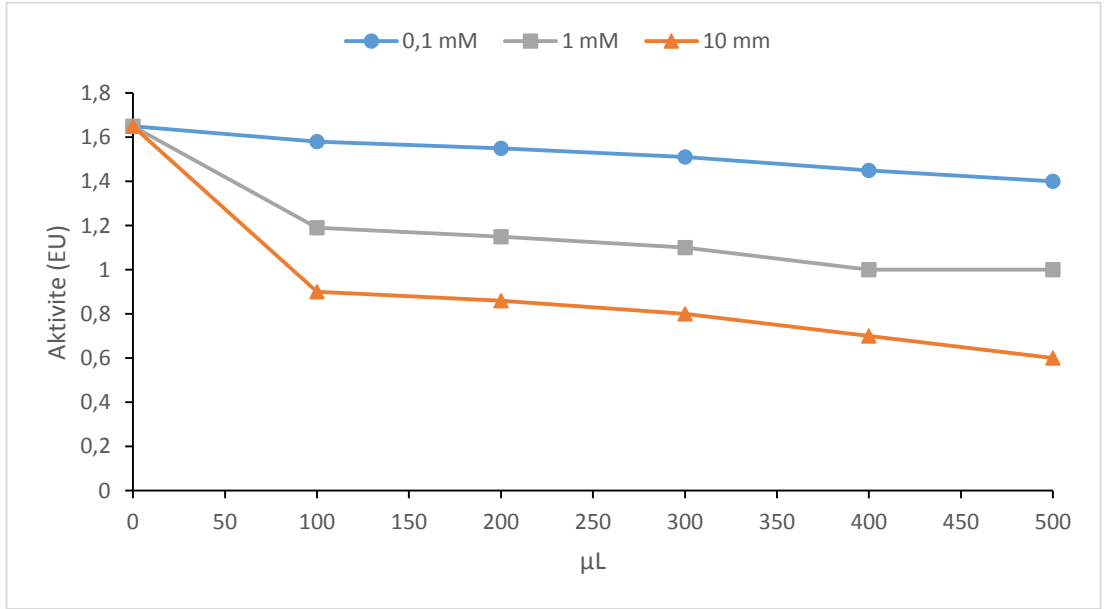
Şekil 4.15. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM CaCl₂'ün etkisinin sonuçları



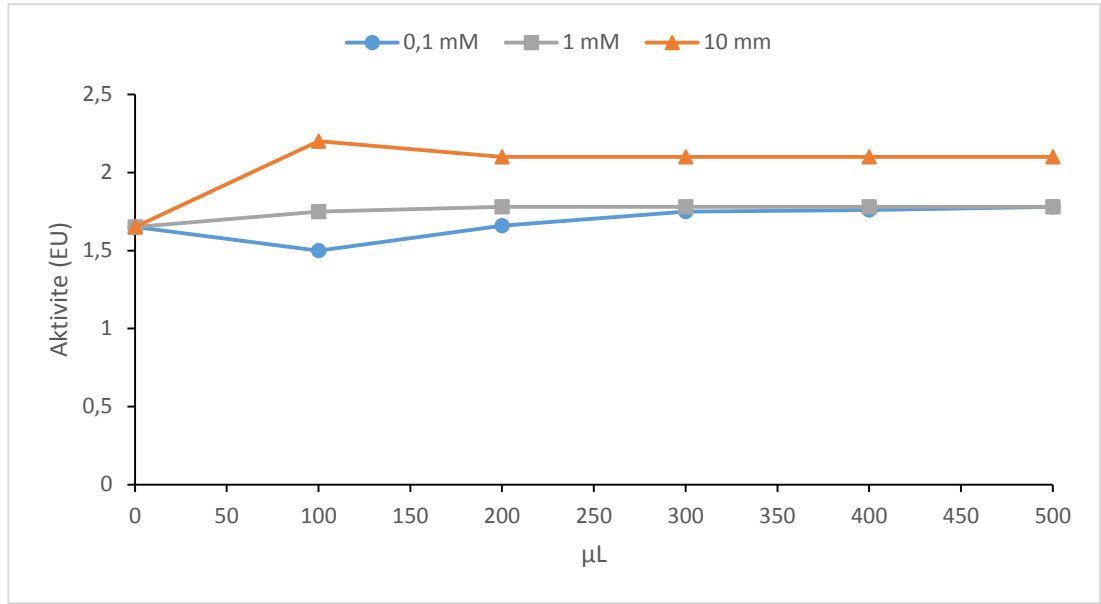
Şekil 4.16. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM NiCl₂'ün etkisinin sonuçları



Şekil 4.17. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM FeCl₃'ün etkisinin sonuçları



Şekil 4.18. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM HgCl₂'ün etkisinin sonuçları



Şekil 4.19. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MgCl₂'ün etkisinin sonuçları

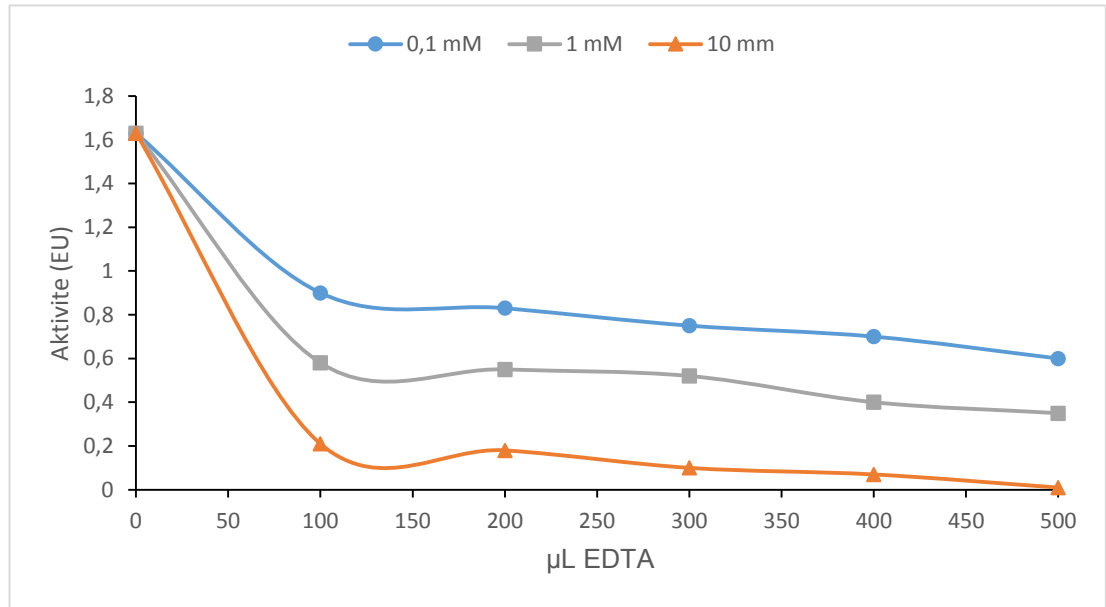
Çizelge 4.3. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin sonuçları

Kimyasallar	Konsantrasyon (mM)	Preteolitik Aktivite (%)
Kontrol	-	100
MgCl ₂	0,1	125,05
	1	95,04
	10	115,26
MnCl ₂	0,1	92,5
	1	72,40
	10	70,67
FeCl ₂	0,1	90,95
	1	86,00
	10	100,05
NiCl ₂	0,1	95,32
	1	63,45
	10	50,34
FeCl ₃	0,1	145,35
	1	140,43
	10	135,51
CaCl ₂	0,1	135,84
	1	96,78
	10	85,31
HgCl ₂	0,1	73,90
	1	26,23
	10	7,76

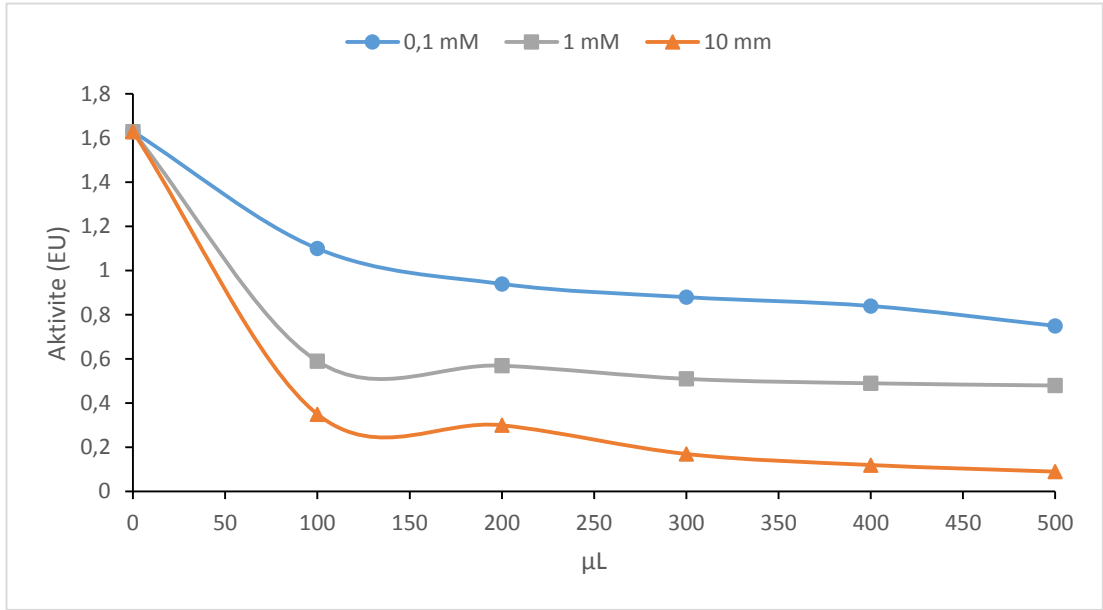
4.3.7. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinden Saflaştırılan Proteaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi Sonuçları

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine SDS (Sodyum dodesil sülfat), iyodasetamid, EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) ve β -merkaptto etanolün etkileri incelendi. Bunun için saflaştırılan enzimin kazein substratına karşı proteolitik aktivitesinden yararlanıldı.

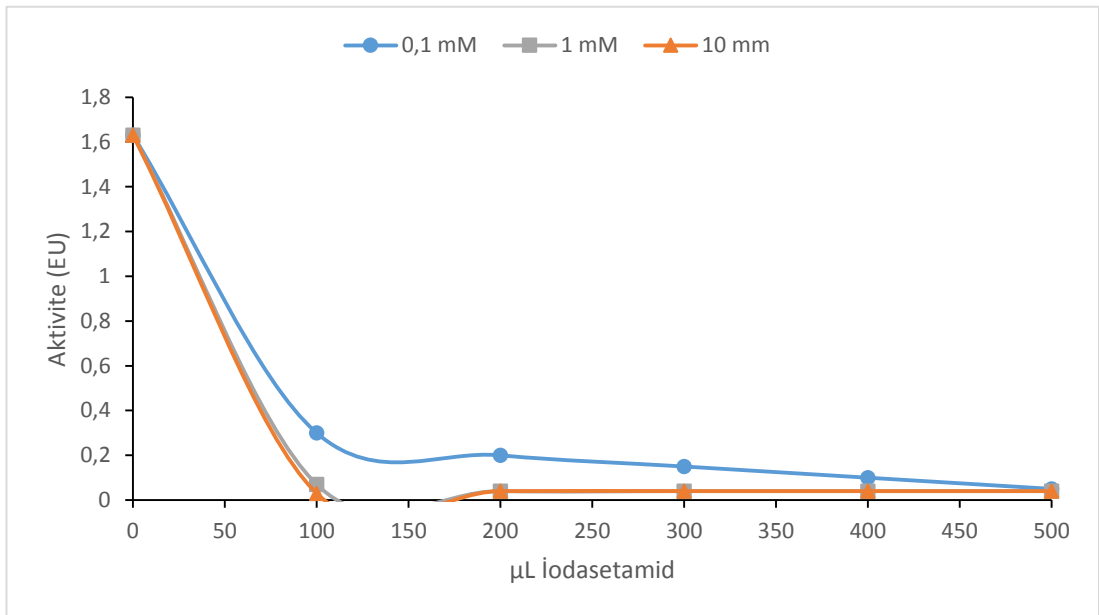
0,1 mM, 1 mM ve 10 mM'lık hazırlanan SDS, EDTA, iyodasetamid ve β -merkaptto etanol çözeltilerinden 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, 500 μ L alındı, 1 mL %1'lik kazein çözeltisi ve 0,5 mL enzim çözeltisi eklendi. Enzim için proteolitik aktivite dakikada parçaladığı μ g protein/mL olarak hesaplandı.



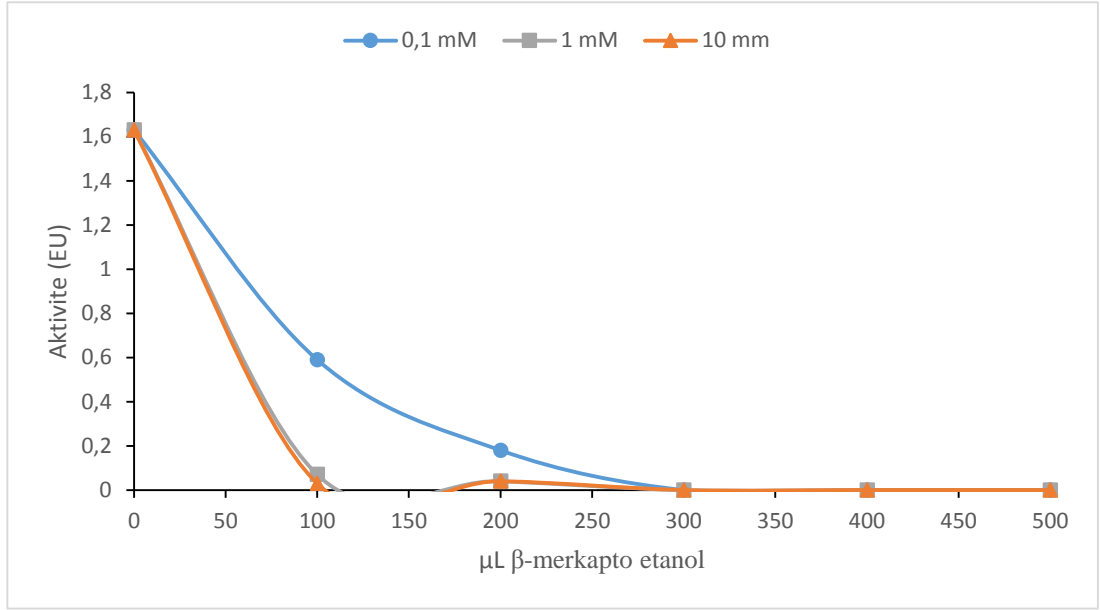
Şekil 4.20. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM EDTA'in etkisinin sonuçları



Şekil 4.21. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM SDS'nin etkisinin sonuçları



Şekil 4.22. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM İodasetamid'in etkisinin sonuçları



Şekil 4.23. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM β-merkaptan etanol'ün etkisinin sonuçları

Çizelge 4.4. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin belirlenmesi sonuçları

Kimyasallar	Konsantrasyon (mM)	Preteolitik Aktivite (%)
Kontrol	-	100
EDTA	0,1	31,45
	1	13,69
	10	0,00
SDS	0,1	36,75
	1	16,88
	10	0,00
İodasetimid	0,1	1,72
	1	0,53
	10	0,00
β-merkaptan etanol	0,1	1,26
	1	0,66
	10	0,00

4.4. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinin C Vitamini Miktarının Belirlenmesi

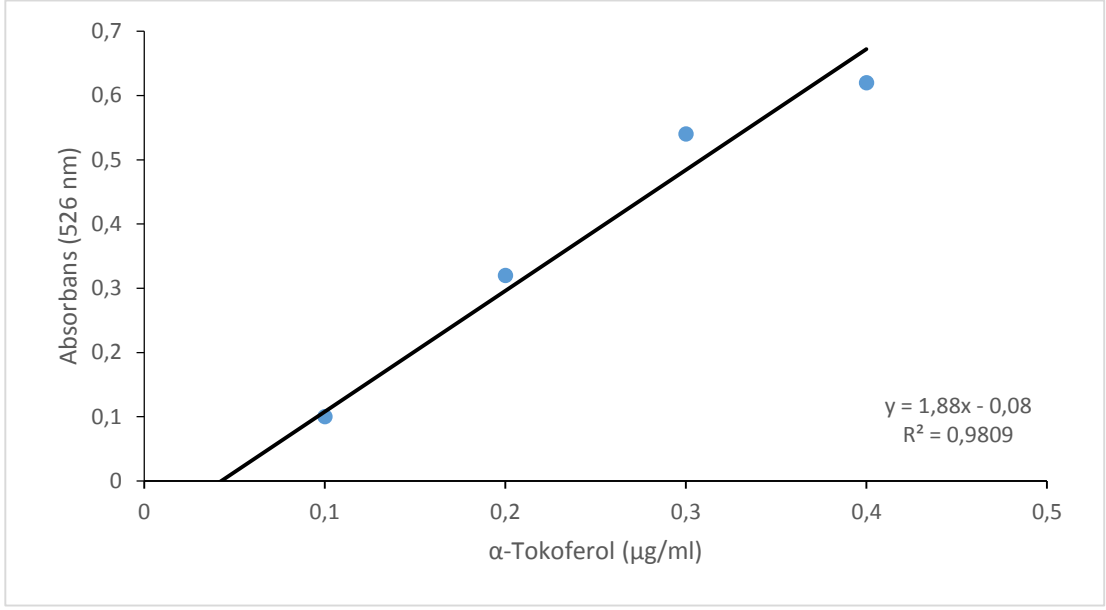
Mis Zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinde bulunan C vitamini miktarı diklorofenolindofenol (DCPIP) ile titrasyon yapılarak belirlendi (Smirnoff, 2000). Bitki homojenatına %0,1'lik diklorofenolindofenol (DCPIP) çözeltisi damla damla ilave edildi. Mavi rengin oluşması ile titrasyon sonlandı. 0,001 g olan her 1 cm³ DCPIP 0,0015 g askorbik aside karşılık gelecek şekilde hesap yapılarak numunedeki C vitamini miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Smirnoff 2000).

$$\text{Askorbik asit miktarı (mg/100g)} = V \times F \times 100 / W$$

Sonuçlar Çizelge 4.5.'te verilmiştir.

4.5. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinin E Vitamini Miktarının Belirlenmesi

α -tokoferol'ün standart çözeltisinden 0,125, 0,25, 0,5 ve 1 $\mu\text{g/mL}$ alınarak H₂SO₄ ilave edilerek tokoferil asetatın ester formu hidroliz edildi. Ardından ortama 0,5 mL 0,01 M tetrazolium blue, 5 mL 0,2 M NaOH ve metanol ilave edildi, 90°C'de 10 dakika inkübasyondan sonra 526 absorbanbsı ölçüldü ve standart grafik oluşturuldu. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin E vitamini miktarı standart grafikten faydalanılarak hesaplandı (Çizelge 4.5.).

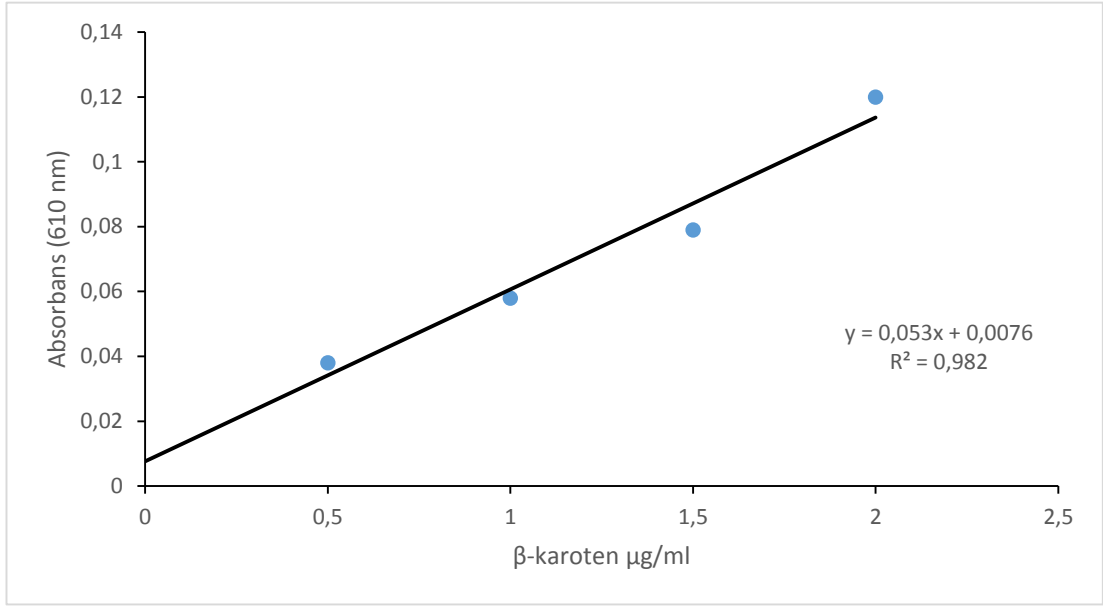


Şekil 4.24. E vitamini tayini standart grafiği

4.6. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) Çiçeklerinin A Vitamini Miktarının Belirlenmesi

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin A vitamini tayini Limited ve Hyderabad tarafından geliştirilen yöntem ile yapıldı (Limited and Hyderabad 1996). Yöntem A vitamininin 4-hidroksi-3-metil benzaldehit ile renkli bir bileşik oluşturma ve bu bileşiğin 610 nm'de maksimum absorbans gösterme prensibine dayanmaktadır. β -karotenden 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 ve 5,0 mg/mL alınarak 4-hidroksi-3-metil benzaldehit ile renkli türev oluşturuldu ve standart grafik oluşturuldu. Daha sonra mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden elde edilen ekstreden numune alınarak aynı yöntem kullanılarak ölçüm yapıldı ve A vitamini miktarı hesaplandı.

Sonuçlar Çizelge 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.25. A vitamini tayini standart grafiği

Çizelge 4.5. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin vitamin tayini sonuçları

Vitamin	Su ekstraktı (mg/100 g)	Petrol eteri ekstraktı (µg/100 g)
A Vitamini (β-karoten)	-	64±0,23
E Vitamini (α-tokoferol)	-	36±0,15
C Vitamini (Askorbik asit)	16±0,32	-

4.7. Fenolik Bileşiklerin UPLC-MS/MS İle Analiz Sonuçları

Fenolik bileşikler, besleyici değerleri olmadığı halde özel sağlık etkilerine sahiptirler. Diyetimizde, hidrojen verme ve singlet oksijenin etkisini bastırma şeklinde ortaya çıkan indirgeme yeteneklerine bağlı olarak, kronik hastalık riskini azaltarak sağlığımıza katkı yapabilirler. Ayrıca fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri, bitkilerde biyolojik sistemlerin antioksidatif savunma mekanizmalarında olduğu gibi, gıda ürünlerinin dayanıklılıklarında da önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu etkilerinden dolayı beyaz zambak (*Lilium candidum*) çiçekleri içeriğinde de daha

güncel bir cihaz olan UPLC-ESI-MS/MS cihazı ve yeni ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır.

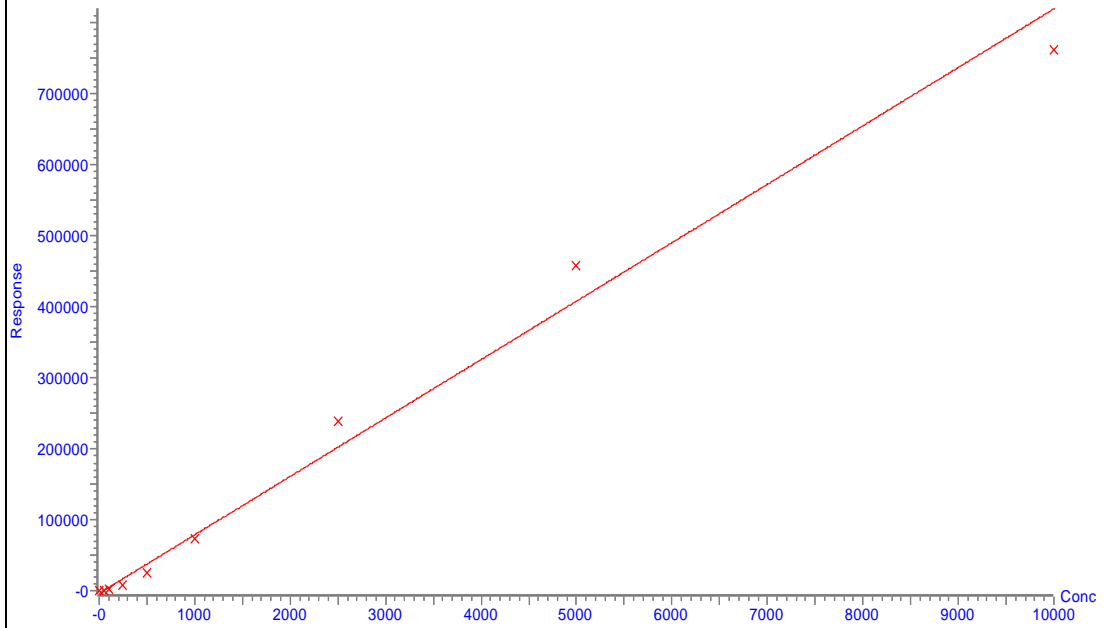
Ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen çözelti Macherey-Nagel Chromafil Xtra PTFE-20/25 0.20µm filtrelerden geçirilerek UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı ile analiz edildi. Ayrım Acquity UPLC BEH C18 kolonu (1.7µm 2.1x100mm) kullanılarak 40°C'da gerçekleştirildi. Numune sıcaklığı 10°C ve enjeksiyon hacmi 1µl'dir. Mobil faz olarak A solvent hattında %0.5'lik CH₃COOH içeren H₂O, B solvent hattında ise %0.5'lik CH₃COOH içeren MeOH kullanılmıştır.

Analiz esnasında 30 adet fenolik bileşik taraması yapılmış ve her bir bileşik için 7 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu datalar kullanılarak beyaz zambak (*Lilium candidum*) çiçeklerinde Şekil 4.27., Şekil 4.29., Şekil 4.31. ve Şekil 4.33.'de belirtilen fenolik bileşiklere rastlanılmış ve miktar tayinleri yapılmıştır. Beyaz zambak çiçeklerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarları Çizelge 4.6.'da verilmiştir.

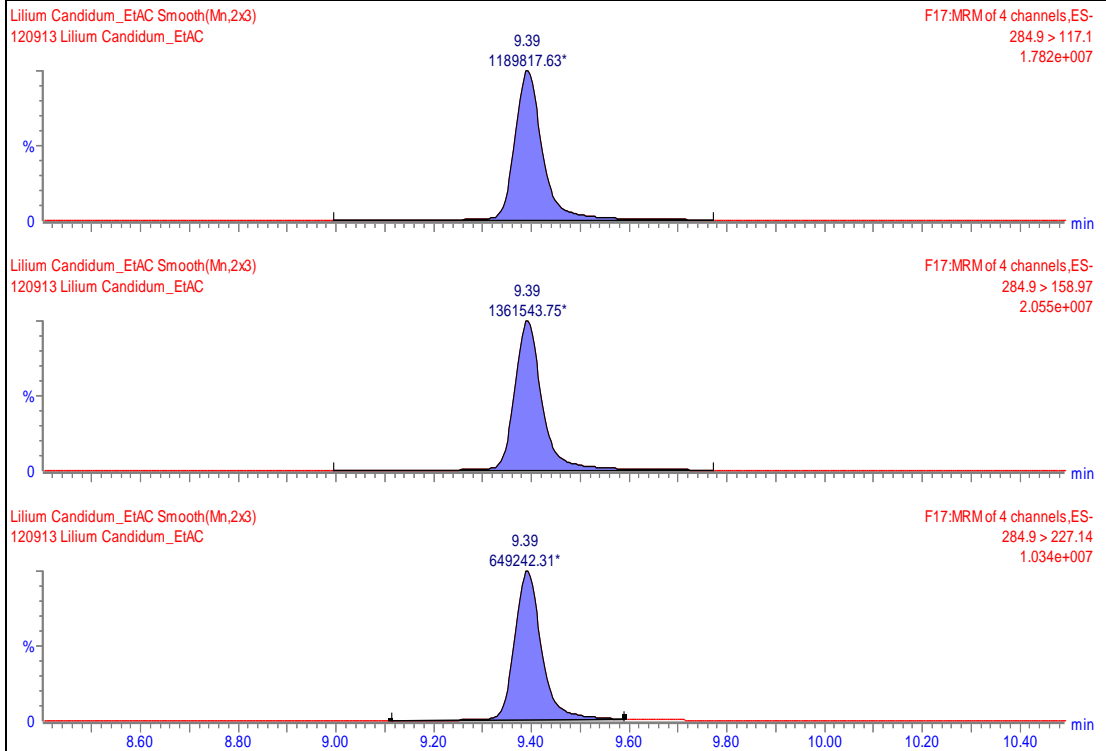
Çizelge 4.6. *Lilium candidum* çiçeklerinde bulunan fenolik bileşiklerin 280 nm'de HPLC-DAD ile analiz sonuçları (µg/100g kuru ağırlık ± standart sapma)

Bileşenler	Alınma zamanı (Dakika)	µg/100g kuru ağırlık ± SS
p- Coumarik asit	4.5	27.74
Ferrulic asit	5.25	113.83
Kaempferol	9.39	120.95
4-Hidroksibenzoik asit	2.57	58.35

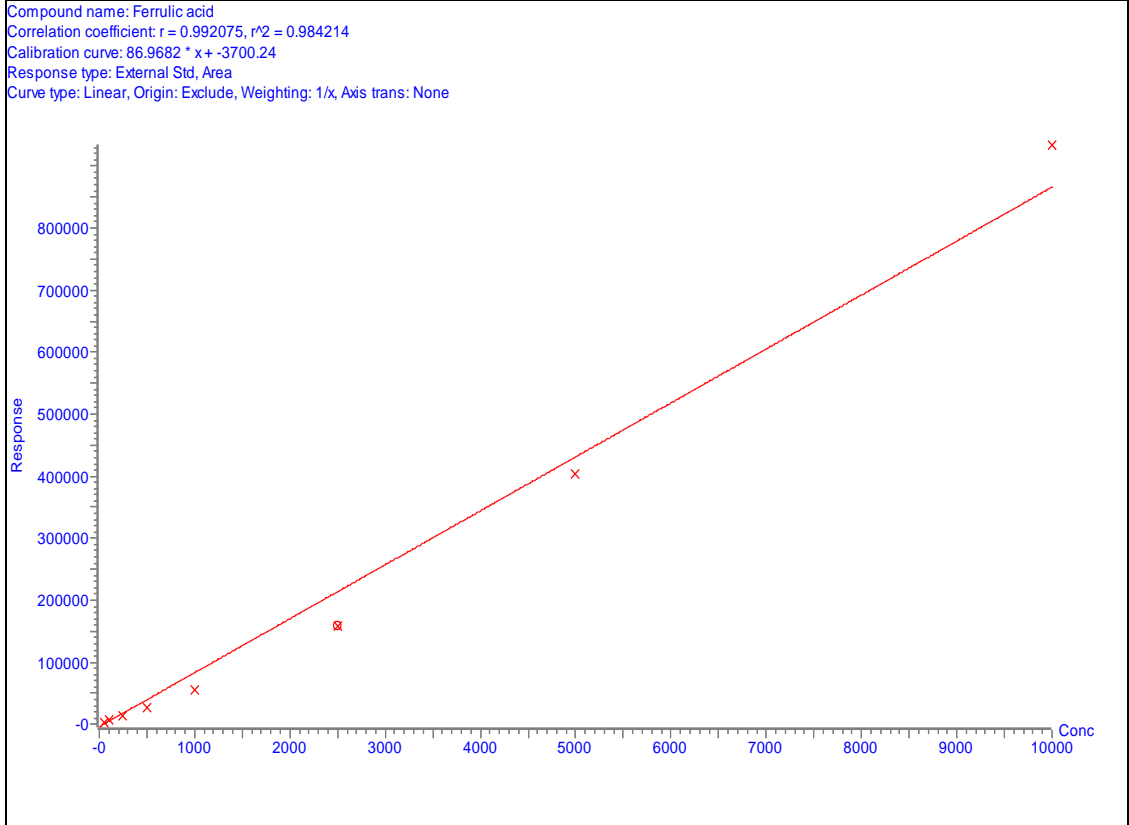
Compound name: Kaempferol
Correlation coefficient: $r = 0.990922$, $r^2 = 0.981927$
Calibration curve: $82.2591 \cdot x + -3446.02$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



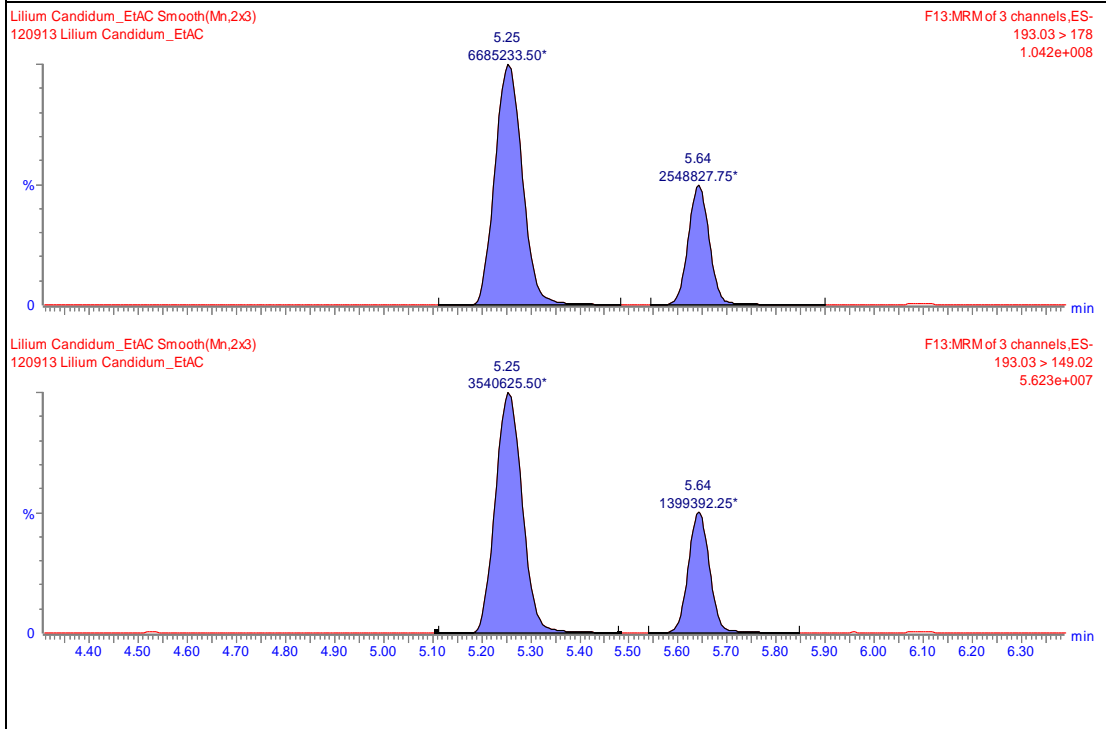
Şekil 4.26. Kaempferol kalibrasyon eğrisi



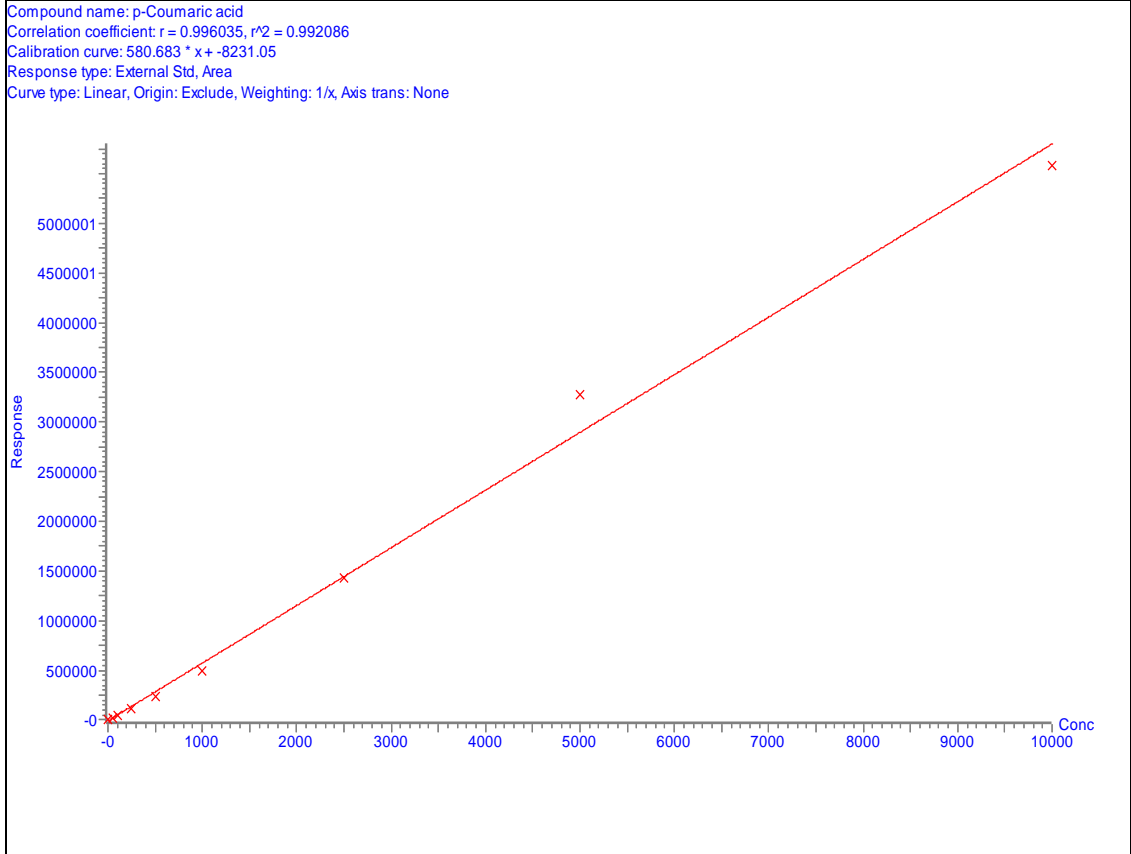
Şekil 4.27. Kaempferol MRM kromatogramı



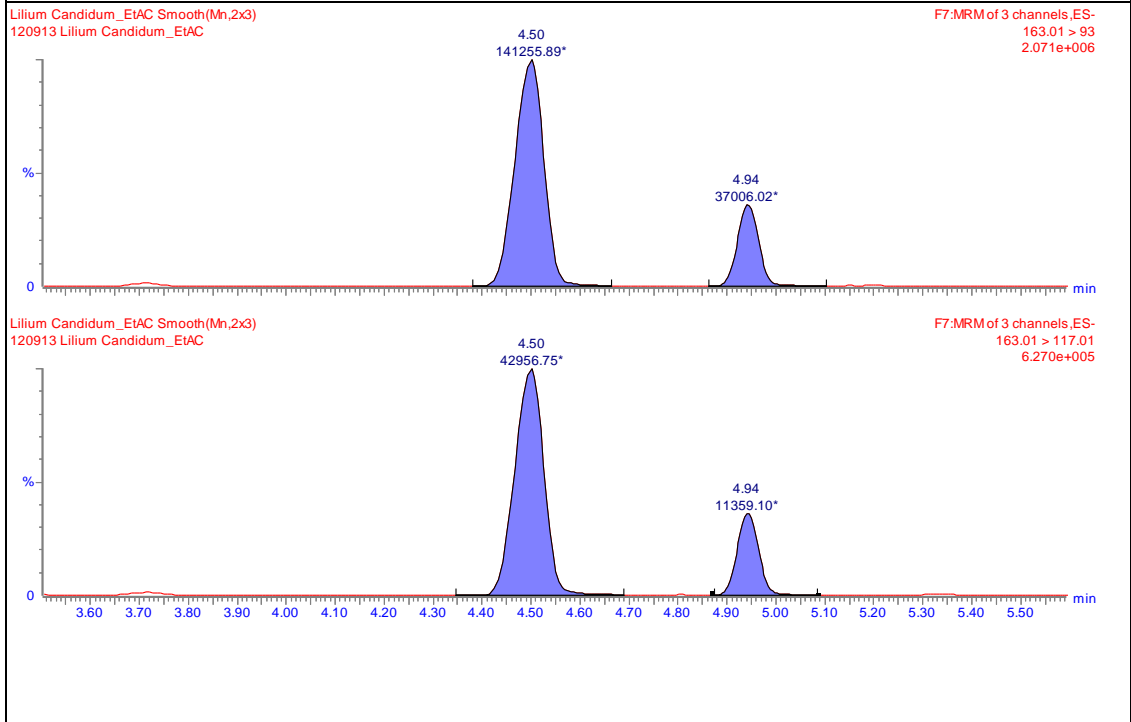
Şekil 4.28. Ferrulic acid kalibrasyon eğrisi



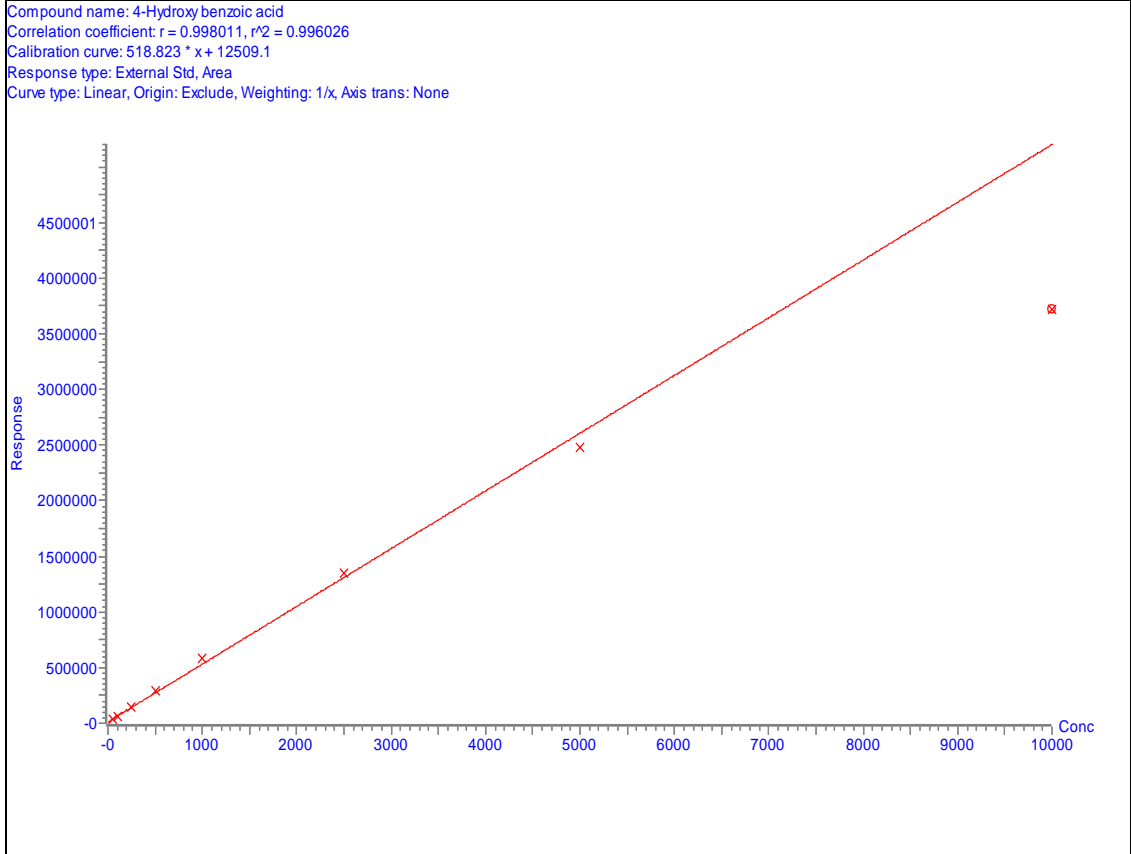
Şekil 4.29. Ferrulic acid MRM kromatogramı



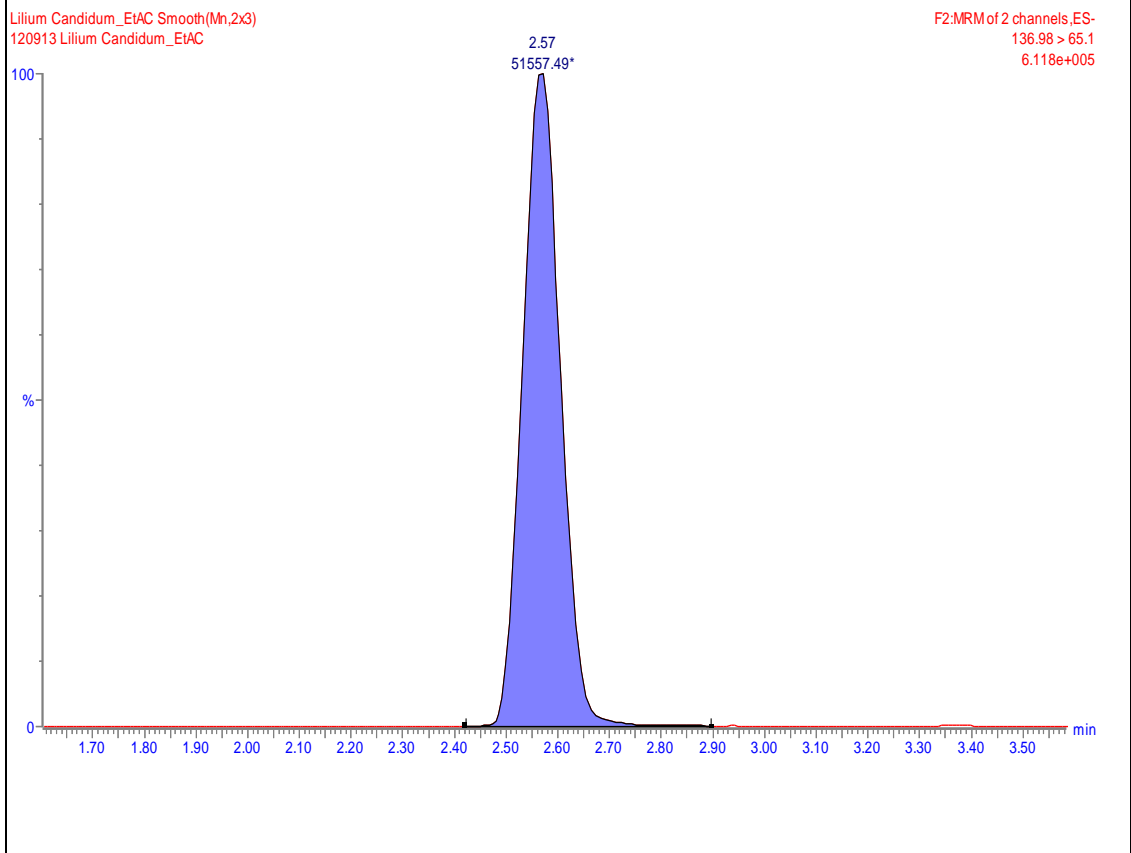
Şekil 4.30. p-coumarik asit kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.31. p-coumarik asit MRM kromotogramı



Şekil 4.32. 4-Hidroksibenzoik asit kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.33. 4-Hidroksibenzoik asit MRM kromotogramı

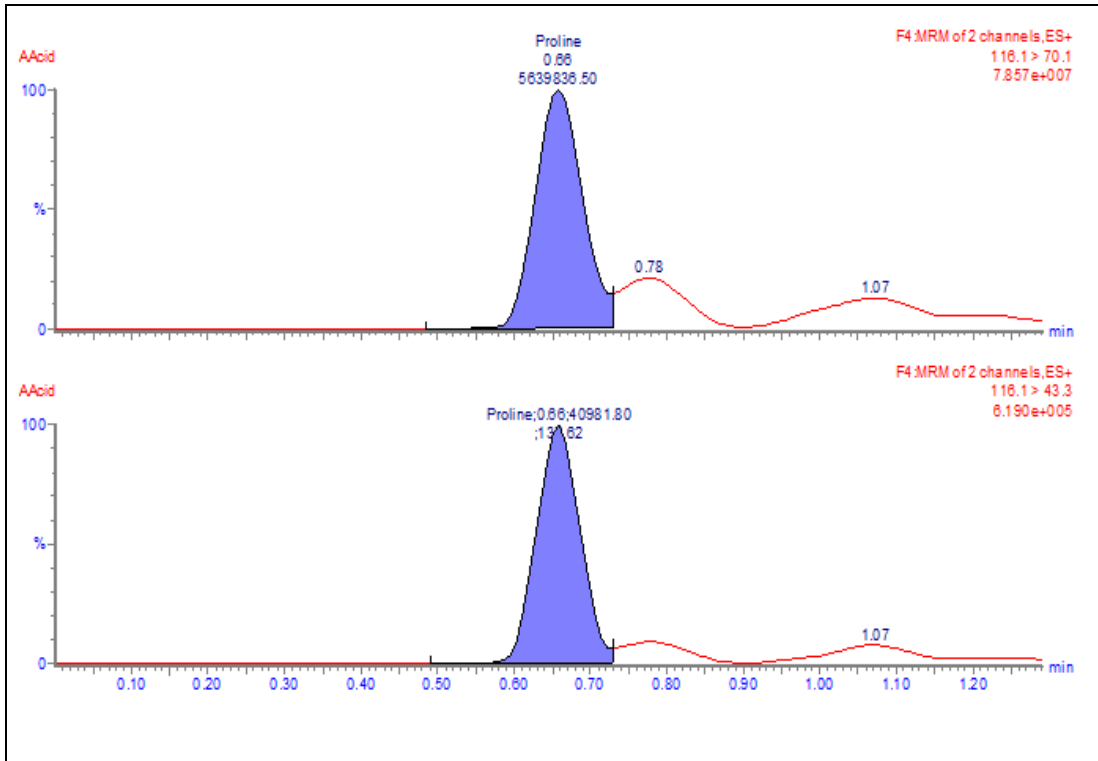
4.8. Serbest Amino Asit İçeriğinin UPLC-MS/MS İle Analiz Sonuçları

Amino asitlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesinde kullanılan güvenilir ve tekrarlanabilir teknikler, genellikle türevlendirme gerektirmekte, bu da bileşiklerin sınıflandırılmasını kötü yönde etkilemekte ve tanımlamayı güçleştirebilmektedir. Ama, tandem kütle spektrometresi ile eşleştirilmiş sıvı kromatografisi (UPLC-MS/MS) gibi tamamlayıcı teknikler, yüksek doğruluklarıyla, türevlendirme öngereksinimlerini ortadan kaldırmaktadırlar.

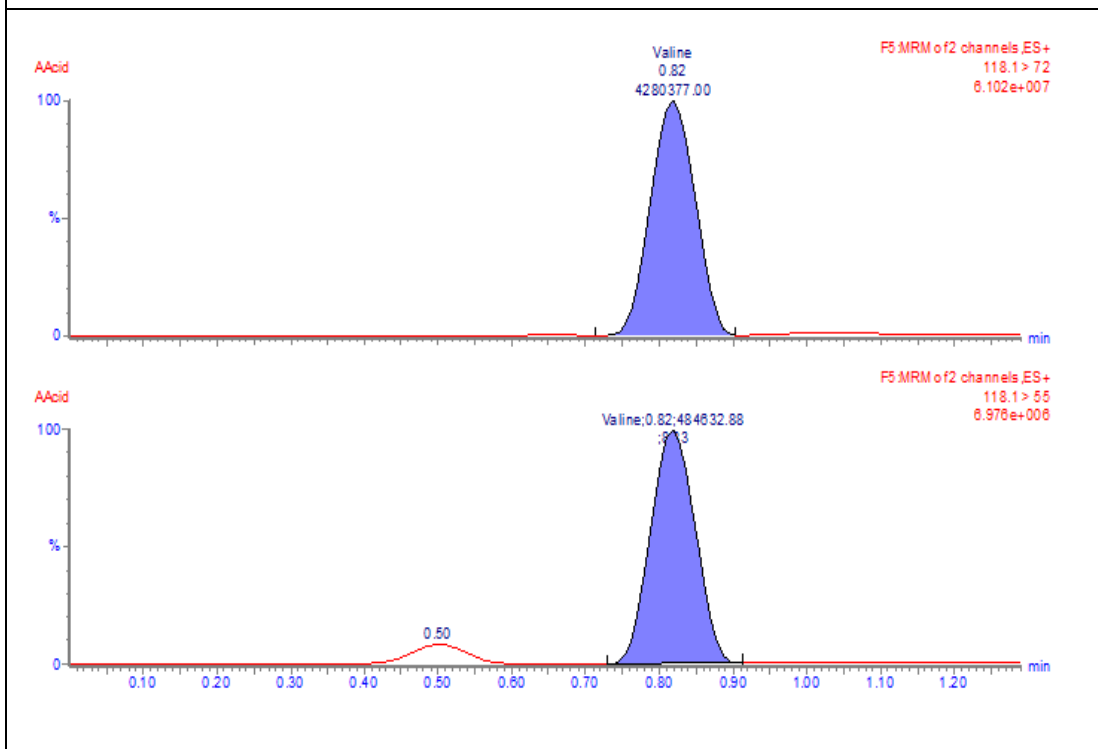
Bu çalışmada da serbest amino asit içeriği belirlenirken, basit bir ekstraksiyon tekniği ve UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı kullanıldı. Ayrım Acquity UPLC BEH C18 kolonu (1.7 μ m 2.1x100mm) kullanılarak 40°C'da gerçekleştirildi. Numune sıcaklığı 10°C ve enjeksiyon hacmi 1 μ l'dir. Mobil faz olarak A solvent hattında %0,5'lik CH₃COOH içeren H₂O, B solvent hattında ise %0,5'lik CH₃COOH içeren MeOH kullanılmıştır.

Analiz sonucunda alıkonma zamanları verilen 21 adet serbest amino asit içeriği miktarları ile belirlenmiştir.

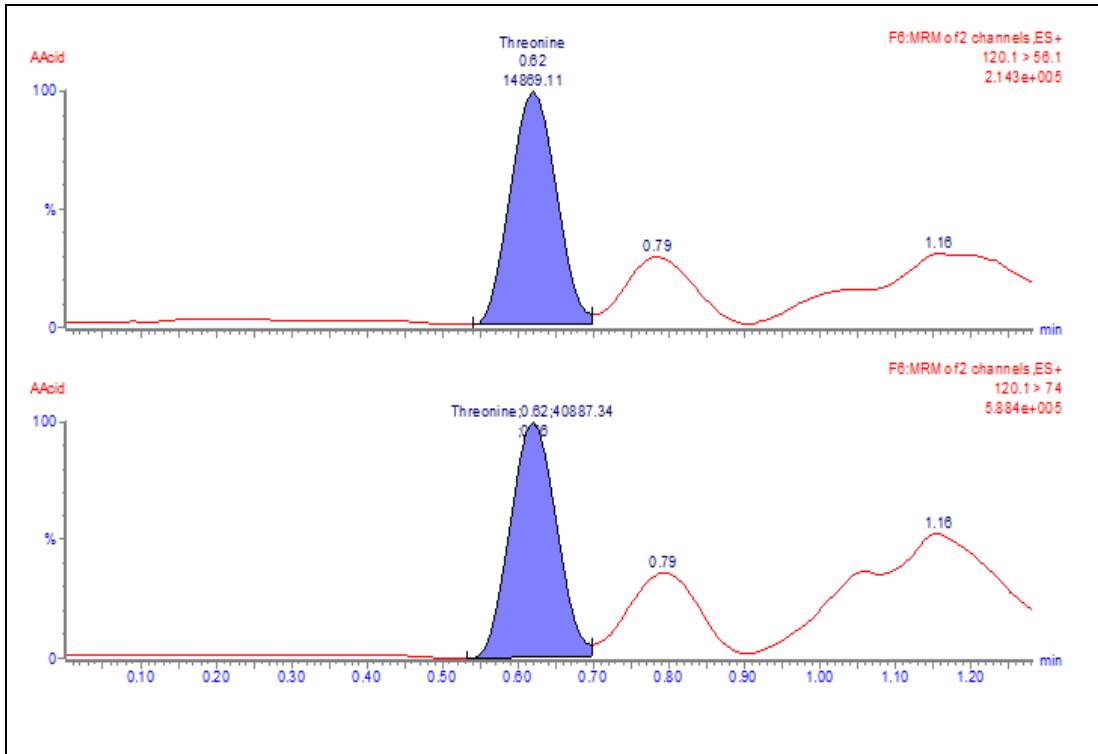
Esansiyel aminoasitler insan vücudunda sentezlenemeyen; ancak protein sentezi için gerekli olduklarından dışarıdan diyetle alınması zorunlu olan aminoasitlerdir. Eksikliklerinde ciddi rahatsızlıklar ortaya çıkabilir. Yetişkinler için esansiyel olan amino asitler; İzolösin, Lösin, Lisin, Metiyonin, Fenilalanin, Treonin, Triptofan ve Treonin'dir. Büyüyen çocuklarda Arginine ve Histidin yarı esansiyeldir.



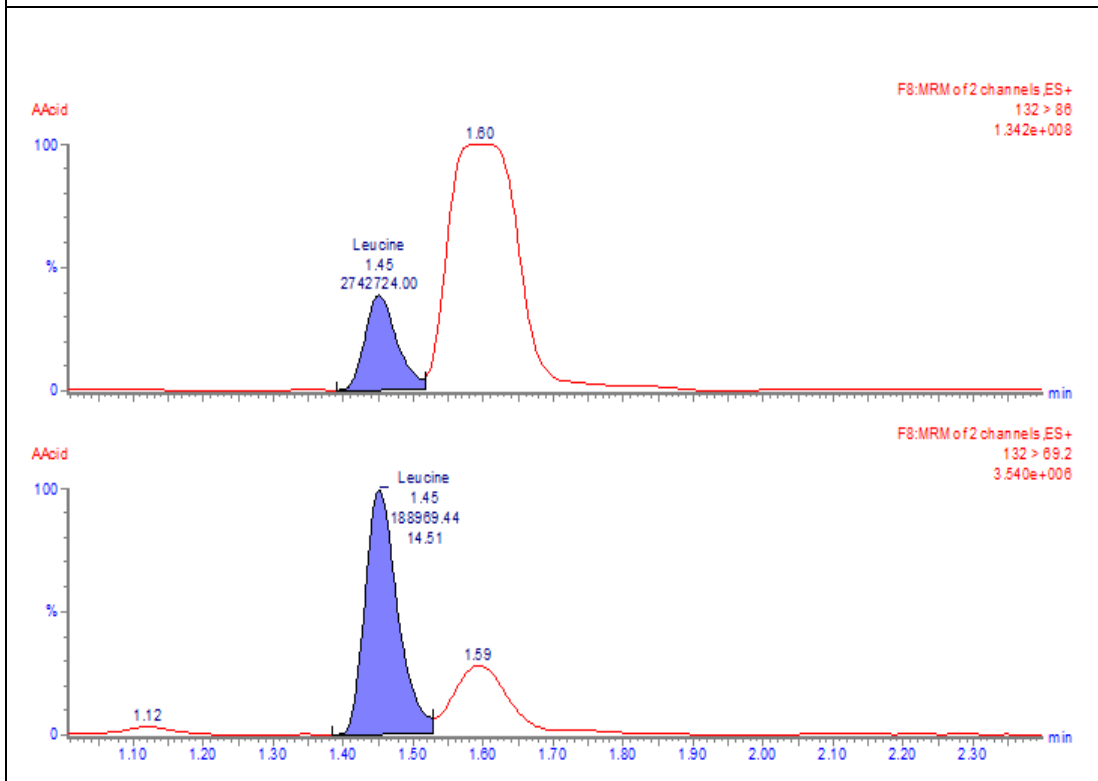
Şekil 4.34. Prolin amino asidinin MRM kromotogramı



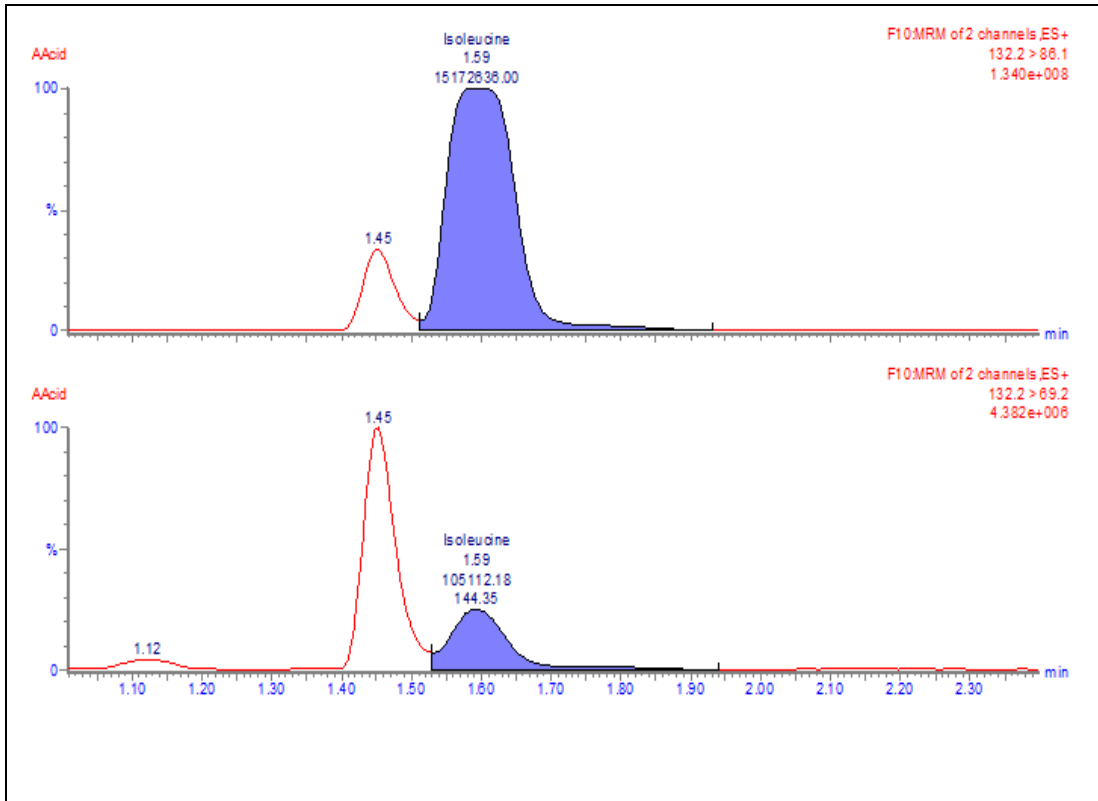
Şekil 4.35. Valin amino asidinin MRM kromotogramı



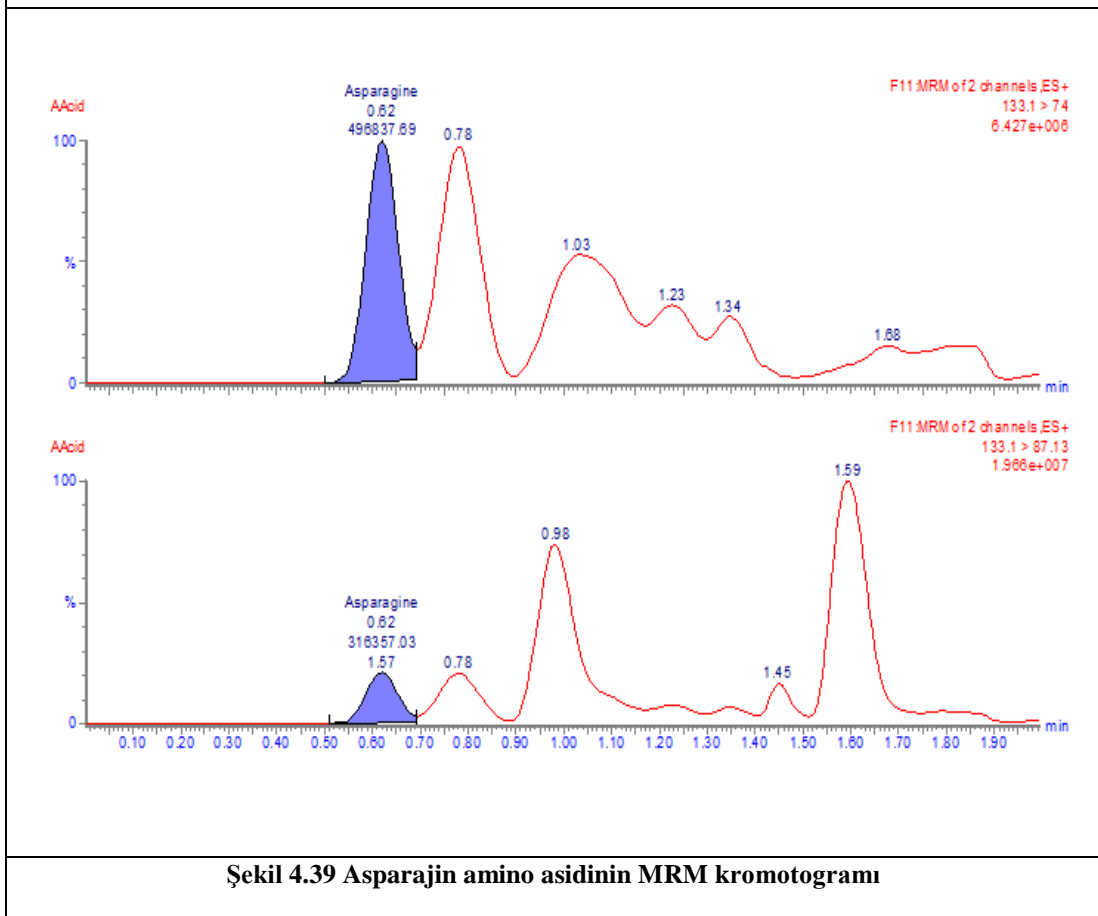
Şekil 4.36. Treonin amino asidinin MRM kromotogramı



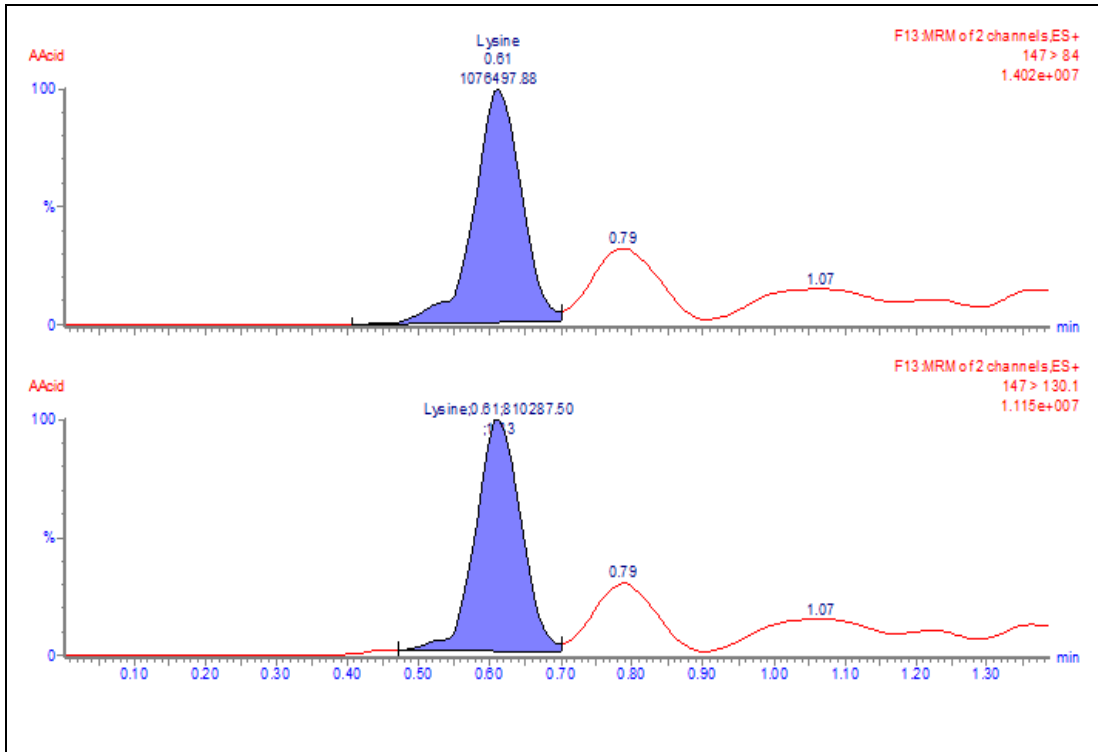
Şekil 4.37. Lösin amino asidinin MRM kromotogramı



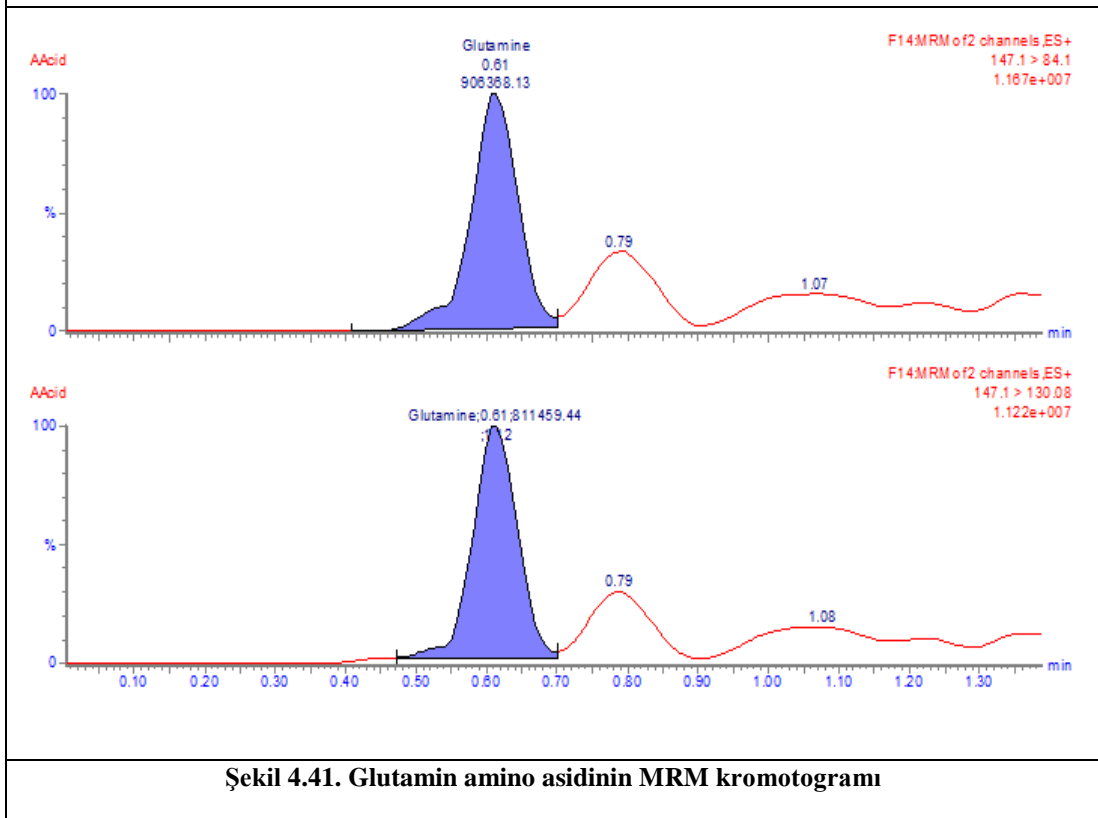
Şekil 4.38. İsolösin amino asidinin MRM kromotogramı



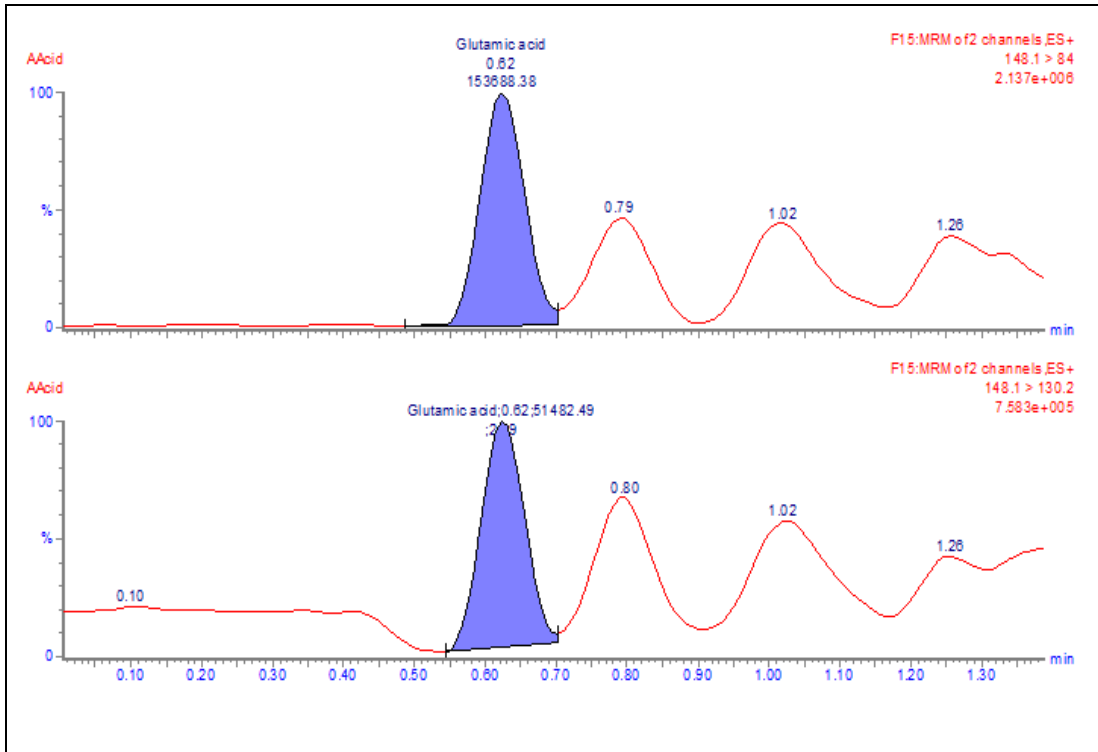
Şekil 4.39 Asparağın amino asidinin MRM kromotogramı



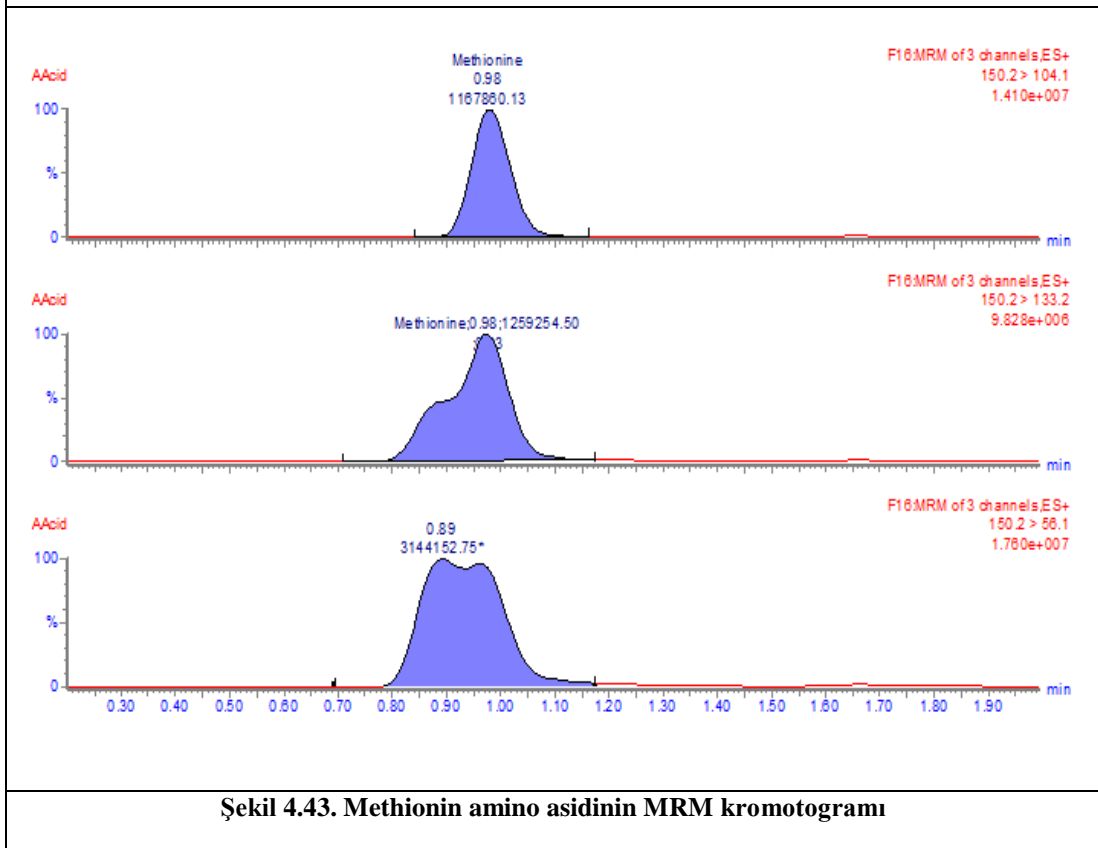
Şekil 4.40. Lizin amino asidinin MRM kromotogramı



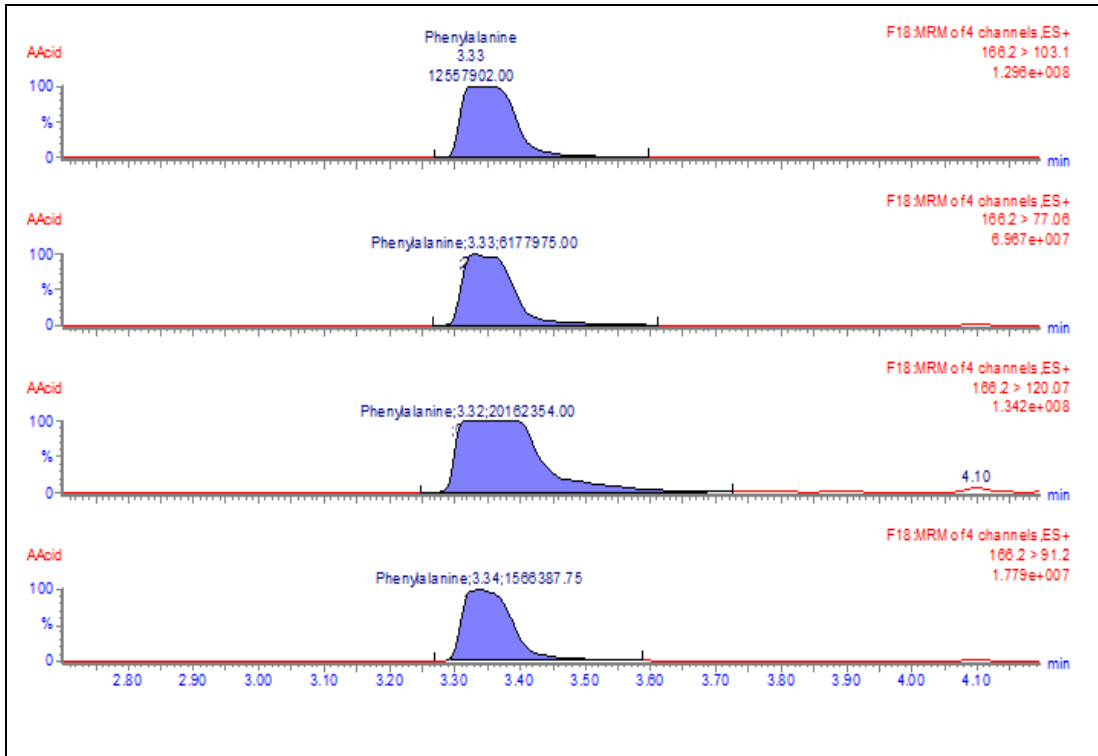
Şekil 4.41. Glutamin amino asidinin MRM kromotogramı



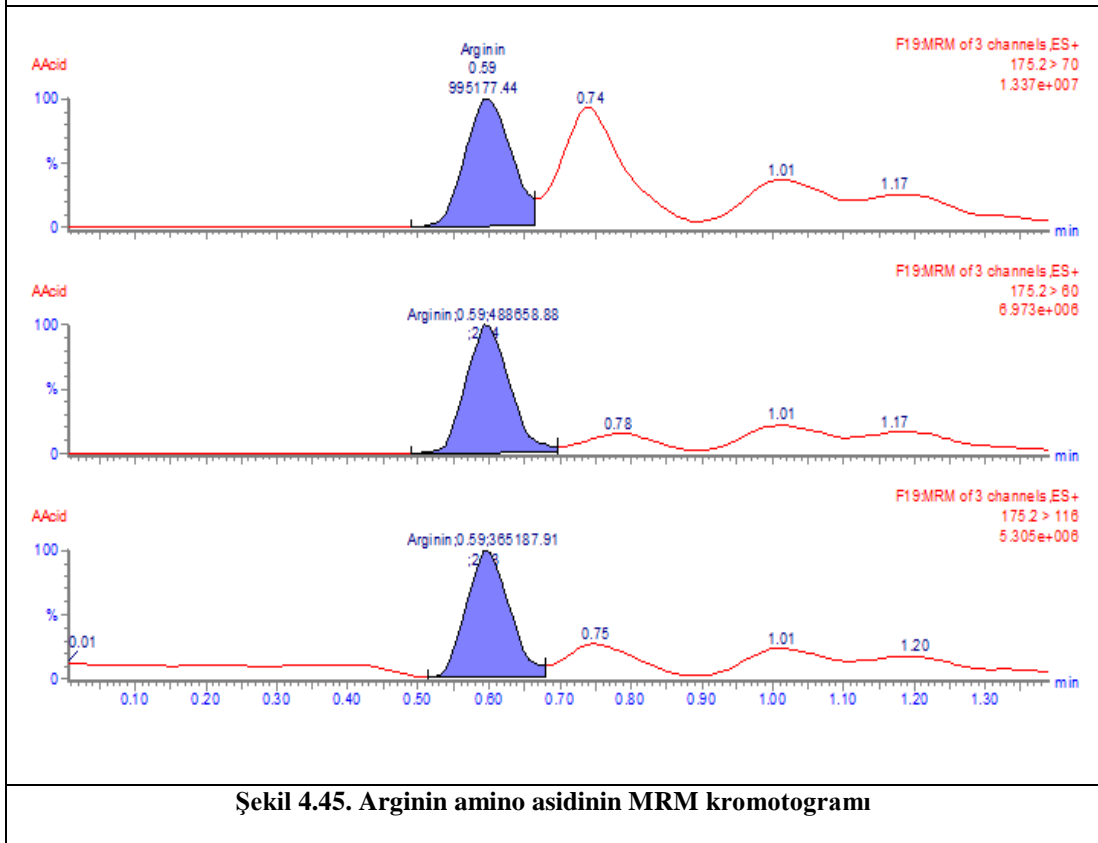
Şekil 4.42. Glutamik asit amino asidinin MRM kromotogramı



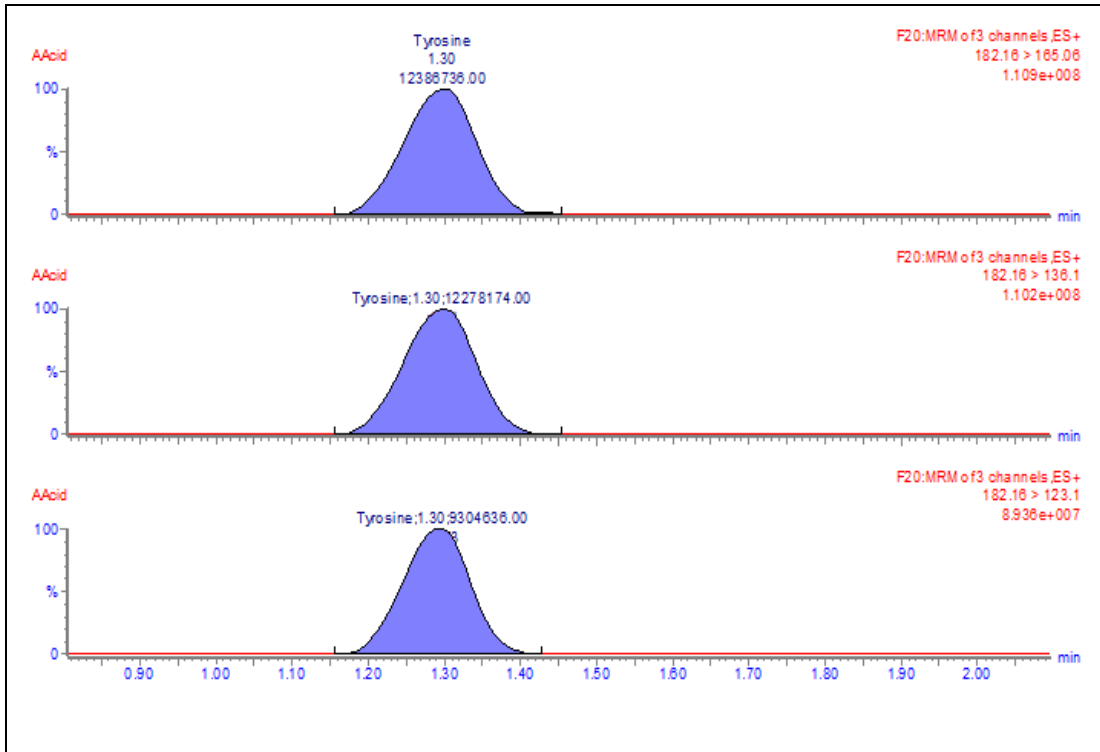
Şekil 4.43. Methionin amino asidinin MRM kromotogramı



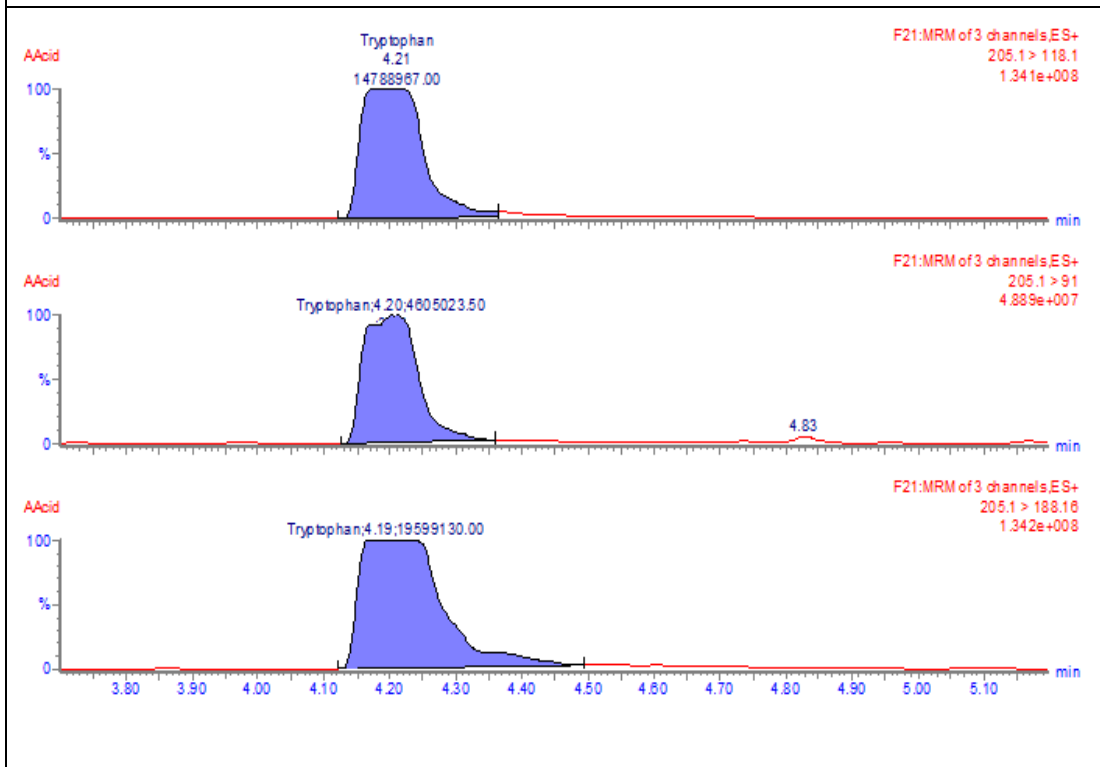
Şekil 4.44. Fenilalanin amino asidinin MRM kromotogramı



Şekil 4.45. Arginin amino asidinin MRM kromotogramı



Şekil 4.46. Tyrosin amino asidinin MRM kromotogramı



Şekil 4.47. Triptofan amino asidinin MRM kromotogramı

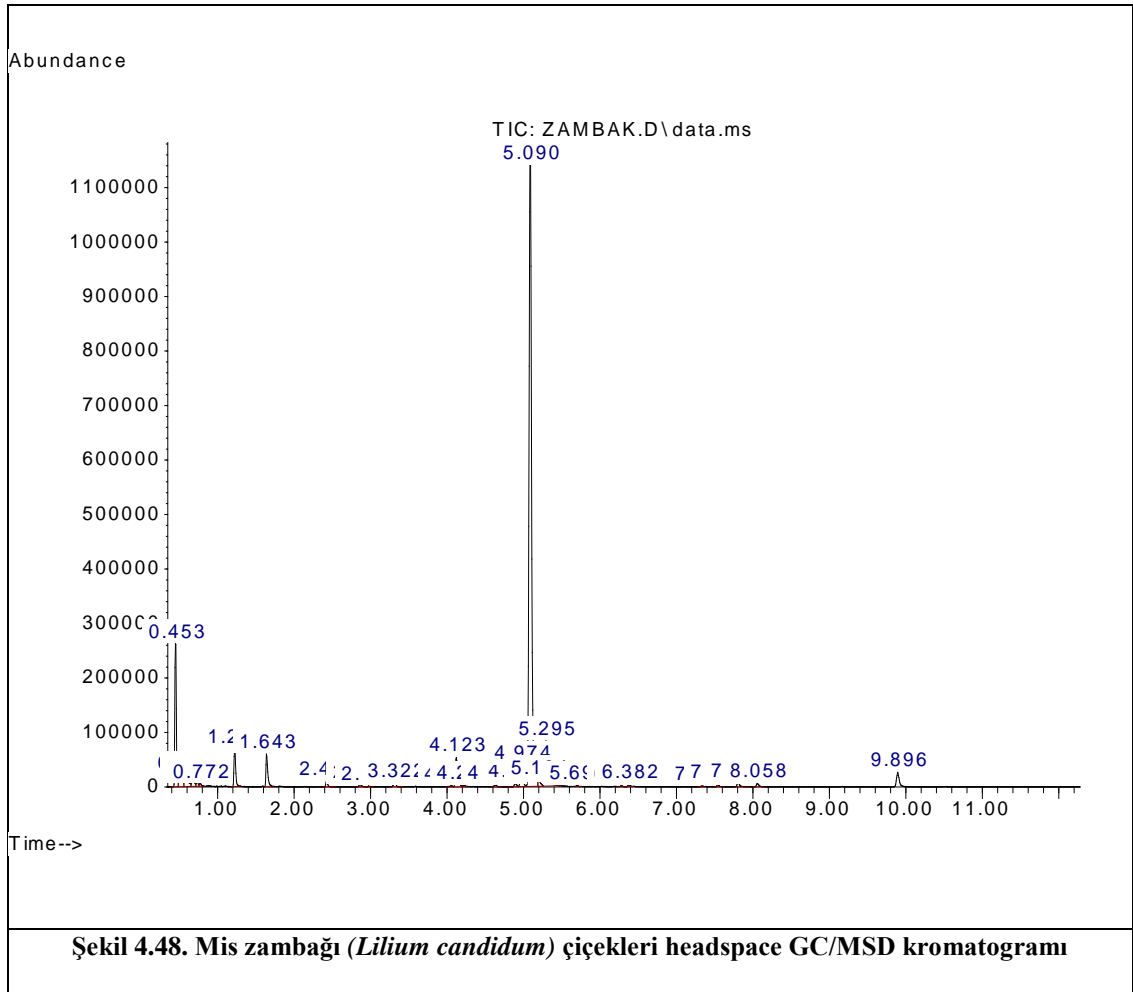
Çizelge 4.7. *Lilium candidum* çiçeklerinde bulunan serbest amino asit içeriğinin UPLC-ESI-MS/MS ile analiz sonuçları ($\mu\text{g}/100\text{g}$ kuru ağırlık \pm standart sapma)

Amino asit	Alınma zamanı (Dakika)	$\mu\text{g}/100\text{g} \pm \text{SS}$
Arginin	0.59	24 ± 0.35
Asparagin	0.62	126 ± 0.13
Glutamik asit	0.62	3 ± 0.31
Glutamin	0.61	25 ± 0.34
İzolesin	1.59	547 ± 0.79
Lösin	1.45	81 ± 0.26
Lizin	0.61	27 ± 0.55
Methiyonin	0.98	62 ± 0.63
Fenilalanin	3.33	568 ± 0.57
Prolin	0.66	85 ± 0.42
Threonin	0.62	3 ± 0.34
Triptofan	4.21	520 ± 0.64
Tirozin	1.30	232 ± 0.49
Valin	0.82	275 ± 0.79

4.9. Aroma Bileşenlerinin Headspace GC/MSD İle Analiz Sonuçları

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin aroma maddeleri Headspace GC/MSD kullanılarak belirlendi. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden 5g alınarak ve Headspace vialine yerleştirildi. Üzerine 1g magnezyum sülfat ilave edilerek kapağı bir krimper ile iyice sıkıldı.

Mikro ekstraksiyon için cihazın oto sampler kısmına yerleştirilen vial injeksiyon için cihaz fırın kısmına gönderildi. 30 dakikalık ekstraksiyon işlemi sonunda vial üst kısmında biriken aroma maddeleri 14 psi basınca sahip helyum gazı ve ısıtılmış bir transferline hattı ile GC/MSD ye gönderildi ve analiz bu şekilde gerçekleştirildi.



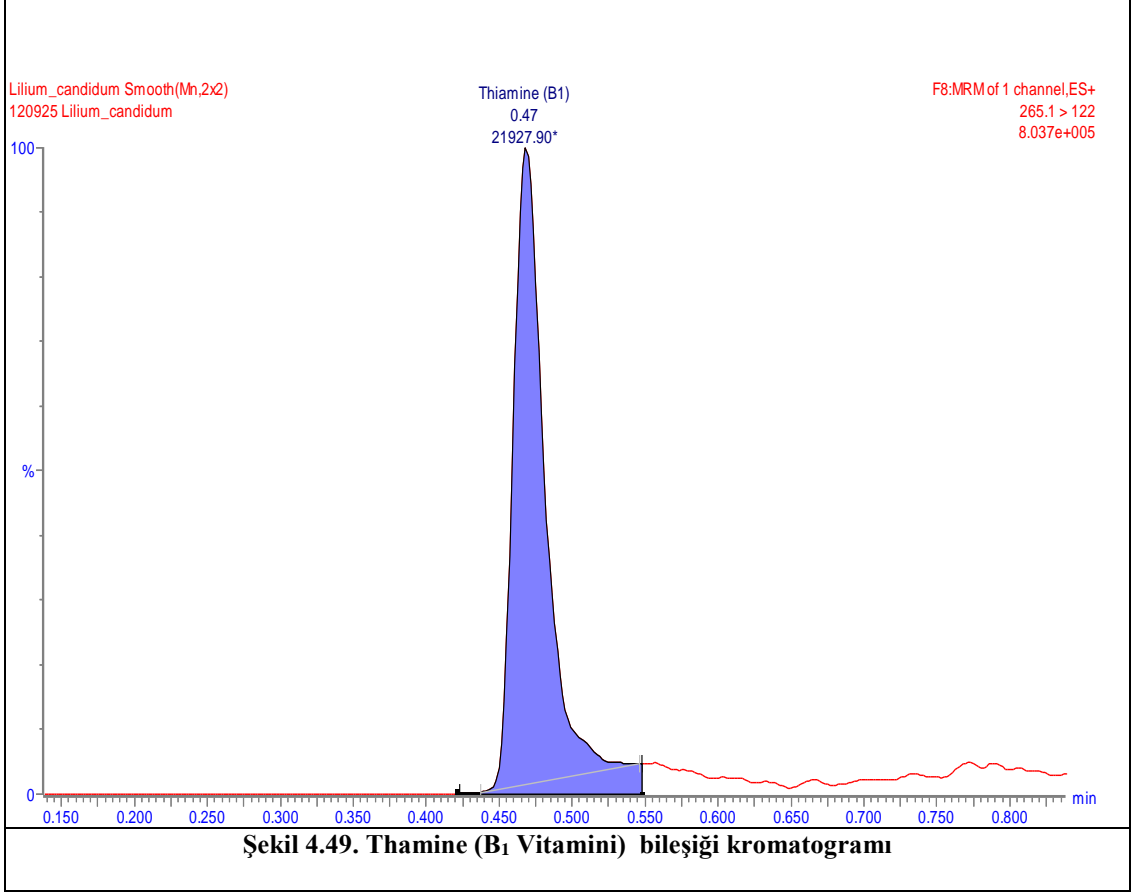
Çizelge 4.8. Beyaz zambak (*Lilium candidum*) çiçeklerinin Aroma Verici Bileşen Yüzdeleri

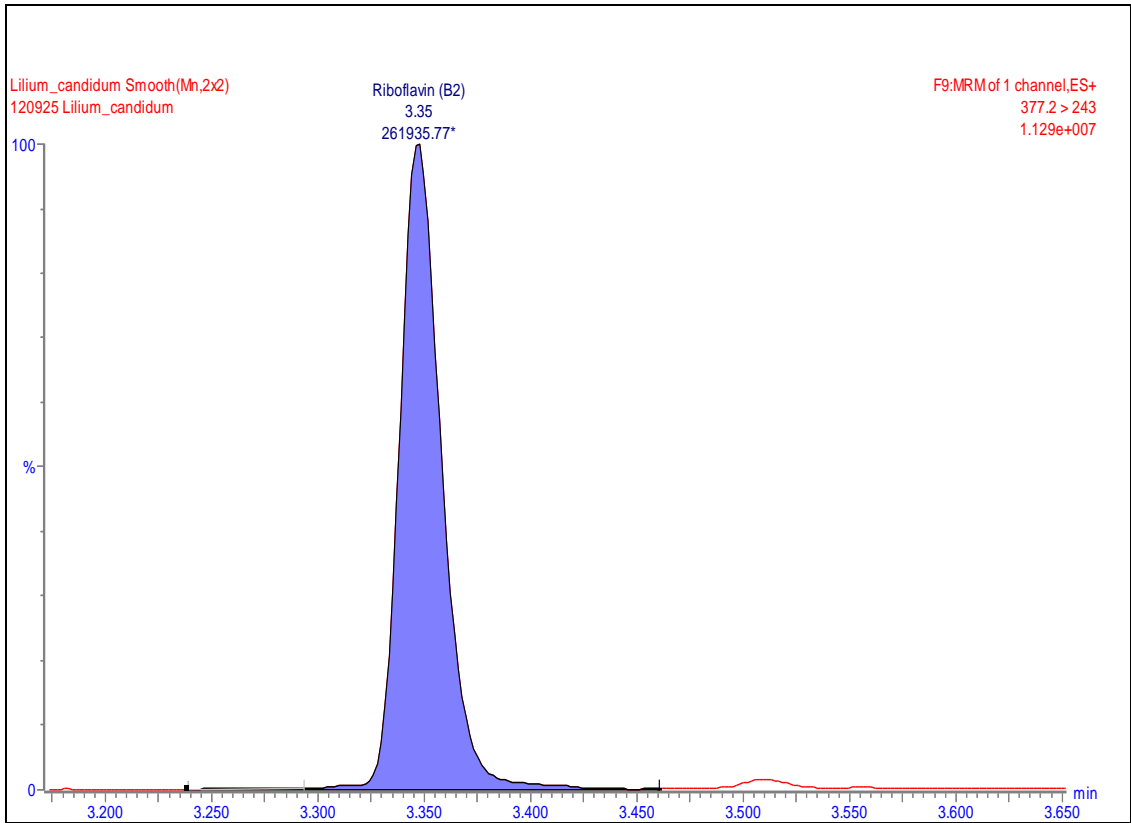
No	Bileşen Adı	R.T. (min.)	Yüzdesi (%)
1	2-Oktanöl	0.452	8.63
2	2,5-Heptadien	0.572	1.58
3	Hegzanal	1.226	2.83
4	2-Hegzanal	1.643	2.41
5	Hegzanoik asit, metil ester	2.427	0.45
6	Beta-Pinen	3.321	0.42
7	Benzeneasetaldehid	4.124	2.86
8	Linalool oksit	4.897	0.30
9	Benzoik asit, metil ester	4.975	2.03
10	Linalool	5.090	63.581
11	Feniletıl Alkol	5.296	5.59
12	2,6-Octadienal, 3,7-dimetil	7.809	0.44
Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması olarak verilmiştir. ($p<0.05$).			

4.10. B grubu Vitaminlerinin UPLC-MS/MS İle Analiz Sonuçları

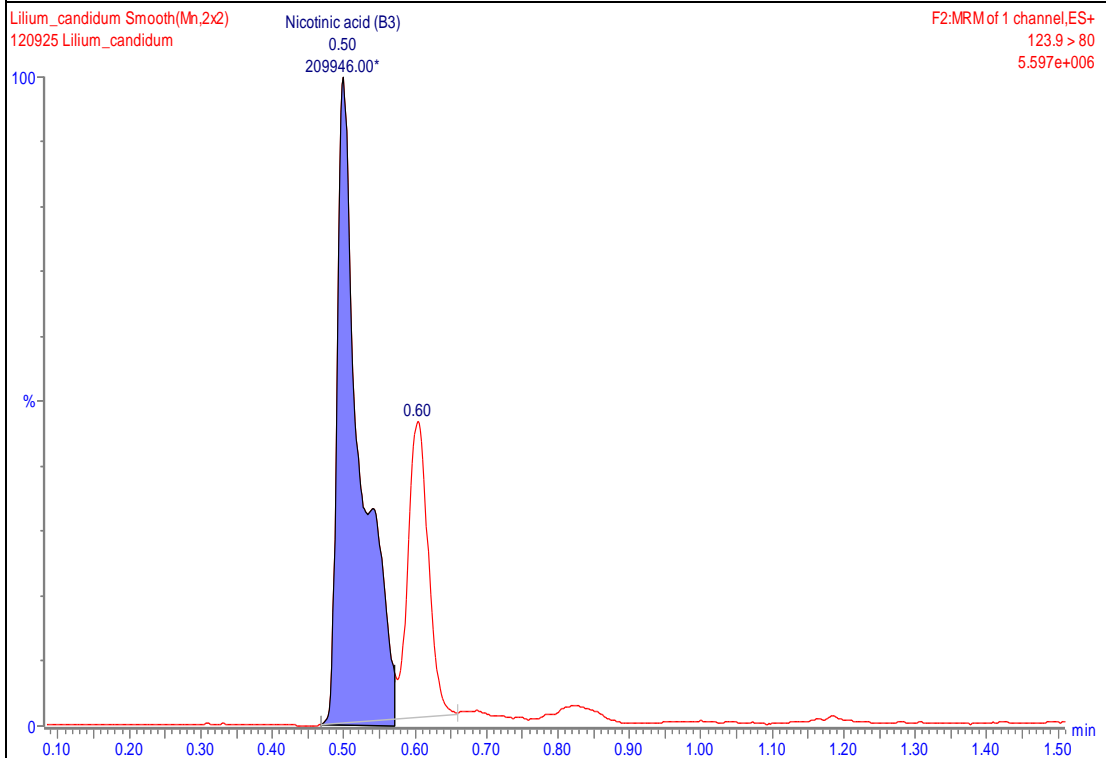
Tiamin (B₁ vitamini), Riboflavin (B₂ vitamini), Nikotinamid (B₃ vitamini), Nikotinic asit (B₃ vitamini), Pantotenik asit (B₅ vitamini), Piridoksin (B₆ vitamini), Biotin (B₇ vitamini), Folik asit (B₉ vitamini) ve Siyanokobalamin (B₁₂ vitamini), UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı ile analiz edildi. Ayrım Acquity UPLC BEH C18 kolonu (1.7µm 2.1x100mm) kullanılarak 40°C’da gerçekleştirildi. Numune sıcaklığı 10°C ve enjeksiyon hacmi 1µl’dir. Mobil faz olarak A solvent hattında %0.5’lik CH₃COOH içeren H₂O, B solvent hattında ise %0.5’lik CH₃COOH içeren CH₃CN kullanılmıştır. İlk önce 6 noktalı kalibrasyon

eğrileri çizilen tüm vitaminler daha sonra cihazda analiz edilmiş ve miktar tayinleri yapılmıştır.

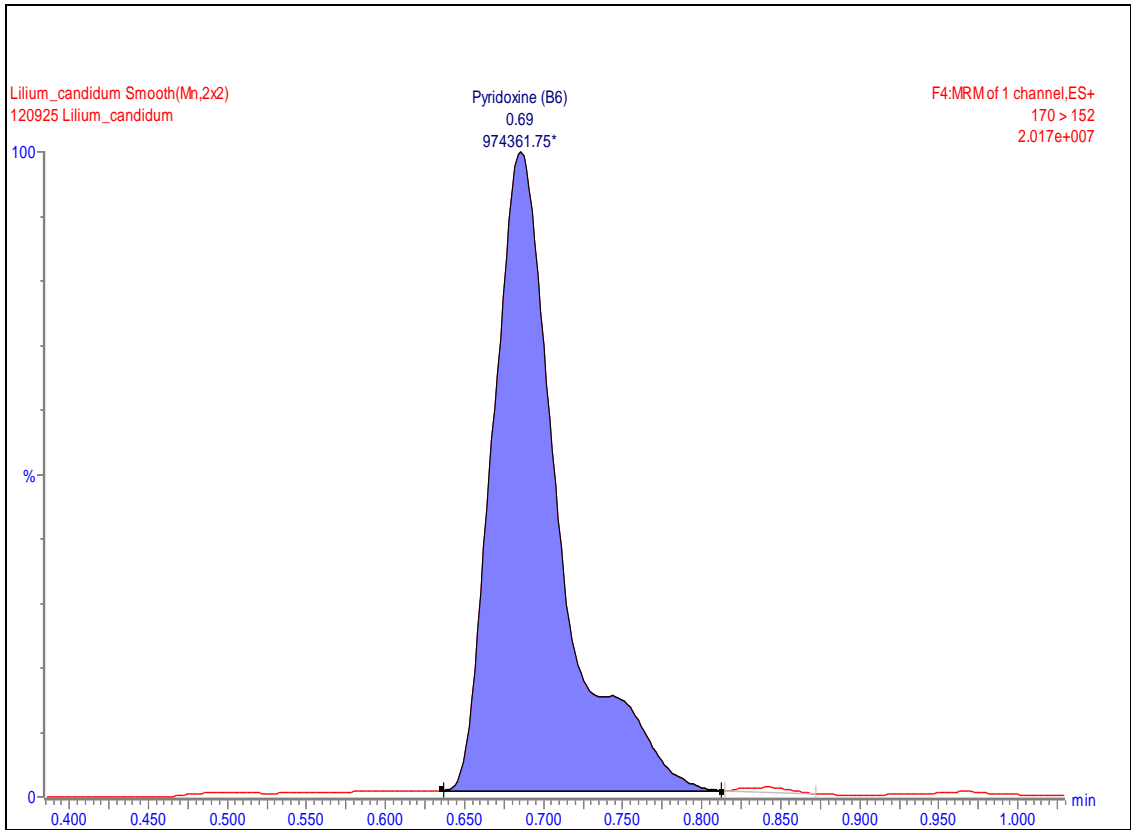




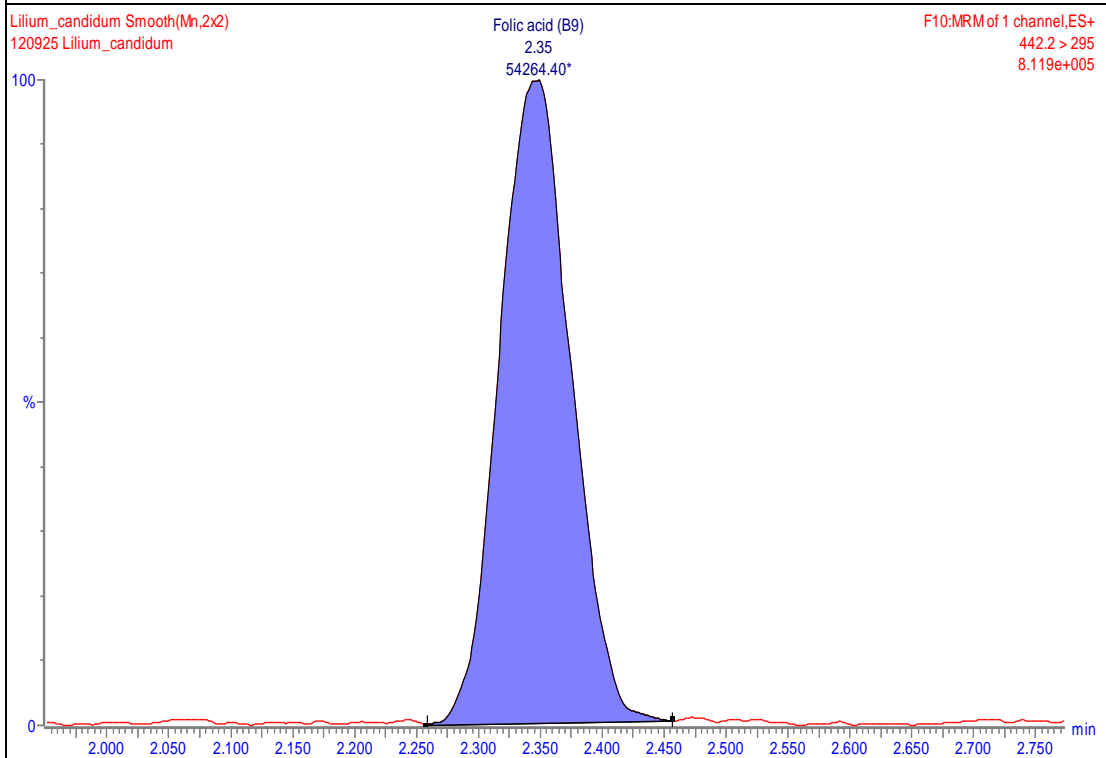
Şekil 4.50. Riboflavin (B₂ Vitamini) bileşiği kromatogramı



Şekil 4.51. Nikotinik asit (B₃ Vitamini) bileşiği kromatogramı



Şekil 4.52. Piridoksin (B₆ Vitamini) bileşiği kromatogramı



Şekil 4.53. Folik asit (B₉ Vitamini) bileşiği kromatogramı

Çizelge 4.9. Mis Zambağı (*Lilium candidum*) çiçekleri bulunan suda çözünebilir vitaminlerin UPLC-ESI-MS/MS ile analiz sonuçları ($\mu\text{g}/100\text{g}$ kuru ağırlık \pm standart sapma).

No	Vitamin Adı	R.T. (min)	<i>Lilium candidum</i>
1	Tiamin (B ₁ vitamini)	0.470	2.88 \pm 0.01
2	Riboflavin (B ₂ vitamini)	3.350	34.41 \pm 0.03
3	Nikotinamid (B ₃ vitamini)	0.500	27.58 \pm 0.03
4	Piridoksin (B ₆ vitamini)	0.690	128.00 \pm 0.03
5	Folik asit (B ₉ vitamini)	2.350	7.12 \pm 0.05

4.11. Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.11.1. β -karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin metanol ekstraları ve metanol ekstresinden sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen hekzan, etil asetat ve metanol fraksiyonlarının toplam antioksidan aktivitesi (lipit peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi) β -karoten renk açılımı yöntemi kullanılarak belirlendi. Buna göre mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin, etil asetat ekstralarının toplam antioksidan aktivitesi, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ekstre olan çözeltilerde % 70.20 ± 0.32 inhibisyon tespit edildi.

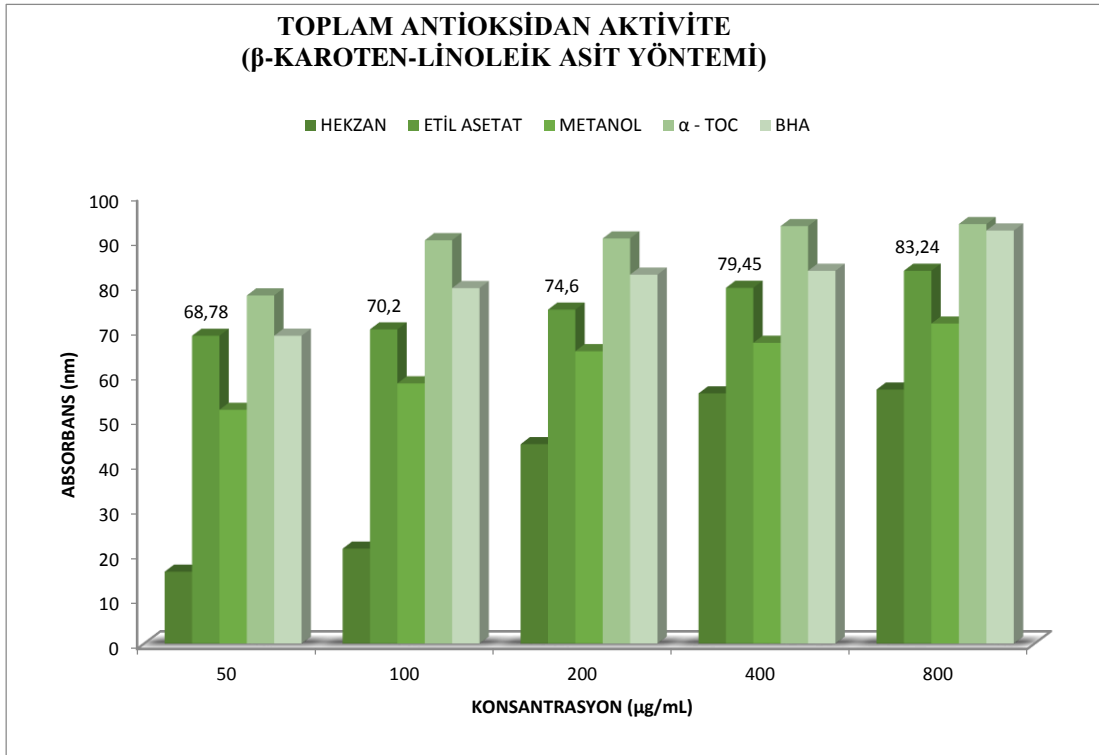
*4.11.1.1. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçekleri lipit peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi sonuçları*

Bu yöntemle göre metanol ekstresinin ve metanol ekstresinden elde edilen fraksiyonların lipit peroksidasyonunu kayda değer biçimde inhibe etmektedir. Tüm örneklerde artan konsantrasyonla inhibisyonların da arttığı izlenmektedir. Etil asetat fraksiyonu hekzan ve metanol ekstresinden daha yüksek aktivite gösterdi (% $83,24\pm 1.95$). İkinci sırada metanol ekstresi aktivite gösterdi (% $71,5\pm 3.50$).

Çizelge 4.10. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin β -karoten renk açılımı yöntemiyle lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (% inhibisyon)

β -karoten linoleik asit Aktivitesi						
Ekstreler/Frakسیونlar		50 μ g	100 μ g	200 μ g	400 μ g	800 μ g
<i>Lilium candidum</i>	HEKZAN	16.14 \pm 0.21	21.30 \pm 0.59	44.66 \pm 2.07	55,96 \pm 1.78	56,81 \pm 1.18
	ETİL ASETAT	68.78 \pm 0.35	70.20 \pm 0.32	74.60 \pm 1.17	79,45 \pm 1.23	83,24 \pm 1.95
	METANOL	52.30 \pm 0.97	58.19 \pm 1.52	65,35 \pm 2.16	67,22 \pm 2.21	71,5 \pm 3.50
Standartlar	α -Tokoferol	77.77 \pm 0.48	90,05 \pm 0.54	90,45 \pm 0.69	93,20 \pm 0.55	93,65 \pm 0.58
	BHA	66.79 \pm 0.26	79,40 \pm 0.37	82,39 \pm 0.38	83,24 \pm 1.16	92,22 \pm 1.18

Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması olarak verilmiştir. ($p < 0.05$).



Şekil 4.54. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin β -karoten renk açılımı yöntemiyle lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (% inhibisyon) sütun grafiği

4.11.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Sonuçları

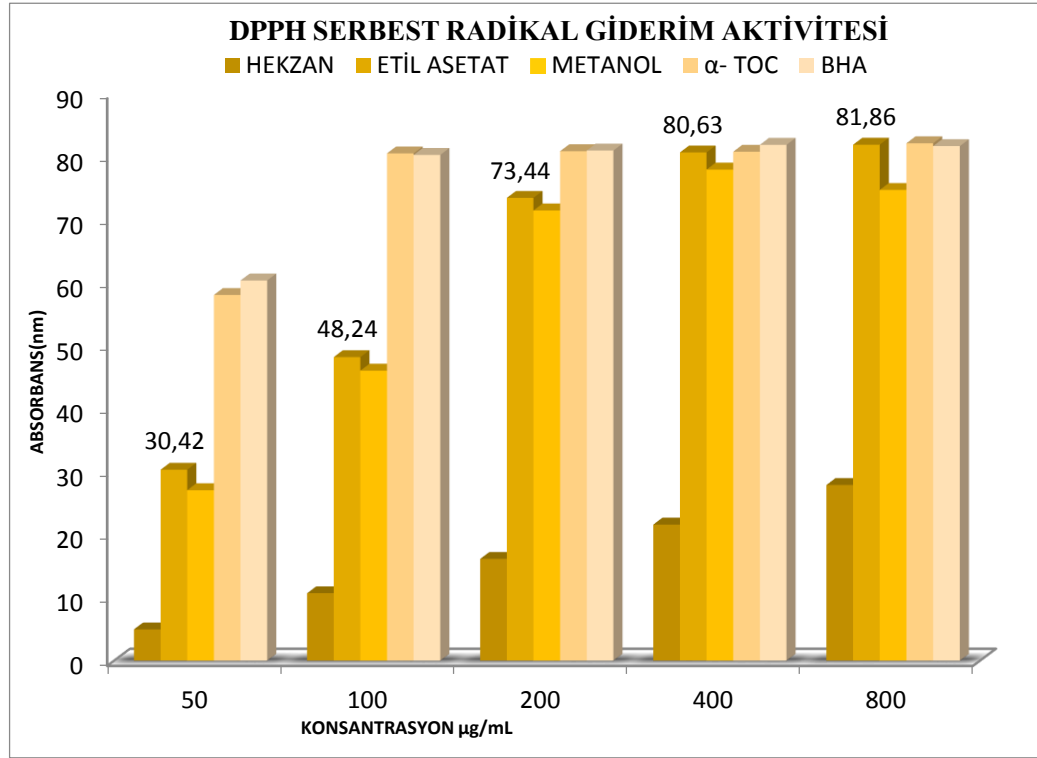
Bu yöntemde mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin etil asetat fraksiyonu hekzan ve metanol ekstresinden daha yüksek aktivite göstermektedir (Çizelge 4.11.). Toplam fenolik bileşik miktarı ile doğru orantı olan bu yöntemin sonuçları,

aktivitenin bu fraksiyonda bulunan fenolik bileşiklerden kaynaklandığını doğrular yöndedir.

Çizelge 4.11. Beyaz zambak (*Lilium candidum*) çiçeklerinin türlerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon)

DPPH Aktivitesi						
Ekstreler/Fraksiyonlar		50µg	100µg	200µg	400µg	800µg
<i>Lilium candidum</i>	Hekzan	5.00±0.24	10,78±0.59	16,25±2.07	21,73±1.78	28,00±1.18
	Etil asetat	30.42±0.16	48,24±0.32	73,44±1.17	80,63±1.23	81,86±1.95
	Metanol	27.17±0.97	46,10±1.52	71,45±2.16	77,92±2.21	74,70±3.50
Standartlar	α-Tokoferol	58.07±0.48	80,48±0.54	80,83±0.69	80,74±0.55	82,09±0.58
	BHA	60.36±0.29	80,24±0.37	80,93±0.38	81,84±1.16	81,64±1.18

Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması olarak verilmiştir. ($p<0.05$).



Şekil 4.55. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin türlerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) sütun grafiği

4.11.3. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Sonuçları

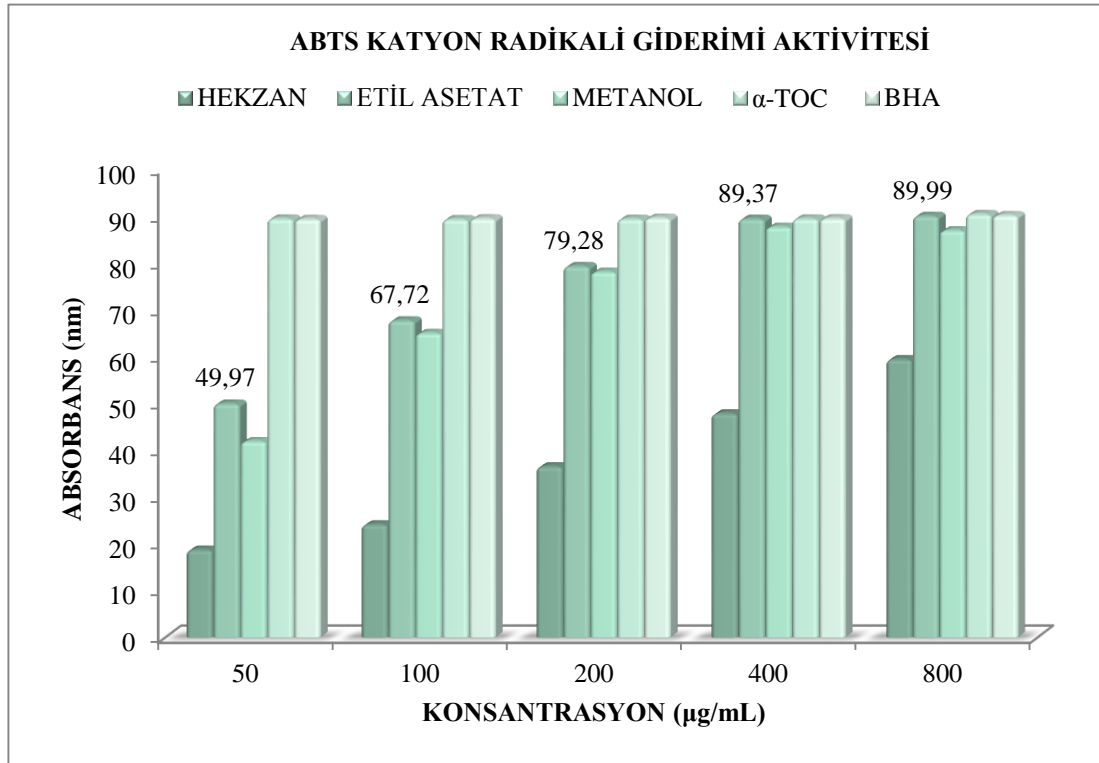
Bu yöntemde de mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin etil asetat fraksiyonu ve metanol ve hekzan ekstresinden daha yüksek aktivite göstermektedir (Çizelge

4.12). Toplam fenolik miktarı ve DPPH süpürme aktivitesi ile doğru orantı olan bu yöntemin sonuçları ABTS^{•+} süpürme aktivitesinin bu fraksiyonda bulunan fenolik bileşiklerden kaynaklandığı görülmektedir.

Çizelge 4.12. Beyaz zaambak (*Lilium candidum*) çiçeklerinin ABTS yöntemiyle radikali giderim aktivitesi (% inhibisyon)

ABTS Aktivitesi						
Ekstreler/Frakسیونlar	50µg	100µg	200µg	400µg	800µg	
<i>Lilium candidum</i>	Hekzan	18.77±0.31	24.19±0.59	36.60±2.07	47.89±1.78	59.45±1.18
	Etil asetat	49.97±0.19	67.72±0.32	79.28±1.17	89.37±1.23	89,99±1.95
	Metanol	41.97±1.15	65.03±1.52	78.08±2.16	87.66±2.21	86.90±3.50
Standartlar	α-Tokoferol	89.43±0.38	89.30±0.54	89.38±0.69	89.43±0.55	90.38±0.58
	BHA	89.33±0.21	89.46±0.37	89.58±0.38	89.46±1.16	90.14±1.18

Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması olarak verilmiştir. ($p<0.05$).



Şekil 4.56. Beyaz zaambak (*Lilium candidum*) çiçeklerinin ABTS yöntemiyle radikali giderim aktivitesi (% inhibisyon) sütun garfiği

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada öncelikle mis zambağı (*Lilium candidum*) bitkisinin çiçeklerinden proteaz enzimi saflaştırıldı; mis zambağında (*Lilium candidum*) A vitamini, E vitamini ve C vitamini miktarları belirlendi.

Literatür araştırmalarımız sonucunda proteaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan en yaygın yöntemin iyon değişim kromatografisi olduğu belirlenmiştir ve bu yöntem 2 basamaktan oluşmaktadır.

1. Basamakta %60-80 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve çökelekte yüksek proteaz aktivitesi belirlenmiştir.

2. Basamakta ise diyalizlenen enzim homojenatı CM-Sephadex iyon değişim kolonuna yüklenmiş ve 0,1-0,5 mM NaCl ile tuz gradienti oluşturularak elüe edilmiş ve aktif elüatlarda protein tayini yapılmıştır.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden 2 basamakta saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği Şekil 4.2.'de verilmiştir. Ayrıca her basamakta spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma tablosu oluşturulmuş ve proteaz enziminin 59,62 kat saflaştırıldığı belirlenmiştir. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE yapılmıştır. Enzimin saf olduğu belirlenmiş olup jelin fotoğrafı çekilmiştir. Jelin fotoğrafı Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden proteaz enziminin optimum pH değerini belirlemek için pH:4-10 aralığında aktivite ölçümleri yapılmış ve aktivite-pH grafiği çizilmiştir (Şekil 4.4.). Enzimin optimum pH'sının 7 olduğu ve pH:4-9 aralığında aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla 0-100°C aralığında enzimin aktivitesi

ölçülmüş ve optimum sıcaklığın 70°C ve enzimin 40-80°C aralığında aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak 29,7 kDa olarak belirlenmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği ve molekül ağırlığı tayini grafiği sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratına karşı K_M ve V_{max} değerlerinin hesaplanmasında Lineweaver-Burk grafikleri oluşturulmuş ve K_M ve V_{max} değerleri sırasıyla 1,18 μM ve 1,11 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{dakika}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8).

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğini belirlemek için hemoglobin, jelatin, azoalbumin, azokazein substratlarına karşı proteolitik aktivite ölçümleri yapıldı ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak her substrat için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi ve en fazla ilginin kazein substratına karşı olduğu görüldü. Sonuçlar Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) katyonlarının etkisi de belirlenmiştir. Tüm katyonların klorürlü tuzları kullanılmıştır. Çizelge 4.3’te görüldüğü gibi Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} iyonlarının enzimi aktivite ettiği Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} katyonlarının enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM β -merkapto etanol, SDS, EDTA ve iyodasetamid kimyasallarının etkisi belirlenmiştir. SDS ve EDTA’nın düşük konsantrasyonlarda enzimi kısmen inhibe ettiği, yüksek konsantrasyonlarda ise uygulanan tüm kimyasalların enzimi tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinden bulunan C vitamini, E vitamini ve A vitamini miktarları belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Fenolik bileşikler, bitkilerin görünüş, tat ve lezzet gibi tüketim açısından önemli olan kalite özellikleri üzerine etkileri ve doğal antioksidan olarak insan sağlığı üzerine olumlu etkileri nedeniyle önemli bileşenlerdir. Meyvelerin rengini etkileyen antosiyaninler fenolik bileşiklerin geniş bir grubunu oluşturmaktadır. Antosiyaninlerin meyve ve ürünlerine verdiği renk, tüketici tercihleri ve kalite özellikleri açısından ticari bir değer olarak kabul edilebilir. Antosiyaninlerin, gıda endüstrisinde doğal renklendirici olarak kullanılması fenolik bileşiklerin önemini artırmaktadır. Aynı zamanda fenolik bileşiklerin bir kısmı doğal tatlandırıcı olarak da kullanılabilir. Sağlık açısından, sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen etkileri nedeniyle doğal antioksidan özellik gösteren fenolik bileşiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Antioksidan olarak fenolik bileşikler kanser, kalp hastalıkları, katarakt, göz hastalıkları, yaşlılık hastalıkları vb. birçok hastalığı engelleyebildiği ifade edilmektedir. Bu nedenle fenolik madde içeriği yüksek olan meyve ve sebze tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azaltmakta ve sağlık üzerine olumlu etkide bulunmaktadır. Meyve sebzelerde niteliklerine göre çeşitli fenolik bileşikler farklı oranlarda bulunabilmekte ve gıdaların renk, tat ve lezzetini etkileyerek gıdaların albenisini önemli şekilde etkilemektedirler. Ayrıca fenolik bileşiklerin doğal antioksidan kaynağı olmaları ve dolayısı ile sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle meyve ve sebze ürünlerine olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinde fenolik bileşik bakımından zengin olduğu bulunmuştur. Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinde majör olarak, Kaempferol ve Ferrulik asit bileşenleri tespit edilmiştir.

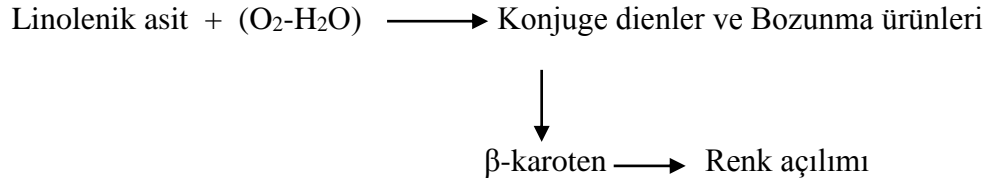
Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinde bulunan serbest amino asit içeriğinin UPLC-ESI-MS/MS ile analiz edildi (Çizelge 4.7.). *Lilium candidum* çiçeklerinde serbest amino asitin hemen hemen tümüne değişik miktarlarda rastlanıldı. 568±0.52µg/100g Fenilalanin, 547±0.45µg/100g İzolösin, 520±0.33µg/100g Triptofan, 275±0.23µg/100g Valin ve 81±0.41µg/100g Lösin gibi esansiyel amino asitlere diğerlerine göre yüksek oranda rastlanılmış olması çok önemlidir.

Mis zambağının (*Lilium candidum*) çiçeğinin aroma maddeleri Headspace GC/MSD kullanılarak belirlendi (Çizelge 4.6). Analiz sonucunda Linalool (%63.58), 2-Octanol (%8.63), Feniletıl Alkol (%5.59), Benzeneasetaldehit (%2.86), Hegzanal (%2.83), 2-Hegzanal (%2.41), Benzoik asit, metil ester (%2.03), 2,5-Heptadien (%1.58),

Hegzanoik acit, metil ester (%0.45), 2,6-Octadienal, 3,7-dimetil (%0.44), Beta-Pinen (%0.42) ve Linalool oksit (%0.30) bileşenleri tespit edilmiştir.

Mis zambağının (*Lilium candidum*) çiçeğinde bulunan B grubu vitaminleri UPLC-ESI-MS/MS analiz edilmiştir. Tiamin (2.88±0.01), Riboflavin (34.41±0.03), Nikotinamid (27.58±0.03), Piridoksin (128.00±0.03) ve Folik asit (7.12±0.05) mg/100g (kuru ağırlık ± standart sapma) bulunmuştur.

Toplam antioksidant aktivite belirleme yöntemlerinden biri olan bu sistem linoleik asitin inkübasyonu sırasında oluşan peroksit ürünlerinin β-karoten karakteristik sarı rengine tepkime vererek gidermesi ve bu renk giderinin spektroskopik olarak takip edilmesi esasına bağlıdır.



Sistemde antioksidantların bulunması ya da sisteme antioksidant içerikli özütlerin ilave edilmesi, linoleik asidin oksidasyon sonucu linolenik asitin parçalanmasından oluşan peroksit ürünlerinin, bu antioksidantlarla nötralize edilmesini sağlar. Bunun neticesi olarak da β-karotenin karakteristik sarı rengi korunmuş olur dolayısıyla örneklerin daha yüksek absorbansı daha yüksek antioksidant aktiviteyi göstermektedir.

Mis zambağı (*Lilium candidum*) çiçeklerinin toplam antioksidant aktiviteleri aynı derişimdeki BHA ve α-tokoferol standartlarının antioksidant aktiviteleri ile karşılaştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.54.'de verilmiştir. Tüm özütlerin derişiminin artmasıyla, antioksidant aktivitelerinin de arttığı görülmektedir. *Lilium candidum* da en yüksek aktiviteye sahip, etil asetat ekstraksiyonu ile elde edilen özüt olup 800µg'nın inhibisyonu %83.24 olarak bulunmuştur. Sentetik antioksidantlar olarak kullanılan BHA (%92.22) ve α-Tokoferol (%93.65) ile karşılaştırıldığında bu değerinin standart antioksidanlara oldukça yakın olduğu görülmektedir.

Son zamanlarda, kararlı organik bir radikal olan 2,2-difenilpikrilhidrazil radikali (DPPH) mantar özütleri ve çeşitli yiyecek maddelerinin antioksidant aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntem DPPH radikalının alkolde hazırlanan çözeltilerinin bir hidrojen verici antioksidant madde varlığında radikal olmayan DPPH-H'a dönüşümünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. DPPH radikalının 517 nm'deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde antioksidant aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlenir. Tepkime mekanizması aşağıdaki şekilde gösterilebilir.



Belirli bir inkübasyon süresinden sonra kalan DPPH radikali derişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. DPPH radikalının rengindeki açılma antioksidant maddenin radikal temizleme aktivitesi olarak gösterilir. Yöntem hızlıdır. 30 dakikalık analiz süresi ve insan gücü açısından kolay olması nedeniyle daha çok tercih edilir.

Çizelge 4.9.'de görüldüğü gibi çalışılan konsantrasyon aralığında, her bir özütün artan miktarı ile DPPH serbest radikal giderim aktiviteleride artmaktadır. En yüksek inhibisyon sadece etil asetat ekstraksiyonu ile elde edilmiş özütte olduğu görülmektedir. Etil asetat özütün 800µg'ının antioksidant aktivitesi *Lilium candidum* da %81.86 tespit edilmiştir. Sentetik bir antioksidan olan BHA'nın antioksidant aktivitesi %81.64 ve α-Tokoferol'ün %81.64 olarak ölçülmüştür. Fenoller, hidroksil grupları içermeleri nedeniyle radikal yok etme yeteneğine sahip bileşiklerdir. Bu önemli bitki bileşenleri hidroksil gruplarından hidrojenlerini radikallere vererek kararlı fenoksil radikalleri oluştururlar ve antioksidant aktivitede önemli rol oynarlar. Bu yüzden bitki özütlerinin antioksidan kapasitelerinin tayininde fenolik bileşik miktarlarının belirlenmesi oldukça önemlidir.

Günümüzde, yapay maddelerden kaçışın artmasının doğal fenolik maddelerin önemini daha da artıracığı açıktır. Gıda, deri ve farmakoloji alanlarındaki kullanım olanakları yanında, insan sağlığı üzerine de önemli etkileri bulunan fenolik maddelerin etki mekanizmalarının anlaşılması ve teknolojik olarak kullanılabilme yollarının araştırılmasının önemli olduğu görülmektedir. Bu doğrultuda, fenolik maddelerce zengin olan meyve ve sebze endüstrisi atıklarının da

değerlendirilmesinde bu kaynakların kullanılmasını sağlayabilecek yeni tekniklerin üzerinde çalışılması ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılmasının önemli olduğu düşünülebilir.

Bu çalışmada Muğla ve çevresinde doğal olarak yetişen bilimsel adı *Lilium candidum* olan bitki türünden proteaz enziminin saflaştırılması, karakterize edilmesi, A, C, E ve B grubu vitaminleri, amino asit miktarı, fenolik bileşenleri, antioksidan kapasitesi ve uçucu aroma verici bileşenleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile elde edilen veriler sonucunda *Lilium candidum* bitkisinin kozmetik endüstrisi için çok önemli bir hammadde kaynağı olabileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

- Acar, M. İ., Gül, G. S., Örtel, E. (1996) *Türkiye’de kızılçam ormanlarından akma reçine üretiminde asit-pasta tahrik tekniğinin uygulanması esasları üzerine araştırmalar*, T. C. Orman Bakanlığı Ege Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Orman Bakanlığı yayın no: 25 teknik bülten no:5, İzmir.
- Altan, N. (2000) *Biyokimya Olgu Yaklaşımı*, Palme Yayıncılık, 69-74s, Ankara.
- Amarowicz, R., Shahidi, F. (1996) A rapid chromatographic method for separation of individual catechins for green tea. *Food Res. Int.*, 29: 71–76.
- Anggård, E., 1994. Nitric Oxide: Mediator, murderer and medicine. *Lancet*; 343: 1199-1206.
- Aruoma, O.I., Cuppet SL., (1997) *Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 241 s.
- Aydın, S.A. ve Üstün, F. (2007) Tanenler 1 Kimyasal Yapıları, Farmakolojik Etkileri, Analiz Yöntemleri, *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 33(1): 83
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman ve Samir,S. (2006) Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.*, 99: 191–203.
- Barrett, A.J., N. D., Rawlings, and Woessner, J. F. (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, San Diego, 3932 s.
- Baytop, T., Öztekin, A. (1984) Türkiye bitkisel katran çeşitleri üzerinde araştırmalar, *V. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, 15-17 Kasım, Ankara, 1:88s.
- Baytop, T. (1986) *Farmakognozi Ders Kitabı Cilt I*, İstanbul Üniv. Yay., İstanbul, 51s.
- Bilaloğlu, G. V. ve Harmandar, M. (1999) *Flavonoidler*, Aktif Yayınevi, İstanbul, 382s.
- Bingöl, G. (1983) *Biyokimya*, Güven Matbaası, Ankara, 285s.

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochem.*, 72: 248-254.
- Bruice, T. C., TH Fife, Bruno j. j., Brandon N. E. (1962) *Biochem.*, 1: 7.
- Bunchanan, B.B., Schurmann, P., Decottignies, P.T., Lozano, R.M. (1994) Perspectives in biochemistry and biophysics: thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in tecnology and medicine. *Archives of Biochem. and Biophy.*, 314: 257–260.
- Cemeroğlu, B. (2004) *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt*, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 725s.
- Ceylan, A. (1997) *Tıbbi Bitkiler (Uçucu Yağ Bitkileri) Cilt II*, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir, 124s.
- Chen, Y., Zheng, R., Zhongjian, J., Yong, J., (1990) Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic. Biol. and Medi.*; 9: 19–21.
- Cook, N.C., Samman, S. (1996) Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutr. Biochem.*; 7: 66-76.
- Coşkun, F. (2006) *Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular*, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 1. Cilt (2), 50s.
- Curtis, T., Williams, D. G. (1994) *Introduction to perfumery*, Ellis Horwood Press, New York., 221s.
- Çalkı, Ş. (1999) Bazı Su Ürünlerinde Proteolitik Enzim Aktiviteleri, *Tr. J. Of Veterinary and Animal Sciences*, 23: 385-390.
- Davis, P.H. (1984) *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*, Volume 8, Edinburg University Press, Edinburg
- deMan. J. M. (1999) *Principles of Food Chemistry*, An Aspen Publication, 3. baskı, Gaithersburg, Maryland, 522s.

- Demir, Y., Alayli A., Yıldırım, S., Demir, N. (2005) Identification of Protease from *Euphorbia Amygdaloides* Latex and It's Using in Cheese Producing, *Biochem. and Biotechnol.*, 35. 291–299.
- Dubey, V.K. and Jagannadham M. V. (2003) Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*, *Phytochem.*, 62 (7): 1057-1071.
- El-Gammal, S. Y. (1991) Extraction of volatile oils throughout history, *Hamdard Med.*, 34: 57-80.
- Ewans, W.C. (1989) *Trease and Evan's Pharmacognasy*, 13. Baskı, Bailliere Tindall, London.
- Fadıloğlu, S. (2001) Immobilization and characterization of ficin, *Nahrung/Food*, 45 (2): 143-146.
- Ferreira, I.C.F.R., Vaz, J.A., Vasconcelos, M.H., & Martins, A. (2010) Compounds from wild mushrooms with antitumor potential, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 10: 242–436.
- Fersht, A. (1985) *Enzyme structure and mechanism*, San Francisco, W. H. Freeman, 50 s.
- Frey, A. and Hegeman A. D. (2007) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, Oxford, 831s.
- Fridovich, I. (1986) Superoxide Dismutases, *Meth. Enzymol*; 58: 61-97.
- Glazer, A. N., Smith E. L. (1971) Papain and other sulfhydryl proteolytic enzymes, *The Enzymes*, Vol III, Boyer PD (Eds.), Academic Press., New York, 972s.
- Guenther, E. (1948) *The essential oils*, D. Van Nostrand Press, New York, 1253s.
- Güngör, N. (2007) *Dut Pekmezinin Bazı Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri İle Antioksidan Aktivitesi Üzerine Depolamanın Etkisi*, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 81s.
- Haliwell, B. (1994) Free Radicals and Antioxidants: A Personal View, *Nut. Reviews*; 52: 253-265.

- Harper, H. (1975) *Enzymes, Review of Physiological Chemistry*, Lange Medical Publications, California, Los Altos, 563s.
- Henry, J.P. (1984) Stephens-Larson P. Reduction of chronic psychosocial hypertension in mice by decaffeinated tea, *Hypertension*; 6: 437–444.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study, *Lancet*; 342: 1007–1011.
- Ho, C.T., Chen, Q., Shi-Zhang, K.Q., Rosen, R.T. (1992) Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas, *Preventive Medicine*; 21: 520–525.
- Ho, C.T., Chen, C.W., Wanasundara, U.N., Shahidi, F. (1997) *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications*. Champaign IL, AOCS Press, 223p.
- Hudson, B.J.F. (1990) *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science, London and New York, 316s.
- Husain, S.R., Cillard, J., Cillard, P. (1987) Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids, *Phytochem.*, 26: 2489–2491.
- Kafkas, E., Bozdoğan, A., Burgut, A., Türemiş, N., Paydaş Kargı, S., Cabaroğlu, T. (2006) Bazı Üzümsü Meyvelerde Toplam Fenol ve Antosiyanin İçerikleri, II. *Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu*, 14-16/Eylül, Tokat, 309-312.
- Kalisz, H. M. (1988) Microbial Proteinases, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 36: 1-65
- Karadoğan, T., Baydar, H., Özçelik, H. (2003) *Göller Yöresinde Lamiaceae Familyasına Dahil Bitki Türlerinin Tesbiti ve Tıbbi ve Aromatik Değerlerinin Belirlenmesi*, Proje No: TOGTAG 2599, Isparta.
- Karlson, P., Telefoncu, A. (1988) *Tıp ve Fen Bilimleri İçin Biyokimya*, Sermet Matbaası, 68 s.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö., İ. (2011) *Biyokimya*, Aktif Yayın Evi, İstanbul, 632s.

- Keskin, H. (1987) *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık Tic. Ltd. Sti, İstanbul, 652s.
- Koolman Jan, Röhm Klaus-Heinrich (2003) Renkli Biyokimya Atlası. Tavashlı Matbaacılık Ltd. Şti. Savaş Ciltevi, İstanbul, 435s.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-85.
- Larson, R.A. (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochem.*, 27: 969-978.
- Lawrence, B. M. (1995) The isolation of aromatic materials from natural plant products, *United Nations Industrial Development Organization*, Vienna, 154s.
- Lecaille, F., J. Kaleta. D., Brömme. (2002) *Chem. Rev.*, 102: 4459.
- Lehninger, A. L. (2005) *Principles of biochemistry*, Worth Publishers Inc., New York, 1152s.
- Limited, S., Hyderabad, L.B.N. (1996) Colorimetric determination of vitamin-A with 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde, *Indian J. of Pharm. Sci.*, 58(4): 171-3.
- Luo, M., Kannar, K., Wahlqvist, M.L., O'Brien, R.C. (1997) Inhibition of LDL oxidation by green tea extract, *Lancet*; 349: 360–361.
- MacDougall, D.B. (2002) *Colour in Food Improving Quality*, Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England, 378s.
- McIntosh, J. E. A. (1969) Carbonic anhydrase isoenzymes in the erthrocytes and dorsolateral prostate of the rat, *Biochem. J.*, 114 (3): 463-476.
- Miller, H.M. (1971) A simplified method for the evaluation of antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 48: 91.
- Moncada, S., Palmer, R., Higgs, E. (1991) Nitric Oxide Physiology, Pathophysiology and Pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, 43: 109-142.
- Nizamlioğlu, N.M. ve Nas, S. (2010) Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri, *GTED*, 1: 20-35.

- Onat, T., Emerk, K. (1997) *Temel Biyokimya*, Saray Medikal Yayıncılık, 2. Baskı, İzmir, 834s.
- Özata, A., Kutlu, M. (2000) *Enjimoloji Ders Notları*, T. C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No: 1254. Eskişehir, 112s.
- Packer, L., Cadenas, E. (2002) *Handbook of Antioxidants*, 2nd Edn., New York, Basel, USA, Marcel Dekker, 732s.
- Papas, A.M. (1996) Determinants of antioxidant status in humans, *Lipids*, 31: 77-82
- Pauling, L. (1973) *Die Natur der chemischen Bindung*, Chemie-Verlag, Weinheim, 523s.
- Pehlivan, M. ve Güteryüz, M. (2004) Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi, *Bahçe*, 33/(1-2): 51 – 57.
- Price, N. C. (1979) What is meant by 'competitive inhibition, *Trends in Biochem. Sci*, 4: 272.
- Rao, M. B., Tanksaie A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V. (1998) Moluculer and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbial Mol. Biol. Rev.*, 62, 597-635.
- Reische, D.W., Lillard, D.A., Eitenmiller, R.R. (2002) *Oxidation, Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, New York: Marcel Dekker Inc. 542s.
- Saldamlı, İ. (2007) *Gıda Kimyası*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 587s.
- Shahidi, F. ve Naczki, M. (1995) *Food Phenolics*, Technomic Publishing Company Book, Lanchester, USA, 331s.
- Shahidi, F. (2000) Antioxidants in food and food antioxidants, *Nahrung*, 44: 158–163.

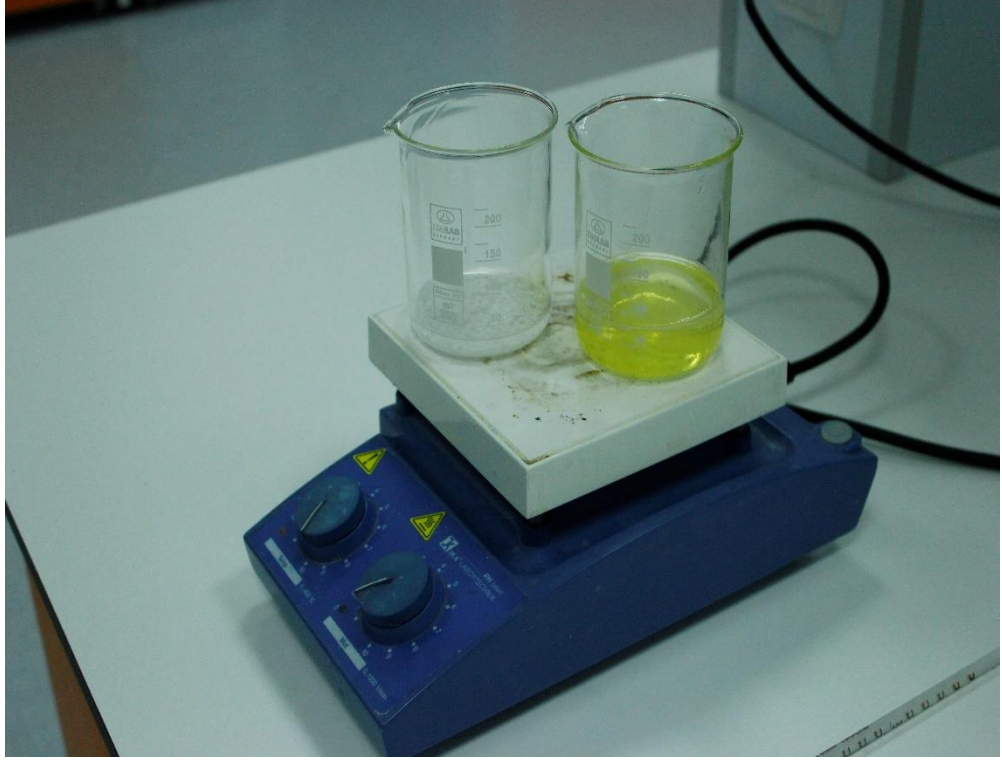
- Shahidi, F. (2002) Antioxidants in plants and oleaginous seeds, in Free Radicals in Food. Chemistry, Nutrition, and Health Effects, *ACS Symposium Series 807*, American Chemical Society, Washington, D.C., 162–175.
- Smyth, D.R., Kongsuwan, K. And Wisudharomn, S. (1989) A Survey of C-Band Patterns in Chromosomes of Liliium (Liliaceae), *Pl. Syst. Evol.*, 163: 53-69.
- Stampfer, M.J., Henneekens, C.H., Manson, J.E., Colditz, G.A., Rosner, B., Willet, W.C. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *New England J. Of Medicine*; 328: 1444–1449.
- Tanker, M., Tanker, N. (1990) *Farmakognozi*, Cilt 2, Ankara Üniv. Basımevi, Ankara, 354s.
- Taylor, M.J., Richardson, T. (1980) Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin. *J. of Food Sci.*, 30: 1223-1227.
- Tekman, S., Ömer, N. (1981) *Genel Biyokimya*, Fatih Yayınevi Matbaası, İstanbul, s.335
- Telefoncu, A. (1986) *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını Dergisi, İzmir, 446s.
- Temizkan, G., ve Arda, N. (2008) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 345s.
- Tepe, B., Eminağaoğlu, O., Akpulat, H.A., Aydın, E. (2007) Antioxidant Potentials and Rosmarinic Acid Levels of The Methanolic Extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm., *Food Chem.*, 100: 985–989.
- Tetik, S. (1996) *Cistus Laurifolius L. ve Cistus Parviflorus Lam. Uçucu yağlarının bileşimi*, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, 97s.
- Thapa, B. B. (1989) Extraction of essential oil, National Workshop on Chemical Investigation and Processing of Aromatic Plants, Nepal, s: 71-81.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentina, D.H., Waters, S.M. and Webb, D.A. (1980) *Flora Europaea*, Volume 5, Cambridge University Press, Cambridge, 550s.

- Tyler, V.E., Brady, L.R., Robbins, J.E. (1981) *Pharmacognosy*, Les&Febiger, Philadelphia, 674s.
- Varshney, S. C. (1993) Efficiency of steam distillation system for herbs, *Indian Perfumer*, 37: 63-67.
- Voet, D., Voet, J.G. (1995) *Biochemistry*, John Wiley & Sons. Press, New York, USA, 1756s.
- Von-Sonntag, C. (1987) *The chemical Basis of Radiation Biology*, London, Taylor & Francis, 596s.
- Wang, Z.Y., Huang, M.T., Lou, Y.R., Xie, J.G., Reuhl, K.R., Newmark, H.L., Ho, C.T., Yang, C.S., Conney, A.H. (1994) Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-initiated SKH-1 mice, *Cancer Res.*, 54: 3428–3435.
- Wijesekera, R. O. B. (1992) *Practical manual on: The essential oil industry, agrotechnology, processing, quality assesment*, Thailand Institute of Scientific and Technological Research Press, Viyana, Avusturya, 523s.
- Yalçındağ, O. N. (1965) *Eczacılıkta ekstraksiyon metotları ve bunlarla hazırlanan farmasötik preparatlar*, Berksoy Matbaası, İstanbul, 157s.
- Yamazaki E, Inagaki M, Kurita O, Inoue T. (2007) Antioxidant Activity of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum*) Fruit, *Food Chem.*, 100: 171–177.
- Zhang, G., Wang, H., Zhang, X., Ng, T. (2010) Helvellisin, a novel alkaline protease from the wild ascomycete mushroom *Helvella lacunosa*, *J. of Biosci. and Bioeng.*, 109: 20–24.

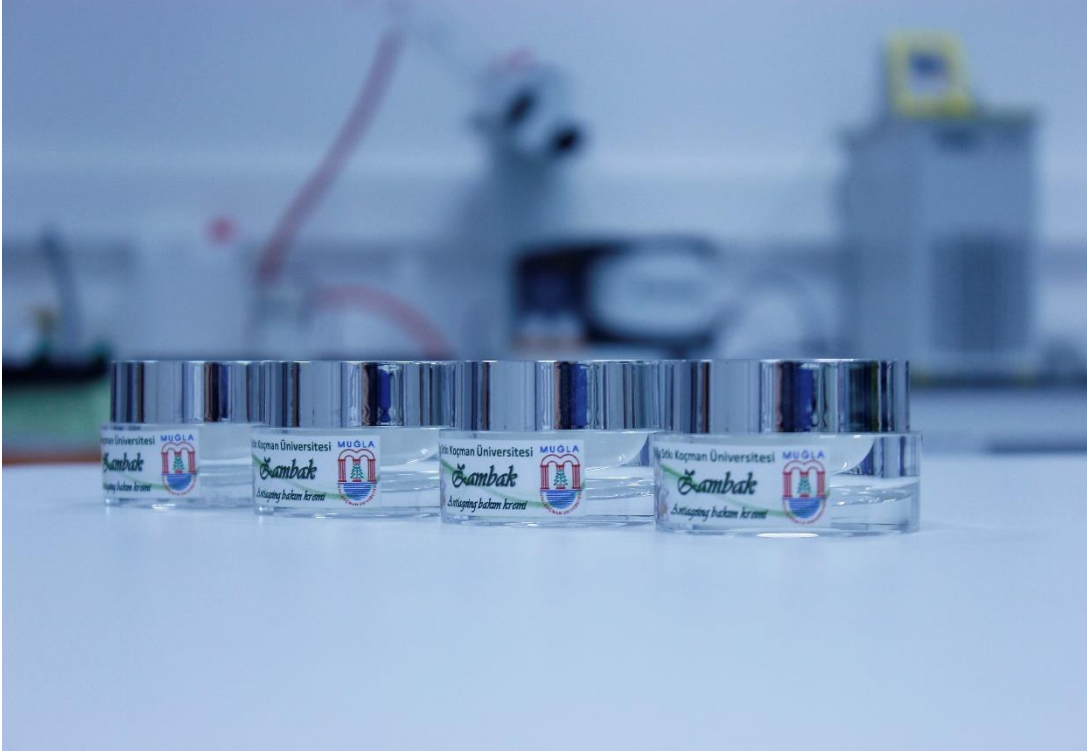
EKLER



Beyaz zambak (*Lilium candidum*) 50-130 cm' ye kadar boylanabilen, çok yıllık, dayanıklı soğanlı bir bitkidir. Çiçekleri huni şeklinde olup karbeyazı renginde ve 2-12 çiçeklidir. Yapraklar spiral dizilişli, parlak ve tüysüdür. Çiçekler keskin kokulu, soğan ise sarımsı beyaz renklidir. Kumlu ve taşlı topraklarda, yaprağını döken ağaçların bulunduğu taşlı orman alanlarında, otluk, yeşilli ve çimenli yerlerde, 10-1300 m'lerde yayılış gösterir. Çiçeklenme zamanı Mayıs ayıdır.



Doğadan toplanan mis zambağı çiçekleri çeşitli çözücülerde ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen özüt ile gerekli kimyasallar karıştırılarak mis zambağı çiçek özü içeren cilt bakım ürünü elde edildi.



Mis zambağı çiçeği özü içeren cilt bakım kremi.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Ceyhun IŞIK
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: 21/12/1987
Medeni Hali : Evli
Telefon : 0 555 651 36 39
E-posta : ceyhunisik@mu.edu.tr

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Tayfur Bayar Lisesi (YDA)	2006
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2011
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2014

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2011-	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	Arş. Görevlisi

Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama		X	
Okuma			X

Bilimsel Faaliyetler

1. Kozmetik Kimyası Yaz Okulu-II Düzenleme Kurulu Üyeliği, 26-30 Ağustos 2013, Muğla

Yayınlar

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Kongre Kitabında Basılan Bildiriler

Işık C., Kıvrak İ., Demir Y., Harmandar Y., Demir N., Beyaz Zambak (*Lilium Candidum L.*) Çiçeğinde Kozmetik Amaçlı Kullanım İçin Bazı Enzim, Antimikrobiyal , Vitamin Ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması, 2012, 26. Ulusal Kimya Kongresi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Işık C., Demir N., Uçkaya F., Demiray A., Demir Y., Bataklık Süseni (*Iris Pseudacorus*) Bitkisinin Çiçeğinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu, 2012, 26. Ulusal Kimya Kongresi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Demir N., Işık C., Demir Y., Uçkaya M., Yer Elmasından (*Heliantus Tuberosus*) Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Tanımlanması Ve Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Pestisitlerin Etkisinin İncelenmesi, 2013, XIII. Ulusal Spektroskopi Kongresi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur

Işık C., Kıvrak İ., Demir N., Demir Y., Kantaron (*Hypericum Perforatum*) Bitkisinin Esansiyal Yağ Kompozisyonu Ve Aroma Verici Uçucu Organik Bileşiklerinin Belirlenmesi, 2013, 3.Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, Kimyagerler Derneği, 2013, Antalya

Hobiler

1. Fotoğrafçılık