

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PSEUDEVERNIA FURFURACEA LİKEN TÜRÜ ÜZERİNE
FİTOKİMYASAL BİR CALIŞMA

Çiğdem ÖCAL

Danışman
Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2016



© 2016 [Çiğdem ÖCAL]

TEZ ONAYI

Çiğdem ÖCAL tarafından hazırlanan "***Pseudevernia furfuracea* Liken Türü Üzerine Fitokimyasal Bir Çalışma**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU**
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Tahir TİLKİ**
Süleyman Demirel Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Mehmet Sabih ÖZER**
Celal Bayar Üniversitesi

Enstitü Müdürü **Doç. Dr. Yasin TUNCER**

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Çiğdem ÖCAL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Likenler ve Likenlerin Genel Özellikleri	4
2.1.1. <i>Pseudevernia furfuracea</i> likeni	4
2.2. Likenlerin Kullanım Alanları	5
2.2.1. Likenlerin tıbbi alanda kullanımı.....	5
2.2.2. Likenlerin diğer kullanım alanları.....	6
2.2.3. Likenlerle ilgili kaynak özetleri	6
2.3. Enzimler ve Özellikleri	8
2.3.1.Enzimlerin üretim kaynakları	9
2.3.1.1. Bitkisel kaynaklı enzimler	10
2.3.1.2. Hayvansal kaynaklı enzimler	10
2.3.2. Kolinesterazlar	10
2.3.2.1. Kolinesteraz inhibitörleri ve Alzheimer hastalığı (AH)	11
2.3.3. Tirozinazlar	11
2.3.3.1. Tirozinaz enzimi üzerine klinik çalışmalar.....	12
2.3.3.1.1. Vitiligo belirteci.....	12
2.3.3.1.2. Kanser tedavisi.....	12
2.3.3.1.3. Antioksidan rolü	12
2.3.4. α -Amilaz ve α -glukozidaz enzimleri	13
2.3.4.1. Diyabet tip 2.....	13
2.4. Antioksidanlar ve Genel Özellikleri	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Bitkisel materyallerin toplanması.....	15
3.2. Çözücü Özütlerinin Hazırlanması.....	15
3.2.2. Enzim inhibisyon kapasite tayin yöntemleri.....	16
3.2.2.1. Kolinesteraz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi	16
3.2.2.2. Tirozinaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi	16
3.2.2.3. α -Amilaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi	17
3.2.2.4. α -Glukozidaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi.....	17
3.2.3. Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi.....	18
3.2.4. Toplam flavonoit bileşik miktarının belirlenmesi.....	18
3.2.5. Bitki özütlerinin RP-HPLC ile fenolik içeriklerinin belirlenmesi.....	18
3.2.6. Antioksidan kapasite tayin yöntemleri.....	19
3.2.6.1. Fosfomolibdenyum yöntemiyle toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi	19
3.2.6.2. DPPH serbest radikal süpürüm aktivitenin belirlenmesi	19
3.2.6.3. CUPRAC testiyle indirgeme gücünün belirlenmesi.....	20

3.2.6.4. FRAP testiyle indirgeme gücünün belirlenmesi	20
3.2.6.5. Şelatlama kapasitesinin belirlenmesi	20
3.7. İstatistiksel Hesaplamalar	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	22
4.1. Özütlerinin toplam fenolik ve flavonoit içeriklerinin belirlenmesi	22
4.2. Özütlerinin HPLC ile fenolik ve flavonoit içeriklerinin belirlenmesi.....	23
4.3. Özütlerinin Enzim İnhibisyon Aktivitelerinin Belirlenmesi	26
4.1. Özütlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	34
KAYNAKLAR	35
EKLER.....	43
EK A. Standart Fenoliklerin RP-HPLC Kromatogramları.....	45
EK B. <i>Pseudevernia furfuracea</i> Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları	46
ÖZGEÇMİŞ.....	48



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***PSEUDEVERNIA FURFURACEA* LİKEN TÜRÜ ÜZERİNE FİTOKİMYASAL BİR ÇALIŞMA**

Çiğdem ÖCAL

**Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU

Bu çalışmada, *Pseudevernia furfuracea* (L) Zopf likeninin metanol ve su özütlerinin in vitro antioksidan ve enzim inhibisyon aktiviteleri araştırıldı.

1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) serbest radikal süpürüm, Cu(II) iyon indirgeme (CUPRAC), metal şelatlama ve fosfomolibdenyum testlerinde, metanol özütlerinin su özütlerine oranla daha yüksek aktivite gösterdiği belirlendi. Su özütü FRAP testinde en yüksek aktivite sergiledi (105.97 mg troloks eşdeğer (TEs)/g özüt).

Her iki özüt de kolinesterazlar üzerine zayıf inhibisyon aktivite gösterdi. Su özütü en yüksek trozinaz inhibisyon aktivite sergiledi (7.46 mg kojik asit eşdeğer (KAEs)/g özüt). Metanol özütünün α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerine inhibisyon aktiviteleri sırasıyla; 3.46 ve 2.52 mmol akarboz eşdeğer (ACEs)/g özüt olarak tespit edildi.

Metanol özütünün hem fenolik hem de flavonoit bileşik açısından zengin olduğu görüldü. Aynı zamanda, metanol özütünde kayda değer miktarda hesperidin ve kamferol belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Pseudevernia furfuracea*, antioksidan aktivite, DPPH, CUPRAC, FRAP, fenolik bileşik, HPLC, hesperidin, kamferol

2015, 47 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

A PHYTOCHEMICAL STUDY ON LICHEN *PSEUDEVERNIA FURFURACEA*

Çiğdem ÖCAL

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa CALAPOĞLU

The in vitro antioxidant and enzyme inhibitory activities of methanol and water extracts of *Pseudevernia furfuracea* (L) Zopf were evaluated.

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging, cupric ion reducing (CUPRAC), metal chelating and phosphomolybdenum assays identified the methanol extract as superiority to the water extract. The water extract had the highest ferric reducing antioxidant power (FRAP) activity (105.97 mg trolox equivalents/g extract).

The extracts showed weak inhibitory activity on cholinesterases. The water extract exhibited the highest tyrosinase inhibitory activity (7.46 mg kojic acid equivalent/g extract). The inhibitory activities of the methanol extract on α -amylase and α -glucosidase were 3.46 and 2.52 mmol acarbose equivalent/g extract respectively.

The methanol extract was rich in both phenolic and flavonoid compounds. The methanol extract also contained considerable amounts of kaempferol and hesperidin.

Keywords: *Pseudevernia furfuracea*, antioxidant activity, DPPH, CUPRAC, FRAP, HPLC, , phenolics, HPLC, hesperidin, kamferol

2016, 7 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU, Doç. Dr. Cengiz SARIKÜRKÜ ve Dr. Mehmet Sefa KOÇAK'a,

Laboratuvar çalışanlarının bir kısmının yapılmasındaki katkılarından dolayı Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK, Arş. Gör. Dr. Gökhan ZENGİN ve Doktora öğrencisi Ramazan CEYLAN'a,

Pseudevernia furfuracea liken örneklerini toplayan Arzen Kozmetik işletmecisi Sayın Mustafa BERBER beyefendiye,

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan değerli aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Çiğdem ÖCAL
ISPARTA, 2016

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. <i>Pseudevernia furfuracea</i> likeni çözücü özütlerinin toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktarları.....	22
Şekil 4.2. <i>Pseudevernia furfuracea</i> likeni çözücü özütlerinde bulunan fenolik ve flavonoit bileşiklerin kimyasal yapıları.....	25
Şekil 4.3. Asetil/bütiril kolinesteraz metabolizması.....	26
Şekil 4.4. Asetil/bütiril kolinesteraz enzim mekanizması	27
Şekil 4.5. <i>Pseudevernia furfuracea</i> likeni çözücü özütlerinin asetil/bütiril kolinesteraz ve tirozinaz enzimleri inhibisyon aktiviteleri.....	27
Şekil 4.6. Tirozinaz enzim mekanizması.....	28
Şekil 4.7. <i>Pseudevernia furfuracea</i> likeni çözücü özütlerinin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri inhibisyon aktiviteleri	29
Şekil 4.8. <i>Pseudevernia furfuracea</i> likeni çözücü özütlerinin fosfomolibdenyum yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan aktiviteleri	31
Şekil 4.9. <i>Pseudevernia furfuracea</i> likeni çözücü özütlerinin DPPH radikal süpürüm ve metal şelatlama aktiviteleri	32
Şekil 4.10. <i>Pseudevernia furfuracea</i> likeni çözücü özütlerinin CUPRAC ve FRAP testleriyle indirgeme gücü kapasiteleri	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4.1. <i>Pseudevernia furfuracea</i> likeni çözücü özütlerinin HPLC ile belirlenen fenolik ve flavonoit bileşik içerikleri	24



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACEs	Akarboz eşdeğer
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
dk	Dakika
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTAEs	Etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu eşdeğer
FCR	Folin-Ciocalteu Reaktifi
GAEs	Gallik asit eşdeğer
GALAEs	Galantamin eşdeğer
KAEs	Kojik asit eşdeğer
m	Metre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
REs	Rutin eşdeğer
RP-HPLC	Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi
TEs	Troloks eşdeğer
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Günümüzde doğal kaynaklı bileşiklere verilen önem gün geçtikçe artmaktadır. Bu doğal kaynaklı bileşiklerin bir kısmı ise bitkiler tarafından sentezlenen moleküllerdir. Bu moleküller mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak rol oynarlar. Bu sebeple de ikincil bitki ürünleri veya fitokimyasal bitkiler olarak adlandırılır. (Cömert, 2012). Halk arasında yıllardan beri bitkiler tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Bazı bitkiler antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, antitümör gibi etkilerinin olduğu bilinir. Bu bitkiler de tıbbi bitkiler olarak adlandırılır. Son yıllarda yapay (sentetik) kökenli ilaçların yan etkilerinin daha fazla olması sebebiyle tıbbi bitkilere önem daha da artmıştır. (Nakipoğlu ve Otan, 1992). Günümüzde bitkilerden elde edilen ve ilaç olarak kullanılan bazı ikincil metabolitler vardır. Bunlardan; ; Taksol 1967 yılında porsuk ağacından elde edilmiştir ve göğüs, akciğer kanseri tedavilerinde kullanılmaktadır. Söğüt ağacı kabuklarından bir glikozit olarak elde edilen salisin; asetilsalisilik asit olarak sentezlenmiştir. (Rinsema, 1999). Asetilsalisilik asit ise günümüzde aspirin içerisinde bulunmaktadır ve romatizma ve kalp hastalıkları tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde medikal olarak ağrı kesici olarak kullanılan morfin haşhaştan elde edilmiştir. (Sertürner, 1805; Yavaşoğlu, 2012).

Bir bitkinin ilaca dönüşmesinden önce üzerinde biyolojik çalışmalar yapılmaktadır ve daha sonrasında iyileştirici etkene sahip olan saf bileşen elde edilmeye çalışılır. Bu zaman sürecinde biyolojik olarak ilk önce nitel tayin yöntemleri uygulanır. Bu tayinler özellikle hızlı tayinler olarak belirlenir. Çünkü çok sayıda numuneye uygulamamız gerekmektedir. Sonraki analizlerin birinci amacı ise çok sayıda klinik denemede kullanılacak model sistemler ve öncü bileşikler bulmaktır. Yapılan bu analizlerde numune miktarı çok azdır, maliyeti yüksektir, oldukça hassastır ve zorlu analizlerdir. Bu sebepledir ki tek bir bileşeni elde etmek dahi haftalar hatta aylar sürebilir. (Rahman vd., 1999; Yavaşoğlu, 2012).

Bitkilerle tedavi çok eski tarihlere dayanır. Yunan tıpçılar yazdıkları kitapta 400'e yakın bitkisel ilaçtan bahsetmişlerdir. Bizans döneminde ise 'ilaçlar

Bilgisi' kitabı yazılmıştır. Bu kitapta tıbbi bitkiler hakkında bilgilere yer verilmiştir (Dubick, 1986; Başak, 2008). Bitkilerle tedavi edilebilme yöntemi ise "fitoterapi" olarak adlandırılır. Bu terim ilk kez 1870'li yıllarda kullanılmış, 19. yüzyılın ikinci yarısına kadar ilaç yapımında kullanılan en büyük kaynak bitkiler olmuştur (Gilani ve Rahman, 2005; Dasgupta ve Bernard, 2006; Başak, 2008). Son zamanlarda sentetik ilaçların ciddi yan etkilerinden dolayı oluşan ekonomik ve medikal problemler, ekolojik dengesizlikler, tedavileri mümkün olmayan birçok kronik hastalığın oluşturduğu tehditler, yan etkisi olmayan gibi düşünceler bitkisel tedavi tekrar popüler hale gelmiştir (Zhang, 2002; Dooley, 2007; Kemper ve Shannon, 2007; Başak, 2008). Ancak doğal olan bitkilerin her zaman güvenli olduğu düşüncesi doğru değildir. Çünkü çoğu bitki yüksek derecede toksiktir. Fitoterapinin yan etki ve toksite yönünden riski diğer yöntemlere göre daha fazladır (Ikegami vd., 2006; Başak, 2008).

Eskiden beri, hastalıkların tedavisinde dekoksasyon ya da infuzyon olarak kullanımı bilinen likenlerin, günümüzde mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıklara karşı antibiyotik etki yapan sekonder metabolitlerinin üzerine araştırmalar yoğunlaşmaktadır. Likenlerin sahip olduğu bu antimikrobiyal etkilerin de, yapılarında buldukları asit karakterdeki metabolitlerden kaynaklandığı tespit edilmektedir (Odabaşoğlu, 2001). Likenlerdeki sekonder metabolitlerin, enfeksiyona yol açan böcek, salyangoz, bakteri ve funguslara karşı genel biyosidler olarak veya zararlı seviyedeki güneş ışınlarına karşı koruyucu olarak rol aldığı düşünülmektedir. Bir kısmı antibiyotik ve kansorejen drog olarak test edilmiştir ve hala çalışmalara devam edilmektedir (Çobanoğlu 2012).

Çeşitli kullanım alanları bulunan ve geçmişten beri tıbbi önemleri bilinen likenlerin antioksidan ve enzim inhibitör aktiviteleri üzerine ülkemizde yapılan çalışmalar oldukça yetersizdir. Bu çalışmada, *Pseudevernia furfuracea* liken türünün fitokimyasal ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf liken türünün metanol ve su özütlerinin antioksidan ve antiradikal aktivitelerine ek olarak özellikle Alzheimer hastalığının tedavisinin belirlenmesinde kullanılan antikolinesteraz,

cilt-deri rahatsızlıklarına yönelik antitirozinaz ve diyabet hastalıklarının tedavisine yönelik antidiyabetik (anti α -amilaz ve anti α -glukozidaz) aktivitelerinin de tespit edilmesi; ayrıca özütlerin fenolik bileşik içeriklerinin HPLC ile belirlenmesi de hedeflenmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Likenler ve Likenlerin Genel Özellikleri

Mantarların alglerle birleşmesiyle oluşturdukları morfolojik ve fizyolojik birlikler; likenler olarak adlandırılır. Likenler, mikobiyont (mantar) ile fotobiyontun (fotosentetik yeşil alg ve/veya siyanobakteri) oluşturdukları kararlı ve sürekli ototrofik mutualistik birliklerdir. Liken birliklerinde yer alan mantar algi hayatta kalmak, büyümek ve üremek için gerekli olan karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Alg, fotosentez için gereken mineral ve suyu mantardan sağlamaktadır ve ayrıca yüksek sıcaklık, zararlı ışınlar, yüksek nem gibi olumsuz koşullara karşı mantar tarafından korunmaktadır. Mantarlar bu birliktelikten daha fazla fayda sağlamaktadır. Alg ise serbest yaşayan formlarına göre daha zayıf gelişmektedir. (Özenoğlu vd., 2013; Şirin, 2015).

Likenler, sporla üremeleri sebebiyle mantarlara yakınlık gösterir ve mantarlar grubunun sonlarında yer alan bir gruptur. Likenlerin yaklaşık 20 bin türü bulunmaktadır ve kutuplardan çöllere kadar yeryüzünün her yerinde ve özellikle de havası temiz habitatlarda yaşamaktadırlar. En zor şartlara dayanıklıdırlar. Uzun ömürlüdürler fakat çok yavaş büyürler. (Çobanoğlu 2012; Şirin 2015).

2.1.1. *Pseudevernia furfuracea* likeni

Likenler, bitkilerin alt grubunun büyük çoğunluğunu oluştururlar. Mantar ve fotobiyonlardan oluşan organizmalardır. Liken türleri yaklaşık 25.000'i bulmaktadır ve kutuplardan tropik bölgelere, ovalardan en yüksek dağlara kadar yaşama alanları geniştir. Sert yaşama şartları, yavaş büyüme, birkaç bin yıla kadar kullanım ömürleri vardır. 1059 farklı liken türünün yapıları aydınlatılmıştır. Tallus yapraksı, substrata paralel gelişimi vardır. Üst yüzeyi grimsi-yeşil, belirgin ve çok sayıda silindirik formlu izidli, alt yüzey koyu grimsi siyah bir likendir. (Öz vd., 2013) . Tallus 10 cm'ye kadar şerit halindedir. 1-4 cm arası lop genişliğine sahiptir. Üst yüzeyleri gri-beyaz tonlarında olmasına rağmen merkeze doğru siyah renkte bulunurlar. Alt yüzeyleri ise kanallı

yapıdadır. Uçlar kahverengi-beyaz veya pembemsi renklidirler (Hocaoğlu, 2011).

2.2. Likenlerin Kullanım Alanları

2.2.1. Likenlerin tıbbi alanda kullanımı

Tıbbi ilaçların yanı sıra geleneksel ilaçlar olarak özellikle Çin'de kullanılmaktadır. Çeşitli liken bileşikler antivirütik, antibakteriyel, mantar öldürücü, antioksidan, ateş düşürücü, anti-tümör etkileri görülmüştür. Eski zamanlardan beri, bu etkileri tespit edilmiştir. İnsan ve hayvanlarda; dış yaralar, yanıklar, gastrit, soğuk algınlığı, astım, tüberküloz tedavisi için geleneksel ilaçlar olarak yararlanılmaktadır. (Mitrovic ve Stamenkovic, 2014). Örneğin; liken *Pseudevernia furfuracea* eski bir tonik, , anti-astım, solunum şikayetleri için bir kaynatma ve yara iyileştirici krem hemoroid, egzama tedavilerinde kullanılmıştır. (Bilgin vd., 2012; Güvenç vd., 2012; Mitrovic ve Stamenkovic, 2014). Tarih boyunca *Pseudevernia furfuracea* likeni büyük miktarlarda işlenmiştir. Bir koruyucu olarak; sabun, kozmetik kokuları, ekmek yapımında besleyici olarak kullanılmıştır. (Joulain ve Tabacchi, 2009; Mitrovic ve Stamenkovic, 2014) .

Ağız, mide, bağırsak, burun, kulak ve deri mantarları, ayrıca sistemik mantar enfeksiyonlarında kullanılır. Saçları güçlendirmede, idrar yolu sorunlarında, kırılan kemiklerin tedavisinde kullanılmıştır. *Usnea(motyka)* cinsi kullanılan likenlerin önemli kısmını oluşturmaktadır. *Bryoria Brodo-D.Hawksw.* cinsi eski zamanlarda antibiyotik olarak yeni doğmuş bebeklerin göbeklerine sürülmüştür. Günümüzde ise sindirim sistemine iyi geldiği gerekçesiyle şişkinlikler için kullanılmaktadır. *Letharia vulpina* (L.) Hue türü egzama ve derideki kırmızı döküntüler üzerine, iltihaplı bölgenin üzerine iltihabı kurutmak için sürülür. *Lobaria quercizans* Michx. tüberküloz tedavisinde, saçları güçlendirmede, astım gibi akciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Mide ağrılarına iyi gelmektedir. *Parmelia Ach.* cinsine ait türler karın ağrısında, böbrek ve omurga bölgesine de sürüldüğü zaman idrar yollarını rahatlatır. *Peltigera* Willd. cinsi yanıklara uygulanmakta, acıyı azaltmaktadır. Bacaktaki

çürüklere ve eziklere sürülmektedir. Kanamayı durdurmakta, antiseptik olarak kullanılmakta ve süt içinde kaynatılarak ağız yaralarının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca karaciğer bozuklukları ve sarılık tedavisinde rol oynamaktadır. Özellikle kuduz gibi hastalıkları önlemek için yapılan ilaçların hammaddesidir. Süt içinde kaynatılarak ağız yaralarının tedavisinde kullanılmaktadır. *Peltigera canina* (L.) Willd. hidrofobiye iyi geldiği sanılmaktadır. Ayrıca karaciğer bozuklukları ve sarılık tedavisinde rol oynamaktadır. Özellikle kuduz gibi hastalıkları önlemek için yapılan ilaçların hammaddesidir (Dilsizoğlu vd., 2004; Şirin, 2015).

2.2.2. Likenlerin diğer kullanım alanları

Parfümeri, kozmetik ve boya sanayiinde, turnusol kağıdı yapımında, deri tabaklamada, çelenk süslemelerinde, bazı tahıllı içkilerin fermentasyonunda, şilte, çorap, bandaj yapımında, beslenmede, izolasyonu sağlamada, sigara yapımında yanıcı madde olarak farklı özellikleri ön plana çıkan çeşitli likenler kullanılmaktadır. (Dilsizoğlu vd., 2004; Şirin, 2015).

2.2.3. Likenlerle ilgili kaynak özetleri

Türkiye’de Artvin yöresinden toplanan *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria* ve *Ramalina polymorpha* likenleri üzerine yapılan bir çalışmada, bu türlerin metanol özütlerinin fenolik içeriklerinin %0.8-3.0 arasında değiştiği ve DPPH radikal süpürüm aktiviteye sahip olmadıkları rapor edilmiştir (Gulluce vd., 2006).

Yine Artvin yöresinden toplanan *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Evernia prunastri* ve *Neofuscella pulla* likenleri üzerine yapılan bir çalışmada likenlerin metanol özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarlarının %1.5-3.0 arasında değiştiği ve *Dermatocarpon miniatum* likeni hariç diğer liken örneklerinin DPPH radikal süpürüm aktiviteye sahip olmadıkları tespit edilmiştir (Aslan vd., 2006).

Türkiye-Mersin ilinden toplanan, *Squamarina lentigera* (Weber) Poelt. liken türlerinde bulunan usnik asit konsantrasyonunun antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması üzerine yapılan çalışmada, usnik asit ekstraktının *Bacillus megaterium* ve *Bacillus subtilis* bakteri türlerini inhibe edici etkisi belirlenmiştir (Cansaran-Duman ve Halıcı, 2012).

Nepal'in üç farklı bölgesinden toplanan, yirmi bir liken türünün hepsinin metanol ekstraktlarının *Bacillus cereus* türüne karşı, yedi liken türünün metanol ekstraktlarının *Staphylococcus aureus* türüne karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu bulunmuştur (Paudel vd., 2012).

Sırbistan'dan toplanan, *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise ex Duby liken türünün metanol ve kloroform ekstraktların analizi sonucunda baskın fenolik bileşik olarak depsidon ve salazinik asit bulunmuştur ve sekiz straine karşı önemli antimikrobiyal aktivite gözlenmiştir (Manojlovic vd., 2012).

Hindistan'dan toplanan *Parmelia* sp. ve *Dermatocarpon* sp. Eschw. likenlerinin *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* patojenik klinik izolatlarına karşı antibakteriyel aktivitesi ölçülmüş ve metanolik ekstraktının *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarına karşı inhibe edici etkisi olduğu saptanmıştır (Sharma vd., 2012).

Kuzey Amerika-Kaliforniya bölgesinden toplanan, *Ramalina menziesii* Tayl. ve *Usnea lapponica* Vain. liken türlerinden elde edilen ekstraktların *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) türlerine karşı inhibe edici etkisi belirlenmiştir (Shrestha ve Clair, 2013).

Hindistan-Kodaikanal ormanından toplanan *Parmotrema* genusuna ait liken türlerinin, metanol ekstraktının en yüksek antibakteriyel aktivitesi *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerinde gözlenirken, en güçlü antifungal etki *Ganoderma* ve *Fusarium* cinsi üzerinde bulunmuştur (Ritika ve Jayanthi, 2013).

Hindistan-Maharaşta bölgesinden toplanan, *Usnea ghattensis* Awasthi liken türünün etanol ekstraktı *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türlerinde etkiliyken, metanol ve aseton ekstraktı *Staphylococcus aureus* bakterisinde etkili olduğu 16 saptanmıştır. Sadece metanol ekstraktı *Streptococcus faecalis* bakterisinde aktivite göstermiştir (Srivastava vd., 2013).

Sırbistan-Niş bölgesinden toplanan, *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale ve *Parmelia sulcata* Taylor likenlerinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan çalışmada tek çözücü olarak kullanılan metanolün tüm ekstraktlarının antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (Stojanovic vd., 2013).

Hindistan-Uttarakhand-Nainital bölgesinden toplanan, *Parmotrema nilgherrense* (Nyl.) Hale likeninin aseton, metanol, etil asetat, benzen ekstraktlarının ilaç dirençli patojenlere karşı yapılan deneylerinin sonucunda en yüksek antimikrobiyal etki etil asetat ekstratında gözlenmiştir (Javeria vd., 2013).

Kuzeydoğu Brazilya'dan toplanan, *Cladonia verticillaris* (Hoffm.) Schaer. likeninin bakterisidal etkisi Gram pozitif bakteri olan *Bacillus subtilis* türünde, bakteriyostatik etkisi Gram negatif bakteri olan *Escherichia coli* türünde, anti-fungal etkisi dermatofit fungus olan *Trichophyton rubrum* türünde bildirilmiştir (Brito Marques Ramos vd., 2014).

2.3. Enzimler ve Özellikleri

Hücre içinde ve hücre dışında biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve de genelde yapıları protein yapısı olan biyolojik makromoleküller enzim olarak adlandırılır. Enzimlerin hücrelerde önemli metabolik görevleri olmasına ilaveten değişik amaçlar için günlük hayata da girmiştir. Gıda endüstrisinde ekmek, bira, peynir vb. gıdalarda kullanılmasıyla birlikte deterjan ve temizlik malzemelerinde de yaygın bir şekilde kullanılırlar. Tıpta teşhis ve tedavide, biyolojik savaşlarda kullanılmaktadır. (Bailey ve Ollis, 1997; Çınar,2007). Enzim terimi ilk kez 1878 yılında Kuhne tarafından kullanılmıştır. 1897 yılında ise Eduard Buchner hücrelerden fonksiyonel enzimleri ekstrakte etmiştir. (Paulo ve

Gubitz, 2003). Enzimler mikroorganizmalardan elde edilir. Bunun nedeni ise bitkisel ya da hayvansal kaynaklı enzimlere göre yüksek katalitik aktivitelerinin olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmalarıdır. (Wiseman, 1987; Çınar, 2007).

Enzimler katalizör olarak aşağıdaki özellikleri gösterirler:

- Genelde 20-40 derece arasında ve pH aralıklarında ılımlı koşullar altında kullanılırlar.
- Katalizlenen tepkimelerde stereoseçimli, substrat için yüksek seçimli olabilirler.
- Katalitik aktiviteleri olan substratlar, ürünler ve diğer bileşenlerin derişimleriyle önemli ölçüde etkilenebilir.
- Uzun üretim süreleri vardır. Kararsız, yüksek fiyatlı, substrat seçimlilikleri, sentetik kimyada enzimlerin katalizör olarak kullanımlarındaki önemli sorunlardır.

Bununla birlikte, kimya-biyolojideki yeni gelişmeler, yeni endüstriyel gereksinimler ile bu anlayış değişmektedir.

Günümüzde 25.000 enzim var olduğu tahmin edilmektedir ve bunların 4.000 tanesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (TUBMB) tarafından sınıflandırılmıştır. Çoğunluğu hidrolazlar, transferazlar ve oksidoredüktazlar olmak üzere yaklaşık 400 tanesi araştırmalar için ticari olarak üretilmektedir. Enzimler arasında hidrolazlar, endüstriyel alanda sıkça başvuru ve kullanılan enzim sınıfıdır. (Kapucu, 2003; Çınar, 2007).

2.3.1.Enzimlerin üretim kaynakları

Enzim üretimi fermentasyon teknikleriyle uygun küf, maya ve bakteri türleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. (Adams ve Moss, 1995; Ray, 1996; Fadiloğlu ve Erkmen, 1999; Türker, 2014). Enzimler mikroorganizma yanı sıra bitkisel ve hayvansal kaynaklı da olabilmektedir. (John, 1987; Türker, 2014).

2.3.1.1. Bitkisel kaynaklı enzimler

Biyolojik enzimler; güvenilirliği tespit edilmiş, toksik olmayan ve yenilebilir bitkilerden elde edilebilmektedir. (John, 1987; Türker, 2014). Bitkisel kökenli enzimlere papain, bromelain ve ficin, soya fasulyesi lipoksigenazı ve tahıl amilolitik enzimleri örnek olarak gösterilebilir Bitkisel kökenli enzim kullanımı; toprak işleme etkinliği, gelişim döngüsü ve iklim gibi faktörlere bağlıdır. Ayrıca uluslararası kuruluşların tarımsal yaklaşımları da bitkisel kökenli enzim ticaretinde önemli bir etkidir. (Godfrey ve West, 1996; Türker, 2014).

2.3.1.2. Hayvansal kaynaklı enzimler

Bu enzimler insan yiyecek ürünleri hazırlamada uzun yıllardır kullanılır. Genellikle tavuk yumurtasının beyazı, pankreas, domuz midesi, geviş getiren hayvanların karın bölgesi gibi yenilebilen organlardan izole edilmektedir. (John, 1987; Türker,2014). Hayvansal kökenli enzimlere pankreatik lipaz, pankreatik proteaz, pepsinler, pregastrik esterazlar ve rennetler örnek verilebilir. Hayvansal enzimlerin üretiminde, hayvanları yetiştirmeyi kontrol eden ulusal kuruluşların izledikleri politikalar önemli rol oynamaktadır. Hayvansal hastalık vb. gibi risklerin engellenmesi sebebiyle hayvansal kökenli enzim üretimi kısıtlanmıştır. Bu sebeple bitkisel kaynaklı enzimler daha önemli hale gelmiştir. (Godfrey ve West, 1996; Türker, 2014).

2.3.2. Kolinesterazlar

Asetilkolinesteraz (AChE; asetilkolin asetil hidrolaz) ve bütirilkolinesteraz (BChE, açilkolin açil hidrolaz) farklı genlerle kodlanmasına rağmen substrat seçicilikleri ve mekanizmalardaki farklılıkları sebebiyle birbirinden ayrılan enzimlerdir. Asetilkolinesterazın fizyolojik işlevinin sinapslarda, bütirilkolinesterazın gerçek fizyolojik işlevi araştırılmakta ve karaciğer, akciğer, böbrek gibi dokularda bulunduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmada, kolinesteraz inhibitörü olarak bilinen donepezil türevi incelenmesi hedeflenmektedir. (Özer, 2012).

2.3.2.1. Kolinesteraz inhibitörleri ve Alzheimer hastalığı (AH)

Alzheimer hastalığı tam olarak etiyolojisi bilinmeyen; bir deyişle geri dönüşü olmayan sinir hücresi kaybı veya kolinerjik sinir iletiminde, hafıza ve zihinsel işlevlerde, düşünme ve yorumlamada zorluklar; kişilik ve davranış bozuklukları ile karakterize olan nörodejeneratif bir hastalık olarak tanımlanır. Hastalığın patolojisinde olan amiloid β -peptid ($A\beta$) agregasyonunun, hiperfosforile tau proteinleri kaynaklı nörofibriller ağ oluşumunun, oksidatif stresin ve düşük asetilkolin seviyelerinin etkisi olduğu söylenmektedir. Tedavisinde genel olgular amiloid β -peptid kaynaklı plak oluşumunun engellenmesi yönünde olmakla birlikte son yıllarda kolinesteraz inhibitörleri de kullanılmaktadır. Klinik çalışmalar kolinesteraz inhibitörlerinin AH tedavi sürecinde etkili olduğunu göstermektedir. Bu yüzden çalışmalar hem amiloid plak oluşumunu bozan hem de kolinesteraz inhibitörü davranış gösteren iki yönlü bileşiklerin geliştirilmesi üzerinde durulmaktadır (Özer, 2012).

Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmakta olan mevcut ilaçlar arasında en iyi ilaçlar asetilkolinesteraz(AChE) inhibitörleridir. Fitokimyasal araştırmasında AChE aktivitesi(1 ug) ile yeni bir depsidone 1 izolasyonuna yol açmıştır. Bu çalışmada ise mevcut programlar kullanılarak analiz elektronik özellikleri üzerinde ticari olarak durulmuştur. Depsidone iskele göre yeni bir AChE inhibitörlerinin tasarımını desteklemek için veriler unulmuştur (Ece, 2015).

2.3.3. Tirozinazlar

Monohidroksi fenollerin O_2 varlığı halinde p-kinonlara dönüşmesini katalizleyen enzimler tirozinazlar olarak bilinir (Epsin, 1995). Monofenol, L-dopa: oksijen oksidoredüktaz sistematik adı olarak bilinir (Calay, 2010). Tirozinaz ismini; substrat olarak enzimin tirozin (monohidroksifenilalanin) ve dihidroksifenilalanine karşı spesifikliğı sebebi ile almıştır (Whitaker, 1994). Tirozin vücuda proteinlerle alınır ve de endojen olarak fenilalaninden sentez edilmektedir. Doğada çok yaygın olarak bulunurlar (Cooksey, 1997). Genellikle bitkilerde ve mikroorganizmalarda özellikle mantarlarda ve bazı hayvan organlarında bulunur (Parvez, 2007).

2.3.3.1. Tirozinaz enzimi üzerine klinik çalışmalar

Yıllardır kozmetik ve tarımla birlikte besin endüstrisindeki kullanımı için tirozinaz araştırılmaktadır. Özellikle de son yıllarda tıp endüstrisindeki uygulamaları pigmentasyon ve diğer cilt bozukluklarından koruma etkisi sebebiyle oldukça ün kazanmıştır. Tirozinazlar kaynaklara göre bakteri, mantar, bitki olmak üzere karakterize edilmiştir. Yapısı tam olarak henüz bilinmemektedir. Parkinson hastalığının tedavisinde farmasötik made üretiminde çalışmalar yapılmıştır (Polatoğlu, 2012). Bazı sebze ve meyvelerde, tirozinaz aktivitesi de esmerleşme reaksiyonlarından sorumludur (Fiorentino vd., 2010; Selinheimo, 2008; Xie vd., 2003).

2.3.3.1.1. Vitiligo belirteci

Saç hipopigmentasyonu ve epidermisin bazal tabakasındaki total melanosit azalmasıyla karakterize edilmiş hastalığa vitiligo denir. Vitiligo hastalarının serumlarına anti-tirozinaz antikörlerinden faydalanarak hasta iyileştirilebilir. Uzun süreli çalışmalarda vitiligonun klinik özellikleri ile tirozinaz antikör düzeyleri arasındaki ilişki tayininin daha yararlı olacağı düşünülmektedir (Calay, 2010).

2.3.3.1.2. Kanser tedavisi

Bazı makalelerde tirozinazın kanserdeki rolü ile alakalı mantar tirozinazın tümör baskılayıcı etkisinden bahsedilir. Diğer bazı makalelerde ise mutajenite üzerinde olası bir rolü olduğu öne sürülen düşünceler yer almaktadır (Calay, 2010).

2.3.3.1.3. Antioksidan rolü

Klinik çalışmalarda; tirozinaz enzimi ve inhibitörleri üzerinde araştırmaları gerekli olmuştur. Bu çalışmada çeşitli bitkilerden hazırlanan bitki ekstraktlarının ve kimyasal maddelerin tirozinaz enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkileri incelenmiştir (Calay, 2010).

2.3.4. α -Amilaz ve α -glukozidaz enzimleri

α -Amilaz, endüstriyel açıdan önemli olan ve eskiden beri bilinmekte olan enzimlerden biridir (Syu ve Chen, 1997; Türker, 2014). İlk defa 1939 yılında *Bacillus subtilis* suşu kullanılarak Japonya'da üretilmiştir. 1970'li yıllarda ise bu enzimin geniş çapta üretimi için, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* bakterileri kullanılmıştır. Ayrıca nişasta molekülündeki α -1,4 bağlarını parçalayarak glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlayan α -amilaz enzimi; glikoamilaz α -1,3, α -1,4 ve α -1,6 bağlarını da kopararak glikoz molekülüne dönüştürmektedir. α -amilaz üretimi bakteri ve mantarlardan sağlanmaktadır. Bu enzime ilaveten β -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz enzimleri nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (Lee, 1996; Türker, 2014).

Laboratuvar çalışmalarında α -amilaz enzimi, hem tek başına hem de pentozanaz enzimi ile birlikte kullanıldığında kabarma hacminin oldukça arttığı görülmüştür (Krishnarau ve Hosene, 1994; Türker, 2014).

α -Glukozidaz, karbonhidrat sindiriminde görev alan önemli enzimlerdir. Karbonhidratların sindiriminin son basamağında görev aldıklarından dolayı bu enzimin inhibitörleri karbonhidratların sindiriminin süresini uzatarak, sindirimi geciktirmektedirler (Kim vd., 2005). Bu sebeptendir ki α -glukozidaz inhibitörleri, karbonhidratların hidroliz ve emilimini yavaşlatır; tokluk kan şekeri yüksekliğini baskılamaktadır. Ayrıca glukoz emilim hızının azalmasına ve artmış olan tokluk kan glukoz oranının düşmesine sebep oldukları için Tip II diyabetin düzenlenmesinde önem kazanmaktadır (Ali vd., 2006; Hamdan ve Afifi, 2004; Başak, 2008).

2.3.4.1. Diyabet tip 2

Diyabet türünün en yaygın şeklidir. Genellikle uzun yıllar boyu belirtisiz ve bulgusuz tanı konulmadan devam etmektedir ve bu zaman içerisinde metabolik bozukluklar farklı dokuları yıpratmaktadır (Altuntaş vd., 2001; Kamarlı, 2009). Bu diyabet türünün gelişme riski obezite, yaş, fiziksel inaktivite ile artış göstermektedir. Hastaların % 85'i kilolu hastalardır. Obezite durumunda insülin

direnci artar ve hipergliseminin ağırlaşmasına sebep olur (Altuntaş vd., 2001; Bennett vd., 2008; Kamarlı, 2009). Diyabet teşhisi konulduğu zaman ve sonraki zamanlarda bu hastalarda glisemi kontrolü yapılması gerekirse de hayatta kalım için insülin tedavisine ihtiyaç duyulmayabilir. Bu durumda ise hastalarda beslenme, egzersiz tedavileri kullanılmaktadır (Bennett, 2008; Kamarlı, 2009).

2.4. Antioksidanlar ve Genel Özellikleri

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarları önlemek için birden fazla savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler (Dawn ve ark., 1996; Akyurt, 2014).

Antioksidanlar etki etme şekline göre 4 gruba ayrılırlar:

- 1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma özelliği gösterir veya daha zayıf yeni moleküle çevirerek toplayıcı etki göstermektedirler. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tipteki etkiden gösterirler.
- 2) Serbest oksijen radikalleriyle etkiye girip onlara hidrojen aktarımı gösterip aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme etkisi gösterirler. Vitaminler, flavanoidler böyle etkiye sahiptirler.
- 3) Serbest oksijen radikallerini bağlayıp, zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki etki gösterirler. Bu etki "zincir kırıcı etki" olarak bilinir. Hemogloblin, seruplazmin ve mineraller bu etkiyi göstermektedirler.
- 4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması etkisini gösterirler. Bu etki de 'onarıcı etki' olarak bilinir (Dawn vd., 1996; Akyurt, 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel materyallerin toplanması

Pseudevernia furfuracea liken örnekleri Isparta ili Şarkikaraağaç ilçesi Kızıldağ ormanlarından Mayıs 2015'te toplandı. Toplanan liken örnekleri gölgede kurutulduktan sonra botanik tanımlamaları Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Botanik Ana Bilim Dalı Öğretim elemanı Dr. Olcay CEYLAN tarafından yapılacaktır. Gölgede kurutulan örnekler bir parçalayıcı ve öğütücü yardımıyla una öğütüldükten sonra çözücü özütlerinin elde edilmelerinde kullanılmak üzere analize hazır hale getirildi.

3.2. Çözücü Özütlerinin Hazırlanması

Bitkilerin çözücü özütlerinin elde edilmesinde farklı polariteye sahip çözücüler tercih edilerek aşağıdaki şekilde özütleme işlemi uygulandı:

1. Metanol özütü, kurutulmuş ve belli bir tane boyutuna getirilmiş örneğin 10 gramın 200 ml metanol ile 24 saat maserasyonuyla elde edildi. Elde edilen özüt beyaz bant süzgeç kağıdından süzüldükten sonra çözücü vakum altında döner buharlaştırıcıda 40 °C'de uzaklaştırıldı ve özütler analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.
2. Su özütü, kurutulmuş ve belli bir tane boyutuna getirilmiş bitki örneğinin 10 gramı 200 ml kaynar saf su ile 15 dakika muamele edilerek demlenmesiyle elde edildi. Elde edilen özüt beyaz bant süzgeç kağıdından süzüldükten sonra -18 °C'de donduruldu. Daha sonra -50 °C'de liyofilize (suyu uzaklaştırıldı) edildi ve analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklandı.

Metanol özütleri tekrar metanol içerisinde su özütü ise, tekrar safsu içerisinde çözüldürüldü ve beyaz bant süzgeç kağıdından süzülerek 2 mg/ml derişimde stok çözeltiler hazırlandı. Tüm testlerde hazırlanan bu çözeltiler kullanıldı.

3.2.2. Enzim inhibisyon kapasite tayin yöntemleri

3.2.2.1. Kolinesteraz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi

Kolinesteraz inhibisyon aktivite testleri Ellman yöntemi kullanılarak 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirildi (Ellman vd., 1961; Kocak, 2016). İçerisinde örnek çözeltisi (50 µl) bulunan mikropalaka kuyucuklarına 125 µl DTNB (5,5-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) acid), 25 µl asetiltiyokolin iyodür (ATCI) veya butiriltiyokolin iyodür (BTCl) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra bu karışıma tris-HCl tamponunda (pH: 8.0) hazırlanmış 25 µl asetilkolin esteraz (AChE) veya bütirilkolin esteraz (BChE) enzim çözeltisi eklendi. Enzim çözeltisi yerine tris-HCl tamponu kullanılarak herbir örnek için kör numune hazırlandı. Tüm örnekler 25 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra hem kör hem de örneklerin 405 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin asetilkolin esteraz ve bütirilkolin esteraz inhibisyon aktiviteleri örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir örnek için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak galantamine eşdeğer olarak hesaplandı (mg GALAEs/g örnek).

3.2.2.2. Tirozinaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi

Tirozinaz inhibisyon aktivite testleri L-DOPA molekülünün substrat olarak kullanıldığı dopakrom yöntemiyle 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirildi (Orhan vd., 2014; Kocak, 2016). İçerisinde örnek çözeltisi (25 µl) bulunan mikropalaka kuyucuklarına 100 µl fosfat tamponu (pH:6.8) ve bu tamponda hazırlanmış 40 µl tirozinaz enzim çözeltisi ilave edildi. Enzim çözeltisi yerine fosfat tamponu kullanılarak herbir örnek için kör numune hazırlandı. Tüm örnekler 25 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra hem kör hem de örneklerin 492 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin tirozinaz inhibisyon aktiviteleri örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir örnek için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak kojik asit eşdeğer olarak hesaplandı (mg KAEs/g örnek).

3.2.2.3. α -Amilaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi

α -Amilaz inhibisyon aktivite testleri Caraway-Somogyi iyot/potasyum iyodür (I_2/KI) yöntemi kullanılarak 96 kuyucuklu mikrolakalarda gerçekleştirildi (Zengin vd., 2014; Kocak, 2016). İçerisinde örnek çözeltisi (25 μ l) bulunan mikrolaka kuyucuklarına 50 μ l nişasta çözeltisi ve fosfat tamponunda (pH: 6.9) hazırlanmış 25 μ l α -amilaz çözeltisi ilave edildi. Enzim çözeltisi yerine fosfat tamponu kullanılarak her bir örnek için kör numune hazırlandı. Tüm örnekler 25 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra tüm örnekler üzerine 25 μ l HCl çözeltisi (1 M) eklenerek tepkime durduruldu. Daha sonra tüm örnekler üzerine 100 μ l iyot-potasyum iyodür çözeltisi (I_2/KI) eklenerek hem kör hem de örneklerin 630 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin α -amilaz inhibisyon aktiviteleri örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir örnek için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak akarboz eşdeğer olarak hesaplandı (mmol ACEs/g örnek).

3.2.2.4. α -Glukozidaz inhibisyon aktivitenin belirlenmesi

α -Glukozidaz inhibisyon aktivite testleri PNPG (4-nitrofenil- α -D-glukopiranozit) molekülünün substrat olarak kullanıldığı bir yöntemle 96 kuyucuklu mikrolakalarda gerçekleştirildi (Palanisamy vd., 2011; Sarikurkcu vd., 2014; Kocak, 2016). İçerisinde örnek çözeltisi (50 μ l) bulunan mikrolaka kuyucuklarına 50 μ l glutatyon, 50 μ l PNPG ve fosfat tamponunda (pH: 6.9) hazırlanmış 50 μ l α -glukozidaz çözeltisi ilave edildi. Enzim çözeltisi yerine fosfat tamponu kullanılarak her bir örnek için kör numune hazırlandı. Tüm örnekler 25 °C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerlerine 50 μ l Na_2CO_3 (0.2 M) eklenerek hem kör hem de örneklerin 400 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin α -glukozidaz inhibisyon aktiviteleri örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir örnek için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak akarboz eşdeğer olarak hesaplandı (mmol ACEs/g örnek).

3.2.3. Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi

Örneklerin toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) kullanılarak gallik asit eşdeğer olarak belirlendi (Sarikurkcu vd., 2013). İçerisinde özüt çözeltisi (0.25 ml) bulunan test tüplerine FCR reaktifi (1 ml, 1:9 seyreltilmiş) ilave edildi ve 3 dakika sonrada bu karışıma Na₂CO₃ çözeltisi (0.75 ml, %1) eklendi. Son karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve ara sıra çalkalandı. Özütlerin 760 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı ve toplam fenolik bileşik miktarları gallik asit eşdeğer olarak hesaplandı (mg GAEs/ g özüt).

3.2.4. Toplam flavonoit bileşik miktarının belirlenmesi

Örneklerin toplam flavonoit bileşik miktarları AlCl₃ yöntemiyle belirlendi (Sarikurkcu vd., 2013). İçerisinde özüt çözeltisi (1 ml) bulunan test tüplerine metanolde hazırlanmış AlCl₃ çözeltisi (1 ml, %2) ilave edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Kör örnek olarak özüt çözeltisi (1 ml) ve metanol (1 ml) içeren bir karışım hazırlandı. Örneklerin 415 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin flavonoit bileşik miktarları örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir özüt için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak rutin eşdeğer olarak hesaplandı (mg REs/g özüt).

3.2.5. Bitki özütlerinin RP-HPLC ile fenolik içeriklerinin belirlenmesi

Örnek çözücü özütlerinin fenolik bileşik miktarları ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle (RP-HPLC, Shimadzu Scientific Instruments, Tokyo, Japan) tespit edildi. Fenolik bileşiklerin belirlenmesi ve miktarlarının tayin edilmesinde LC-10ADvp pompa, Diod Array Detektör, CTO-10Avp kolon ısıtıcı, SCL-10Avp system kontrolörü, DGU-14A degazör ve SIL-10ADvp otomatik örnekleyici (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD) kullanılarak belirlendi. Ayırımlar 30 °C'de Agilent® Eclipse XDB C-18 ters faz kolon (250 mm x4.6 mm, 5 µm tanecik boyut) üzerinde gerçekleştirildi. Elüatlar 280 nm'de tespit edildi. İki farklı mobil faz kullanıldı. Bunlardan A: %3'lük asetik asit ve B: Metanoldür. Analiz için örnekler metanol içerisinde çözündürüldü ve bu çözelti

(20 µl) kolona enjekte edildi. 0.8 ml/dk akış hızında elüsyon gradient programı uygulandı.

Gallik asit, protokateşik asit, (+)-kateşin, p-hidroksibenzoik asit, klorogenik asit, kafeik asit, (-)-epikateşin, şiringik asit, vanilin, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapinik asit, benzoik asit, o-kumarik asit, rutin, hesperidin, rosmarinik asit, eriodiktiol, sinnamik asit, kuersetin, luteolin, kamferol ve apigenin fenolik standartlar olarak kullanıldı. Özütlerdeki fenolik bileşiklerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi, standartlarla karşılaştırılmalarıyla tespit edildi. Özütlerin içerdiği her bir fenolik bileşik miktarı ilgili fenolik standarttan elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.6. Antioksidan kapasite tayin yöntemleri

3.2.6.1. Fosfomolibdenyum yöntemiyle toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi

İçerisinde örnek çözeltisi (0.1 ml) bulunan test tüplerine 3 ml reaktif çözeltisi (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) ilave edildi. Test tüpleri 95 °C'de 90 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve köre karşı (kör, 3 ml reaktif çözelti ve 0.1 ml çözücü içermektedir) 695 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı (Zengin vd., 2010; Koçak, 2016). Örneklerin toplam antioksidan kapasiteleri standart troloks eşdeğer (TEs) olarak hesaplandı.

3.2.6.2. DPPH serbest radikal süpürüm aktivitenin belirlenmesi

Örneklerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Sarikurkcu, 2011, Koçak, 2016). İçerisinde örnek çözeltisi (1 ml) bulunan test tüplerine metanolde hazırlanmış DPPH çözeltisi (1 ml, 0.4 mM) ilave edildi. Kontrol için test tüpüne özüt yerine 1 ml metanol/su konuldu. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra 517 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin DPPH radikalini süpürüm aktiviteleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı.

3.2.6.3. CUPRAC testiyle indirgeme gücünün belirlenmesi

Örneklerin $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ indirgeme potansiyelleri literatürde belirtilen CUPRAC yöntemiyle analiz edildi (Apak vd., 2006; Zengin vd., 2014; Koçak, 2016). İçerisinde örnek çözeltisi (0.5 ml) bulunan test tüplerine sırasıyla; CuCl_2 (1 ml, 10 mM), amonyum asetat (1 ml, 1 M, pH:7.0) ve neokuproin (1 ml, 7.5 mM) çözeltileri eklendi. Tüpler ağızları kapalı bir biçimde oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra 450 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin CUPRAC indirgeme potansiyelleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı.

3.2.6.4. FRAP testiyle indirgeme gücünün belirlenmesi

Örneklerin $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ indirgeme potansiyelleri FRAP yöntemiyle belirlendi (Benzie ve Strain, 1996; Koçak, 2016). Asetat tamponu (0.3 M, pH: 3.6), 40 mM HCl içinde hazırlanan 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (10 mM) ve FeCl_3 (20 mM) çözeltilerinin hacimce 10:1:1 oranında karıştırılması ile oluşturulan FRAP reaktifi (2 ml), içerisinde örnek çözeltisi (0.1 ml) bulunan test tüplerine eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Karışımların 593 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin FRAP indirgeme potansiyelleri troloks eşdeğer olarak hesaplandı.

3.2.6.5. Şelatlama kapasitesinin belirlenmesi

Örneklerin Fe^{2+} iyonlarını şelatlama kapasiteleri ferrozin ile belirlendi (Sarıkurkcu vd., 2013; Koçak, 2016). İçerisinde özüt çözeltisi (2 ml) bulunan test tüplerine FeCl_2 (0.05 ml, 2 mM) çözeltisi ilave edildi. Tepkime ferrozin (0.2 ml, 5 mM) ilavesiyle başlatıldı. Karışım karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Ferrozin yerine metanol/su (0.2 ml) kullanılarak herbir örnek için kör numune hazırlandı. Daha sonra hem kör hem de örneklerin 562 nm'deki absorbans ölçümleri yapıldı. Örneklerin şelatlama kapasiteleri örnekler için ölçülen absorbans değerlerinden her bir örnek için hazırlanan kör karışıma ait absorbans değerleri çıkartılarak etilendiamin tetra asetik asit disodyum (EDTAEs) tuzu eşdeğer olarak hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Hesaplamalar

Bütün testler üç tekrarlı deneyler yapılarak gerçekleştirildi ve sonuçlar üç tekrarlı deneylerin ortalaması ve standart sapması olarak verildi. Sonuçlar arasındaki anlamlılık testleri SPSS v22. programı kullanılarak %99 güven aralığı seçilmek suretiyle ($\alpha=0.01$) Student's t-testiyle belirlendi.



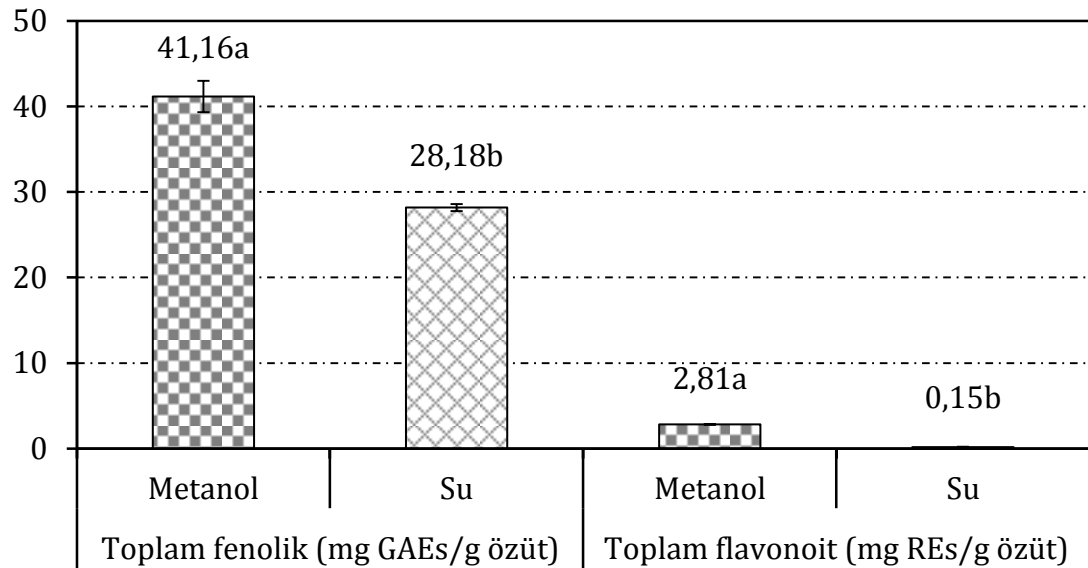
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Pseudevernia furfuracea liken örneklerinin öncelikli olarak metanol ve su özütleri hazırlandı. Liken örneğinin metanol ve su özüt verimleri sırasıyla; %9.37 ve %9.12 olarak belirlendi.

4.1. Özütlerinin toplam fenolik ve flavonoit içeriklerinin belirlenmesi

Fenolik ve flavonoit türü bileşikler yapılarında hidroksil grupları bulundurmaktadırlar. Bu tür bileşikler hidroksil gruplarındaki hidrojen radikalini kolayca verebildiklerinden çok iyi radikal süpürücü özellik gösterirler. Bundan dolayı, aktiviteye katkılarının belirlenmesi açısından özütler içerisindeki bu tür bileşiklerin miktarlarının bilinmesi önemlidir.

Pseudevernia furfuracea likeni metanol ve su özütlerinin toplam fenolik bileşik miktarları FCR reaktifi kullanılarak; toplam flavonoit bileşik miktarları ise $AlCl_3$ yöntemiyle tespit edildi. Toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktarları sırasıyla; gallik asit (GAEs) ve rutin (REs) eşdeğer olarak hesaplanarak sonuçlar Şekil 4.1'de verildi.



Şekil 4.1. *Pseudevernia furfuracea* likeni çözücü özütlerinin toplam fenolik ve flavonoit bileşik miktarları

Liken örneği metanol özütünün (41.16 mg GAEs/g özüt) su özütüne (28.18 mg GAEs/g özüt) nazaran toplam fenolik bileşik içeriği bakımından daha zengin olduğu belirlendi ($p<0.01$). Bu sonuçlar metanol ve su özütlerinin toplam fenolik bileşik içerik bakımından özütlerin sırasıyla; %4.12 ve %2.82'lik kısımlarına karşılık gelmektedir. *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria* ve *Ramalina polymorpha* likenleri üzerine yapılan bir çalışmada, bu türlerin metanol özütlerinin fenolik içeriklerinin %0.8-3.0 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Gulluce vd., 2006). Ayrıca yine başka bir çalışmada da *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Evernia prunastri* ve *Neofuscella pulla* likenlerinin toplam fenolik bileşik miktarlarının metanol özütlerinde %1.5-3.0 arasında değiştiği bildirilmiştir (Aslan vd., 2006). Bu çalışmada değerlendirilen *P. furfuracea* likeni metanol özütünün toplam fenolik bileşik miktarının literatür verilerinden daha yüksek; su özütlerinin ise şiteratür verileriyle uyum içinde olduğu görülmektedir.

Tıpkı toplam fenolik içeriklerinde olduğu gibi, liken örneğinin metanol özütünün (2.81 mg REs/g özüt) toplam flavonoit bileşik içeriğinin su özütüne (0.15 mg REs/g özüt) oranla oldukça yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.01$).

4.2. Özütlerinin HPLC ile fenolik ve flavonoit içeriklerinin belirlenmesi

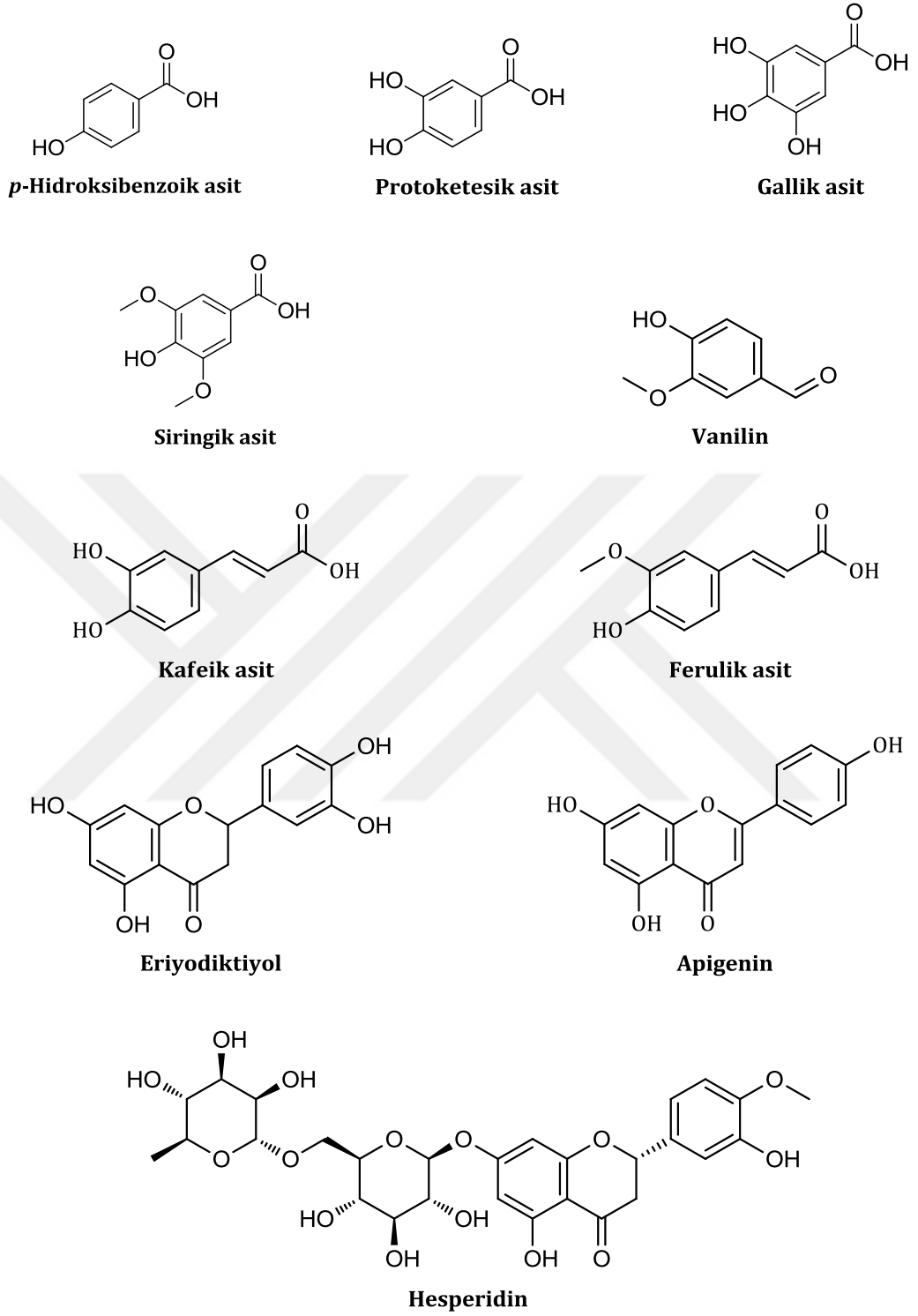
Pseudevernia furfuracea liken metanol ve su özütlerinde bulunan fenolik ve flavonoit türü bileşiklerin toplamları spektroskopik olarak belirlenmişti. Çalışmanın bu kısmında u özütlerde bulunan bu bileşiklerin türlerinin ve miktarlarının belirlenmesi hedeflendi. Özütler içerisindeki bu türlerin belirlenmesinde ters faz HPLC ve 23 fenolik ve flavonoit türü bileşik standart kullanıldı (Şekil 4.2). *Pseudevernia furfuracea* liken çözücü özütlerinin ve standartların HPLC kromatogramları EKLER kısmında verildi. Özütlerin HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verildi. Çizelgeden de görüldüğü gibi metanol özütünde kamferol, hesperidin, gallik asit ve eriyodiktiyol (sırasıyla; 86.41, 28.08, 10.80 ve 10.80 $\mu\text{g/g}$ kuru bitki); su özütünde ise sadece hesperidin, kafeik asit ve p-hidroksibenzoik asit (sırasıyla; 36.48, 4.79 ve 4.56 $\mu\text{g/g}$ kuru bitki) ana bileşenler olarak belirlendi. hesperidin, kafeik asit ve p-

hidroksibenzoik asit bileşikleri her iki özütünde ortak bileşenler olarak belirlendi. Literatürde *P. furfuracea* liken örneklerinde, atrarık asit (Guvenc vd., 2012; Mitrovic vd., 2014), atranorin (Mitrovic vd., 2014; Proksa vd., 1994; Turk vd., 2006), kloroatranorin, olivetorik asit (Mitrovic vd., 2014; Turk vd., 2006), methyl hematomat, methyl klorohematomat (Guvenc vd., 2012), absisik asit acid, polyaminler (putrescine and spermidine) (Unal vd., 2008), fisodik asit (Garciajunceda vd., 1985; Proksa vd., 1994; Turk vd., 2006), oksifisodik ve virensik asitler (Proksa vd., 1994) ve furfurik asit (Gunzinger ve Tabacchi, 1985) bulunduğu rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmada tespit edilen fenolik ve flavonoit türü bileşiklerle ilgili literatürde herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

Çizelge 4.1. *Pseudevernia furfuracea* likeni çözücü özütlerinin HPLC ile belirlenen fenolik ve flavonoit bileşik içerikleri

No	Fenolik ve flavonoit bileşikler	Derişim ($\mu\text{g/g}$ özüt)*	
		Metil alkol	Su
1	Gallik asit	10.80 \pm 0.22	t**
2	Protokateşik asit	3.24 \pm 0.22	t
3	(+)-Kateşin	t	t
4	p-Hidroksibenzoik asit	2.16 \pm 0.01 ^b	4.56 \pm 0.02 ^a
5	Klorojenik asit	t	t
6	Kafeik asit	2.16 \pm 0.11 ^b	4.79 \pm 0.23 ^a
7	(-)-Epikateşin	t	t
8	Şiringik asit	1.08 \pm 0.11	t
9	Vanilin	1.08 \pm 0.11	t
10	p-Kumarik asit	t	t
11	Ferulik asit	2.16 \pm 0.03	t
12	Sinapnik asit	t	t
13	Benzoik asit	t	t
14	o-Kumarik asit	t	t
15	Rutin	t	t
16	Hesperidin	28.08 \pm 0.65 ^b	36.48 \pm 1.37 ^a
17	Rosmarinik asit	t	t
18	Eriyodiktiyol	10.80 \pm 0.02	t
19	Sinnamik asit	t	t
20	Kuersetin	t	t
21	Luteolin	t	t
22	Kamferol	86.41 \pm 2.16	t
23	Apigenin	t	t

*Her bir bitki için aynı satırdaki üstel farklı harfler, veriler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir ($p < 0.01$); **t, tespit edilemedi

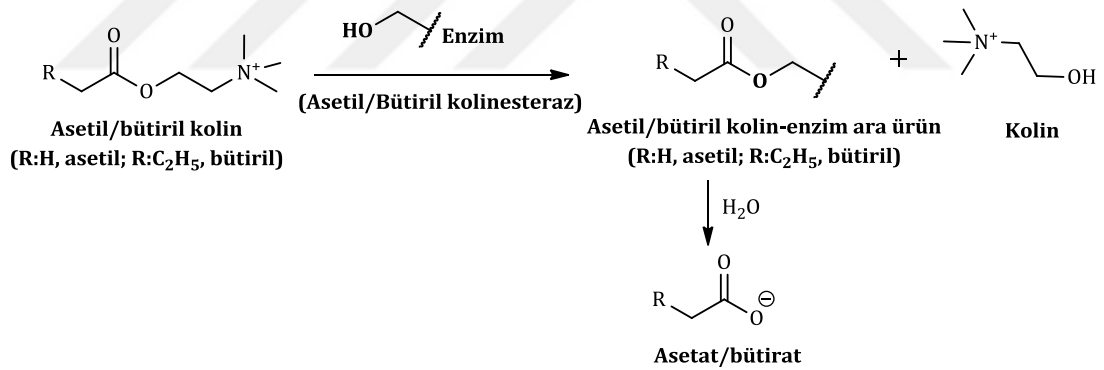


Şekil 4.2. *Pseudevernia furfuracea* likeni çözücü özütlerinde bulunan fenolik ve flavonit bileşiklerin kimyasal yapıları

4.3. Özütlerinin Enzim İnhibisyon Aktivitelerinin Belirlenmesi

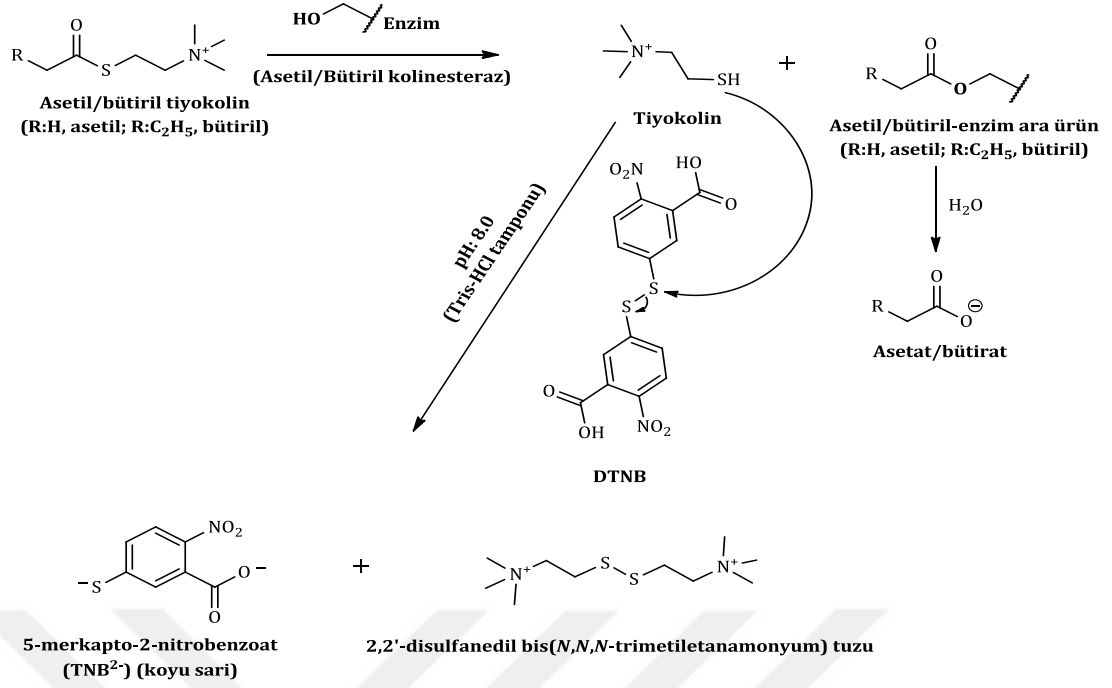
Enzim inhibisyon aktivite çalışmalarında, asetil ve bütiril kolinesteraz, tirozinaz, α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri üzerine *P. furfuracea* likeni metanol ve su özütlerinin inhibisyon etkileri incelendi.

Alzheimer hastalığı demensin bir türü olarak bilinmekte ve asetil kolinin asetil kolinesteraz enzimiyle aşırı derecede hidroliz edilmesiyle açığa çıkmaktadır. Bu hidroliz Şekil 4.3'te gösterildiği gibi gerçekleşmez (Koçak, 2016). Alzheimer hastalığını tetiklemesi nedeniyle bu enzimin metabolizmada inhibe edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, takrin, donepezil ve galantamin içerikli bazı ilaçlar Alzheimer hastalığında hafıza ve bilinç kaybının tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bu bileşiklerin son zamanlarda gastrointestinal bozuklukları ve problemleri içeren yan etkilerinin rapor edilmiş olmasıyla doğal kaynaklı alternatiflerinin belirlenmesi gerekli hale gelmiştir.



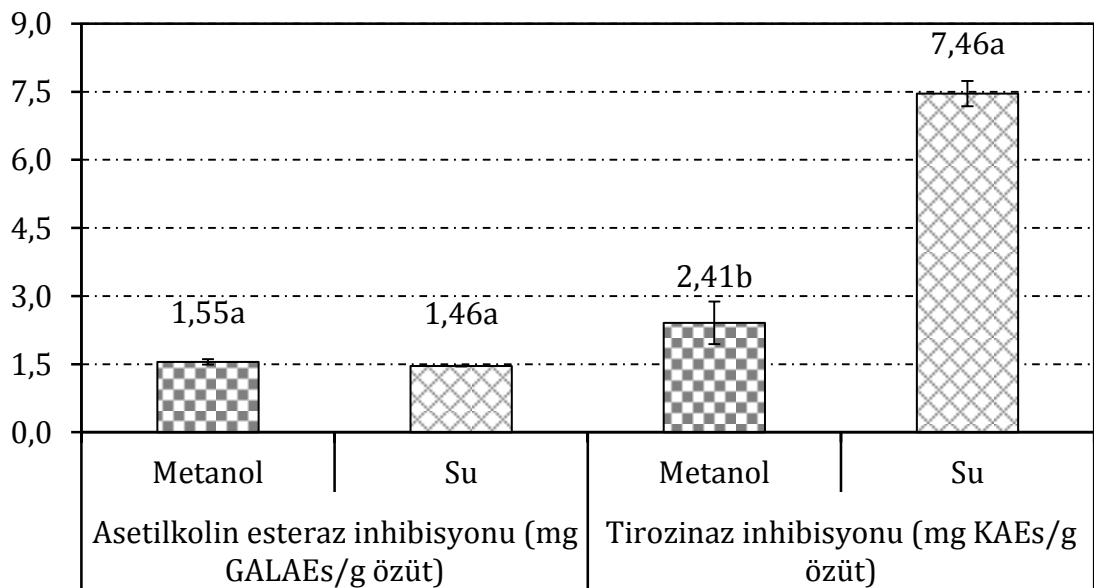
Şekil 4.3. Asetil/bütiril kolinesteraz metabolizması

Metanol ve su özütlerinin asetilkolin ve bütirilkolin esteraz enzim inhibisyon aktiviteleri Ellman yöntemiyle Şekil 4.4'teki tepkime mekanizmasına bağlı olarak araştırıldı ve sonuçlar standart bir asetil/bütiril kolinesteraz inhibitör olan galantamin eşdeğer olarak hesaplandı.



Şekil 4.4. Asetil/bütiril kolinesteraz enzim mekanizması

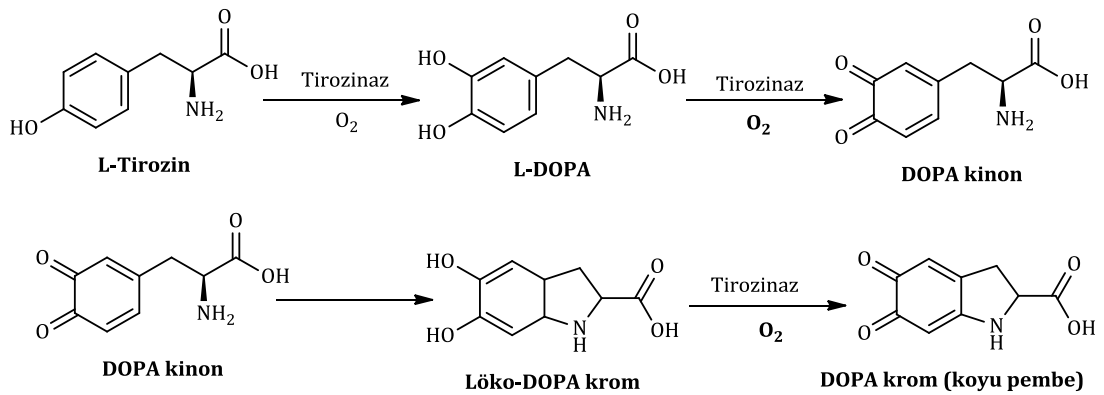
Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, metanol ve su özütlerinin asetilkolin esteraz enzim inhibisyon aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (sırasıyla; 1,55 ve 1,46 mg GALAEs/g özüt, $p > 0,01$). Ayrıca her iki özütün de bütirilkolinesteraz enzimi üzerine bir inhibisyon etkiye sahip olmadığı belirlendi. Literatür çalışmalarında *P. furfuracea* likeninin çözücü özütleri üzerine herhangi bir veriye rastlanamamıştır.



Şekil 4.5. *Pseudevernia furfuracea* likeni çözücü özütlerinin asetil/bütiril kolinesteraz ve tirozinaz enzimleri inhibisyon aktiviteleri

Aktif merkezinde Cu(II) iyonu bulundurması nedeniyle tirozinaz enzimi bir metaloenzimdir. Bu enzim fazla çalışması epidermal pigmentasyonda artışa neden olmaktadır. Bunun sonucunda da yaşlılık lekeleri, melasma gibi çeşitli dermatolojik problemler oluşmaktadır. Bunların tedavisi için hidrokinon, kojik asit ve kortikosteroidler gibi tirozinaz inhibitörler kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda bu bileşklere alternatif doğal ürünlerin araştırılması yaygın hale gelmiştir. Analizin bu kısımda, tirozinaz enzim inhibisyon aktivite DOPA-krom yöntemiyle araştırıldı Bu yöntemde, Şekil 4.4'te de görüldüğü gibi L-tirozin ya da L-DOPA substratlarının tirozinazla oksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin (DOPA kinon, DOPA krom gibi) 492 nm'de spektroskopik olarak takip edilmektedir (Koçak, 2016).

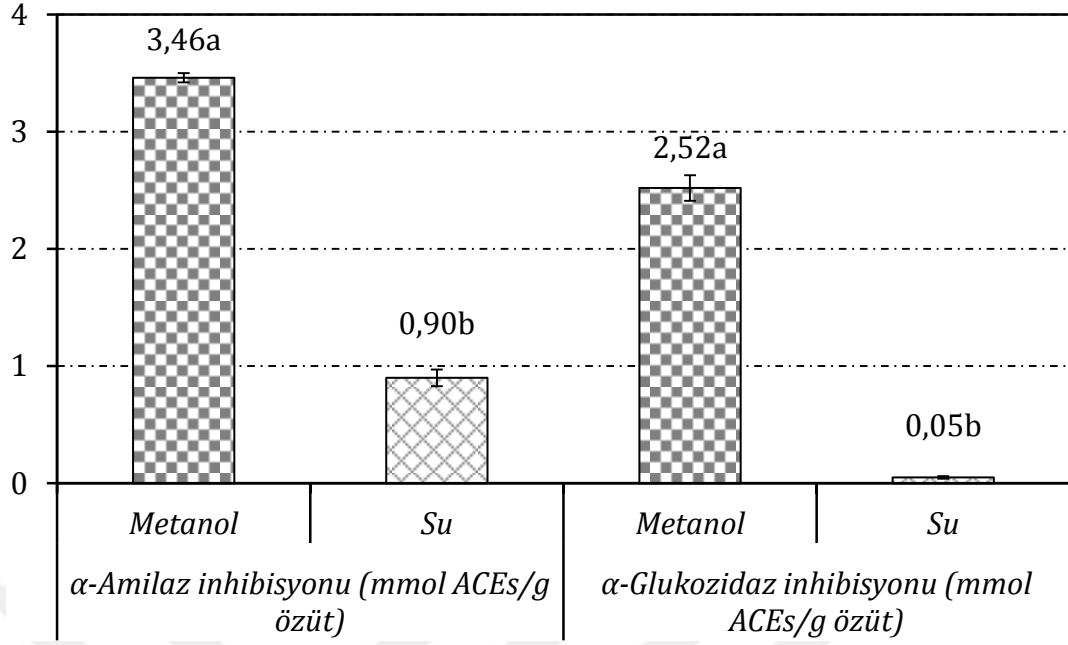
Pseudevernia furfuracea likeni çözücü özütlerinin tirozinaz enzim inhibisyon sonuçları standart tirozinaz inhibitörü olan kojik asit eşdeğer (KAEs/g özüt) olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.6'da verildi. Yapılan analizler sonucunda liken örneği su özütünün (7.46 mg KAEs/g özüt) tirozinaz enzim inhibisyon aktivitesinin metanol özütününkinden (2.41 mg KAEs/g özüt) yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu tespit edildi ($p < 0.01$). Bu durum, su özütünün (4.56 $\mu\text{g/g}$ kuru bitki) metanol özütüne (2.16 $\mu\text{g/g}$ kuru bitki) nazaran daha yüksek p-hidroksibenzoik asit miktarı içermesiyle açıklanabilir. Çünkü p-hidroksibenzoik asitin iyi bir tirozinaz enzim inhibitörü olduğu bilinmektedir.



Şekil 4.6. Tirozinaz enzim mekanizması

Halk arasında şeker hastalığı olarak bilinen Diabetes Mellitus, günümüzde dünyanın karşı karşıya geldiği oldukça büyük tıbbi rahatsızlıklardan biridir. Bu yaygın metabolik hastalık yüksek plazma glukoz seviyesi ile karakterize edilmekte; diabetiknöropatik, retinopati ve kardiovasküler hastalıklar gibi büyük komplikasyonlara neden olmaktadır. Karbohidrat hidrolize eden enzimlerin inhibitörleri hipergliseminin kontrolünde oldukça faydalıdır ve bu amaçla akarboz ve vigliboz gibi etken maddelere sahip ilaçlar yaygın olarak α -amilaz ve α -glukozidaz inhibitörleri olarak kullanılmaktadırlar (Koçak, 2016). Ancak bu ilaçların şişkinlik, ishal ve gaz gibi yan etkilere sahip olmaları da bilinmektedir. Analizin bu kısmında liken örneği çözücü α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri inhibisyon aktiviteleri incelendi ve analiz sonuçları α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin standart inhibitörü olarak kullanılan akarboz eşdeğer (ACEs/g özüt) olarak hesaplanarak Şekil 4.7’de verildi.

Liken örneği metanol ve su özütlerinin α -amilaz enzim inhibisyon aktiviteleri sırasıyla; 3.46 ve 0.90 mmol ACEs/g özüt olarak belirlendi. Ayrıca yine metanol ve su özütlerinin α -glukozidaz enzim inhibisyon aktiviteleri sırasıyla; 2.52 ve 0.05 mmol ACEs/g özüt olarak tespit edildi. Her iki enzim inhibisyon aktivite testinde de metanol özütlerinin su özütlerinden daha yüksek aktiviteye sahip oldukları görüldü ($p < 0.01$).



Şekil 4.7. *Pseudevernia furfuracea* likeni çözücü özütlerinin α -amilaz ve α -glukozidaz enzimleri inhibisyon aktiviteleri

4.1. Özütlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

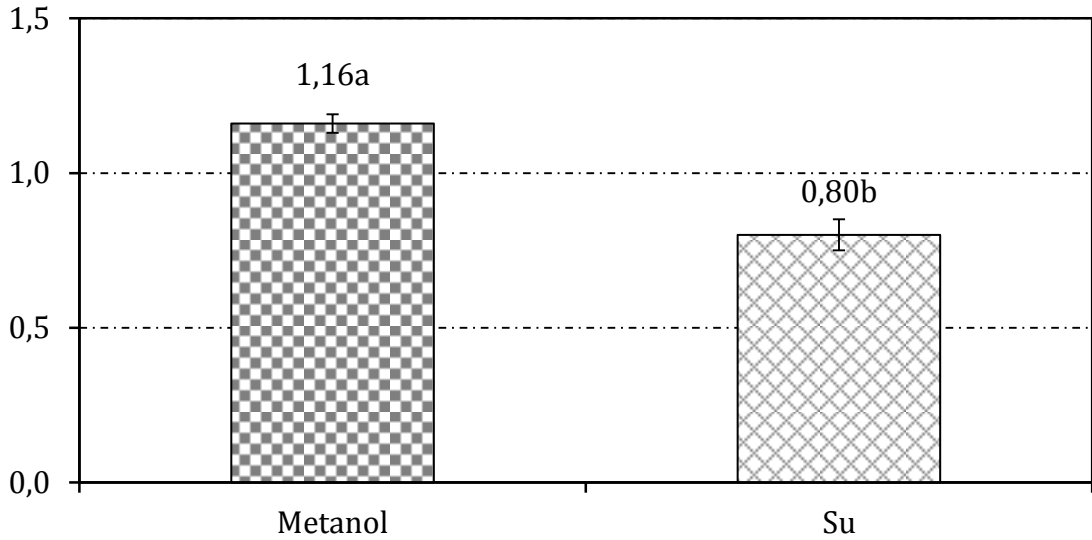
Pseudevernia furfuracea likeni metanol ve su özütlerinin antioksidan aktiviteleri farklı test sistemleri kullanılarak tespit edildi. Bu bağlamda özütler üzerine fosfomolibdenyum yöntemiyle toplam antioksidan aktivite, 1,1-difenil-2-pikril hidrazil serbest radikali kullanılarak DPPH radikal süpürüm aktivite, CUPRAC ve FRAP testleriyle indirgeme potansiyeli ve Fe(II) iyonları şelatlama aktivite analizleri yapıldı.

Bu testlerden ilki olan fosfomolibdenyum testi, reaktif içerisindeki Mo(VI) iyonlarının özütler varlığında Mo(V) iyonlarına indirgenmesinin spektroskopik olarak takip edilmesi temeline dayanmaktadır. Dolayısıyla ilgili özütünün absorbansının daha yüksek olması o özütün daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu anlamına gelmektedir.

Metanol ve su özütlerinin fosfomolibdenyum yöntemiyle yapılan toplam antioksidan aktiviteleri standart antioksidan olan troluks eşdeğer (TEs) olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.8'de verildi. Bu test sisteminde etanol özütünün (1.16 mmol TEs/g özüt) su özütüne (0.80 mmol TEs/g özüt) oranla hemen

hemen 1.5 kat daha yüksek aktivite sergilediği görüldü ($p < 0.01$). Bu durum Şekil 4.1’de görüleceği üzere metanol özütünün su özütünden daha yüksek toplam fenolik bileşik içeriğine sahip olmasıyla açıklanabilir (toplam fenolik bileşik içeriği bakımından da hemen hemen 1.5 kat).

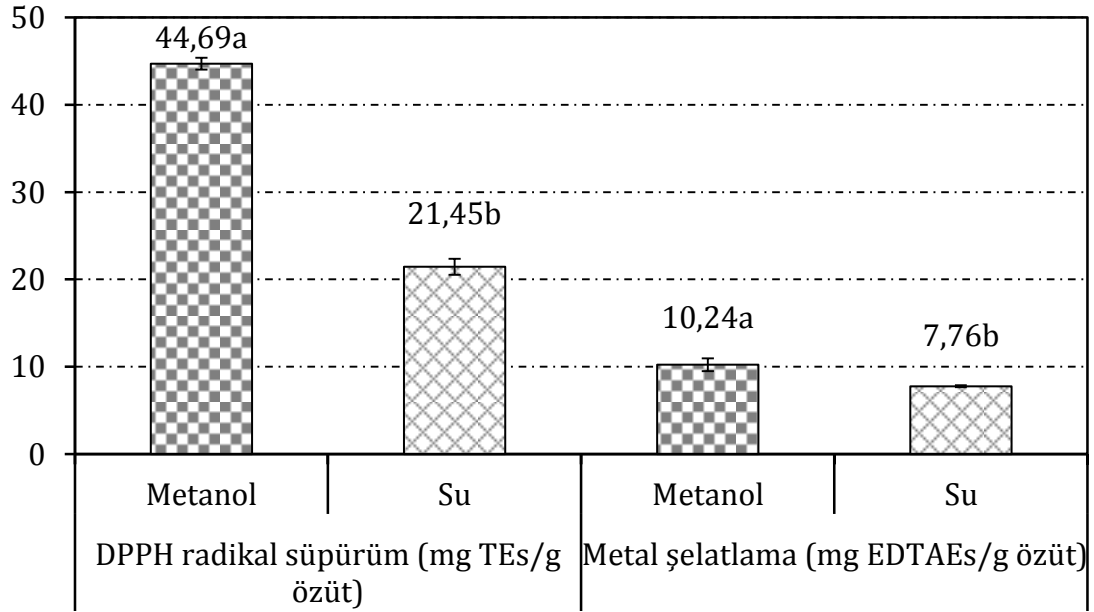
Antioksidan aktivitenin belirlenmeine yönelik bir diğer yöntem olan DPPH radikal süpürüm aktivite testinde, özütler varlığında DPPH serbest radikalinin süpürümü spektroskopik olarak takip edilir. Çünkü DPPH radikali ticari olarak satılmakta ve oda sıcaklığında kararlı bir radikaldir. Özütler içerisindeki radikal süpürücü türler (genellikle hidrojen radikali verebilen türler) DPPH radikaline hidrojen radikali transfer ederek radikali söndürürler. Bu da spektroskopik olarak rahatlıkla takip edilebilmektedir. Özütlerin DPPH radikal süpürüm aktiviteleri troloks eşdeğer olarak hesaplanır ve sonuçlar Şekil 4.9’da verildi.



Şekil 4.8. *Pseudevernia furfuracea* likeni çözücü özütlerinin fosfomolibdenyum yöntemiyle belirlenen toplam antioksidan aktiviteleri (mmol TE/g özüt)

DPPH radikal süpürüm aktivite testinde de metanol özütünün su özütünden daha yüksek aktivite sergilediği tespit edildi (sırasıyla; 44.69 ve 21.45 mg TE/g özüt). Metanol özütünün daha yüksek radikal süpürüm aktivitesi daha yüksek toplam fenolik bileşik içermesinden kaynaklandığı söylenebilir. Literatürde

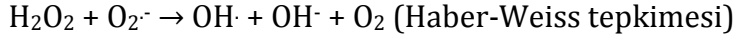
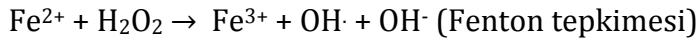
Parmelia saxatilis, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria* ve *Ramalina polymorpha* likenlerinin metanol özütlerinin DPPH radikal süpürüm aktiviteleri üzerine çalışma yapılmış ancak tüm liken türlerinin aktivite sergilemediği rapor edilmiştir (Gulluce vd., 2006). Bir diğer çalışmada ise, çalışmada da *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Evernia prunastri* ve *Neofuscella pulla* likenleri metanol özütlerinin DPPH radikal süpürüm aktiviteleri araştırılmış ve likenler arasında sadece *Dermatocarpon miniatum* likeninin (IC₅₀: 396 µg/ml) radikal süpürüm gösterdiği belirlenmiştir (Aslan vd., 2006). Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlarla literatür verileri arasındaki farklılık temel olarak özütlenme yöntemindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Çünkü yukarıda verilen her iki literatür verisinde de özütlenme soxhlet özütlemesiyle bu çalışmada ise, maserasyon yöntemiyle yapılmıştır.



Şekil 4.9. *Pseudevernia furfuracea* likeni çözücü özütlerinin DPPH radikal süpürüm ve metal şelatlama aktiviteleri

Pseudevernia furfuracea likeni çözücü özütlerinin metal şelatlama kapasitelerinin belirlenmesinde, özütlerin Fe(II) iyonlarını şelatlama aktiviteleri araştırıldı. Çünkü geçiş metallerinin radikal oluşum mekanizmalarını Fenton ve Haber-Wiess tepkimeleriyle tetikleri bilinmektedir. Bu sebeple antioksidan

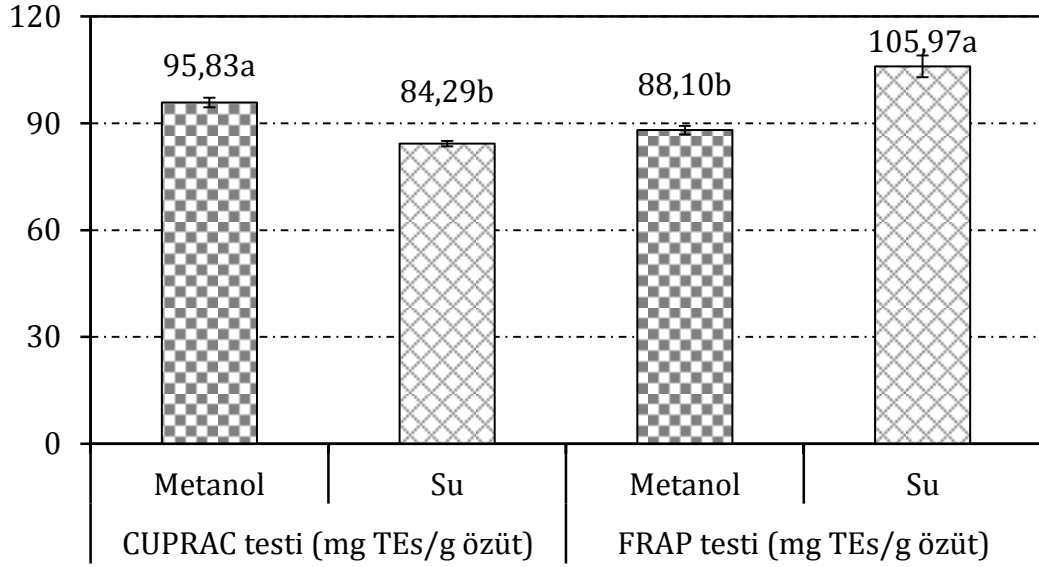
aktivite analizlerinde metal şelatlama aktivitelerinin de belirlenmesi rutin olarak yapılan testler arasındadır.



Metanol ve su özütlerinin Fe(II) iyonları şelatlama kapasiteleri standart şelatlayıcı reaktif olan etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu eşdeğer (EDTAEs) olarak hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.9'da verildi. Tıpkı DPPH radikal süpürüm aktivite testinde olduğu gibi bu test sisteminde de metanol özütünün su özütüne nazaran istatistiksel olarak da anlamlı bir farklılıkla daha yüksek şelatlama yeteneğine sahip olduğu tespit edildi ($p < 0.01$). metanol özütünün daha yüksek şelatlama yeteneği de daha fazla toplam fenolik ve flavonoit bileşik içeriğine sahip olmasıyla açıklanabilir. Çünkü fenolik ve özellikle de flavonoit türü bileşiklerin oldukça iyi şelatlayıcı ajanlar olarak davrandıkları bilinmektedir.

Pseudevernia furfuracea likeni çözücü özütlerinin indirgeme gücü kapasiteleri CUPRAC ve FRAP testleriyle belirlendi. İndirgeme gücü kapasitesi belirleme testlerinin temelinde özütler varlığında CUPRAC testi için Cu(II)/Cu(I) dönüşümü ve FRAP testinde ise Fe(III)/Fe(II) dönüşümünün spektroskopik olarak takip edilmesi yatmaktadır. Özütlerin indirgeme gücü kapasiteleri her iki test için troloks eşdeğer olarak hesaplandı (TEs) ve sonuçlar Şekil 4.10'da verildi.

Metanol özütü (95.83 mg TEs/g özüt) CUPRAC testinde, su özütü (105.97 mg TEs/g özüt) ise FRAP testinde daha yüksek indirgeme gücü kapasitesi sergiledi ($p < 0.01$). Literatürde *P. furfuracea* likeninin indirgeme gücü kapasitesiyle ilgili herhangi bir veri bulunmadığından bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırılamamıştır.



Şekil 4.10. *Pseudevernia furfuracea* likeni çözücü özütlerinin CUPRAC ve FRAP testleriyle indirgeme gücü kapasiteleri

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Isparta ili Şarkikaraağaç ilçesi Kızıldağ ormanlarından toplanan *P. furfuracea* liken örneğinin metanol ve su özütleri hazırlandı. Öncelikli olarak özütleri içerisinde bulunan fenolik ve flavonoit türü bileşikler hem spektroskopik toplam olarak hem de HPLC ile kantitatif olarak karakterize edildi. Metanol özütünün su özütüne oranla daha yüksek toplam fenolik ve flavonoit bileşik içeriğine sahip olduğu görüldü. HPLC ile özütler içerisinde 23 farklı fenolik ve flavonoit türü bileşik araştırılmıştır. Analiz sonucunda metanol özütlerinin hesperidin, kamferol, gallik asit ve eriyodiktiyol bakımından zengin olduğu tespit edildi.

Çalışmanın ikinci kısmında, metanol ve su özütlerinin bazı hastalıkları tetikleyen enzimler üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı. Tirozinaz enzimi hariç diğer enzimler üzerine metanol özütünün daha güçlü inhibisyon aktivite gösterdiği belirlendi.

Tez çalışmasının son kısmında, özütlerin antioksidan aktiviteleri farklı test sistemleri kullanılarak incelendi. Antioksidan aktivite analizlerinde de sadece FRAP testi hariç diğer tüm testlerde metanol özütünün daha güçlü aktivite sergilediği tespit edildi.

Metanol özütünün su özütüne oranla daha yüksek aktivite sergilemesi, bu özütün su özütünden daha yüksek toplam fenolik ve flavonoit bileşik içermesiyle açıklandı.

Sonuçta, *P. furfuracea* liken örneğinin özellikle metanol özütünün invitro şartlarda hem enzim inhibisyon hem de antioksidan aktivite bakımından oldukça yüksek bir kapasiteye sahip olduğu ve *P. furfuracea* likenin gerek çalışılan enzimlerin tetiklediği hastalıkların tedavilerine yönelik gerekse de oksidatif sürecin yönetilmesi amacıyla gıda katkı maddesi olarak alternatif doğal ürünlerin bir kaynağı olabileceği söylenebilir. Ancak yine de özütlerin toksik etkilerinin araştırılması ve araştırmanın in vivo olarak da yapılarak sonuçların birlikte değerlendirilerek nihai bir karara varılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Adams, M.R., Moss, M.O., Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 252-302, 1995.

Akyurt, B., 2014. Ülkemizde Tüketilen Bazı Yenilebilir Yaprakların Antioksidan Ve Antidiyabetik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 64 s, Kayseri.

Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A., 2006. Alpha-Amylase Inhibitory Activity of Some Malaysian Plants Used to Treat Diabetes; With Particular Reference to Phyllanthus Amarus. J Ethnopharmacol., 11;107(3):449-55.

Altuntaş Y: Diabetes Mellitus'un Tanımı, Tanısı ve Sınıflandırılması. Ed. Yenigün M: Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Nobel Tıp Kitapevi, s 51-61, İstanbul 2001.

Alzheimer Type in the Framingham Study, Neurol., 1992, 42, 115-9.

Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E., Ercag, E., 2006. The Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity and Polyphenolic Content of Some Herbal Teas. Int. J. Food Sci. Nutr. 57, 292-304.

- Aydın S., Kınalıoğlu K., 2010. *P. Furfuracea* (L.) Zopf Var. *Furfuracea* ve *Parmelia Tiliaceae* (Hoffm.) Ach. Liken Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi. Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi 1(2), 30-38.
- Bailey J.E., Ollis D.F., 1997. Biochemical Engineering Fundamentals: International Student Edition. Chapter 1-7, p: 39-50.
- Başak S., 2008. Okaliptus (*Eucalyptus Camaldulensis* Dehnh.), Defne (*Laurus Nobilis* L.) Ve Mersin (*Myrtus Communis* L.)'den Elde Edilen Uçucu Yağların, A -Amilaz ile A -Glukozidaza Etkisi ve Antioksidan Özellikleri Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 131 s, Sivas.
- Başak, S., 2008. Okaliptus (*Eucalyptus Camaldulensis* Dehnh.), Defne (*Laurus Nobilis* L.) ve Mersin (*Myrtus Communis* L.)'den Elde Edilen Uçucu Yağların, A -Amilaz ile A -Glukozidaza Etkisi ve Antioksidan Özellikleri. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 131 s, Sivas.
- Beard, C.M., Kökmen, E., Kurland, L.T.: Prevalence of Dementia is Changing Over Time in Rochester, Minnesota, *Neurol.*, 1995, 45, 75-9.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-287.
- Bennett PH, Knowler WC. Çeviren Tanyolaç S: Diabetes Mellitus ve Glikoz Homeostazının Tanımı, Teşhisi ve Sınıflandırılması. Ed. Yumuk V: Joslin's Diabetes Mellitus. İstanbul Tıp Kitapevi, s 331-339, İstanbul 2008.
- Bilgin, S., Kınalıoğlu, K., Aydın, S., 2012. Antimicrobial And Antioxidant Activities Of *Pseudevernia Furfuracea* (L) Zopf. Var. *Furfuracea* and *Evernia Prunastri* Lichens Collected from Black Sea Region. *Gazi University Journal of Science* 25, 557-65.
- Calay, Ö., 2010. Tirozinaz Enziminin Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 86 s, İstanbul
- Cooksey, C. J., Garratt P, J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A., 1997, Evidence Of The İndirect Formation of the Catecholic İntermediate Substrate Responsible for the Autoactivation Kinetics of Tyrosinase, *Journal of Biological Chemistry*, 272, 26226-26235.
- Cömert F., 2012. Bazı Şifalı Bitkilerin Ekonomiye Kazandırılması: Şerbetçi Otu (*Humulus Lupulus* L.) Bitkisinin Antioksidan, Sitotoksik, Enzim Aktif

Özüt ve Bileşenlerinin Belirlenmesi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 213 S, Çanakkale.

Çınar, E., 2007. İnek Sütünden İzole Edilen Bacillus Sp.' Den Pullulanaz ve A-Amilaz Enzimlerinin Üretimi, Bu Enzimlerin Bazı Optimizasyon Koşullarının Belirlenmesi Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 60s, Diyarbakır.

Çobanoğlu G., Doğada ve Tıpta Likenler, Sağlık Çevre Kültürü, Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesi Süreli Yayını, 6 (2012) 4-7.

Dasgupta, A., Bernard, D., 2006. Herbal Remedies: Effects on Clinical Laboratory Tests. Arch. Pathol. Lab. Med., 130(4):521-8.

Dawn BM., Allan DM., Colleen MS. (1996). Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach. Seneca Valley Books & Paper Collectibles, New York, 806 s.

Dilsizoğlu A., Kavuncuoğlu Z., Oba D., Çobanoğlu G., Eski Ve Yeni Kullanım Alanları Bilinmeyen Yönleriyle Likenler, Bilim ve Teknik, (2004) 86-89.

Dooley, M., 2007. Integration of Traditional and Complementary Therapies. Menopause Int., 13(4):195.

Dubick, M.A., 1986. Historical Perspectives on the Use of Herbal Preparations to Promote Health. J Nutr., 116(7):1348-54.

Ece, A., 2015. A Computational Insight into Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of A New Lichen Depsidone 1Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Biruni University, _ Istanbul, Turkey And 2Department of Life Sciences, Institute for Multidisciplinary Research - IMSI, University of Belgrade, Belgrade, Serbia.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A New And Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.

Epsin, J. C., Morales, M., Varon, R., Tudela, J., Canovas, F.G., 1995, Monophenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Verdedoncella Apple, Journal of Agricultural And Food Chemistry, 43, 2807-2812.

Fadıloğlu, S., Erkmen, O., Lipase Production By Rhizopus Oryzae Growing on Different Carbon and Nitrogen Sources. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 1936-1938, 1999.

Fiorentino, D., Gallone, A., Fiocco, D., Palazzo, G., & Antonia, M. (2010). Mushroom Tyrosinase in Polyelectrolyte Multilayers as An Optical

Biosensor for O- Diphenols. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 2033–2037.

Forette, F., Boller, F.: *Alzheimer Hastalığında İlaç Geliştirilmesi: Tarihçesine Bakış ve Geleceğine İlişkin Öngörüler* In: “Alzheimer Hastalığının Farmakoterapisi”, (Gauthier, S., Ed.), Pp. 1-15, Yelkovan Yayıncılık, İstanbul (2000).

Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K.: The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer’s Disease: A Review of Progress, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1999, 66, 137-47.

Giacobini, E.: Cholinesterase Inhibitors: *From Preclinical Studies to Clinical Efficacy in Alzheimer Disease* In: “Enzymes of the Cholinesterase Family (Quinn, D., Balasubramaniam, A.S., Doctor, B.P., Taylor, P., Eds.), Pp. 463-9, Plenum Press, New York (1995).

Gilani, A.H, Rahman, A.U., 2005, Trends in Ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.*, 100(1-2):43-49.

Godfrey, T., West, S., Introduction To Industrial Enzymology. *Industrial Enzymology (Second Edition)*. Ed. By T. Godfrey And S. West. Stockton Press, New York, 1996.

Gulluce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adiguzel, A., Agar, G., & Sokmen, A. (2006). Screening the Antioxidant And Antimicrobial Properties of the Lichens *Parmelia Saxatilis*, *Platismatia Glauca*, *Ramalina Pollinaria*, *Ramalina Polymorpha* and *Umbilicaria Nylanderiana*. *Phytomedicine*, 13(7), 515-521.

Gulluce, M., Aslan, A., Sokmen, M., Sahin, F., Adiguzel, A., Agar, G., & Sokmen, A. (2006). Screening the Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Parmelia Saxatilis*, *Platismatia Glauca*, *Ramalina Pollinaria*, *Ramalina Polymorpha* and *Umbilicaria Nylanderiana*. *Phytomedicine*, 13(7), 515-521.

Guvenc A, Akkol EK, Suntar I, Keles H, Yildiz S, Calis I. Biological Activities of *Pseudoevernia Furfuracea* (L.) Zopf Extracts and Isolation of the Active Compounds. *J Ethnopharm* 2012;144:726-34.

Guvenc, A., Akkol, E.K., Suntar, I., Keles, H., Yildiz, S., Calis, I., 2012. Biological Activities of *Pseudoevernia Furfuracea* (L.) Zopf Extracts and Isolation of the Active Compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 144, 726-34.

- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T.L., 1998. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) As Biological Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 46,1887–1892.
- Hamdan, I.I., Afifi, F.U., 2004. Studies on the in Vitro and in Vivo Hypoglycemic Activities of Some Medicinal Plants Used in Treatment of Diabetes in Jordanian Traditional Medicine. *J Ethnopharmacol.*, 93(1):117-21.
- Hocaoğlu, N., 2011. Uludađ'da (Bursa) Yayılış Gösteren *Titrek Kavak (Populus Tremula L.)* Üzerindeki Epifitik Liken Çeřitliliđinin Belirlenmesi Uludađ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 114 s, Bursa
- Ikegami, F., Sumino, M., Fujii, Y., Akiba, T., Satoh, T., 2006. Pharmacology And Toxicology Of Bupleurum Root-Containing Kampo Medicines in Clinical Use. *Hum Exp Toxicol.*, 25(8):481-94. Review.
- John, F.K., Enzyme Technology (H.J. Rehm., G. Reed, Editors). *Biotechnology*, 7A: 37-62, 1987.
- Joulain D, Tabacchi R. Lichen Extracts As Raw Materi- Als in Perfumery. Part 2: Treemoss. *Flavour Frag J* 2009;24:105–16.
- Kamarlı, H., 2009. Oral Antidiyabetik Kullanan Tip 2 Diabetes Mellitus' Lu Hastalarda Tıbbi Beslenme Tedavisi ile Karbonhidrat Sayımı Yöntemlerinin Kan Şekeri Regölasyonu, Kan Yağları ve Beden Kitle İndeksi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 58 s, Antalya.
- Kapucu, N.C., 2003. Lipaz Enziminin Katalizlediđi Bir Ester Üretiminin Süper Kritik Karbondioksitte İncelenmesi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Kemper, K.J., Shannon, S., 2007. Complementary and Alternative Medicine Therapies to Promote Healthy Moods. *Pediatr Clin North Am.*, 54(6):901-26. Review.
- Kıran F., Yıldız A., Osmanađaođlu Ö., 2013. Bazı Liken Örneklerinin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 43 (3), 97- 103.
- Kim, Y.M., Jeong, Y.K., Wang, M.H., Lee, W.Y., Rhee, H.I., 2005. Inhibitory Effect Of Pine Extract on Alpha-Glucosidase Activity and Postprandial Hyperglycemia. *Nutrition.*, 21(6):756-61.
- Klein, S.M., Cohen, G., Cederbaum, A.I., 1991. Production of Formaldehyde During Metabolism of Dimethyl Sulphoxide By Radical Generating System. *Biochemistry* 20, 6006–6012.

- Koçak, M.Sefa., 2015. Üç *Stachys* Taksonun Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 105 s, Isparta.
- Krishnarau, L., Hosney, R.C., Enzymes Increase Loaf Volume of Bread Supplemented With Starch Tailigs and Insoluble Pentosans. Journal of Food Science, 59, 1251-1254, 1994.
- Lee, B.H., Fundamentals Of Biotechnology, VCH Publishers, USA, 431 p, 1996.
- Marcocci, L., Maguire, J.J., Droy-Lefaix, M.T., Packer, L., 1994. The Nitric Oxide Scavenging Property *Ginkgo Biloba* Extract Egb76j. Biochemical and Biophysical Research Communications 201, 748-755.
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Valette, F.M.: Molecular And Cellular Biology of Cholinesterases, Prog. Neurobiol., 1993, 41, 31-91.
- Mitrovic, T., Stamenkovic, S., 2014. Platismatia Glauca And Pseudevernia Furfuracea Lichens as Sources of Antioxidant, Antimicrobial and Antibiofilm Agents Department of Biology and Ecology, Faculty of Science And Mathematics, University Of Niš, 33, Višegradska, 18000 Niš, Serbia.
- Muggia, L., Schmitt, I., Grube, M., 2009. Lichens as Treasure Chests of Natural Products. Sim News 59, 85-97.
- Nakipoğlu M. ve Otan H., 1992. Tıbbi Bitkilerin Flavonitleri, Journal Of AARI, 4 : 70-93.
- Odabaşoğlu F., 2001. Likenler, Pharma Şark Dergisi 3, 16-19.
- Öz, D., 2013. Anamur (Mersin) İlçesinin Liken Çeşitliliği Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 150 s, Mersin.
- Özçelik S., 2009. Genel Mikrobiyoloji, 3. Baskı, Süleyman Demirel Üniversitesi, 1, Isparta.
- Özenoğlu S., Aydoğdu G., Dinçsoy A. B., Taghidizaj A. A., Derici K., Ve Diğ., Liken Sekonder Bileşiklerinin Farklı İnsan Kansere Hücre Tipleri Üzerine Antikanserojenik Etkisi, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 70 (4) (2013) 215-226
- Özer, H., 2012. Alzheimer Hastalığında Oluşan B-Amiloid Fibrillerin Yeni Sentezlenen Kolinesteraz İnhibitörleri ile Destabilizasyonu Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 89 s, Ankara.

- Parvez, S., Kang, M., Chung, H-S., Bae, H., 2007, Naturally Occurring Tyrosinase Inhibitors: Mechanism And Applications in Skin Health, Cosmetic and Agriculture Industries, *Phytotherapy Research*, 21, 805-816.
- Paulo, A. C., Gubitz, G. M., *Textile Processing with Enzymes*. Crc Press, Cornwall, England. Isbn 1 85573 610 1, 2003.
- Polatoğlu, İ., 2012. Preparation of Tyrosinase Immobilized Chitosan and Gelatin Films for Detection of Parathion-Methyl İzmir Mühendislik ve Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.
- Quinn, D.M.: Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics and Virtual Transition States, *Chem. Rev.*, 1987, 87, 955-79.
- Rahman A., Choudhary M. I., Thomsen W. J., 1999. *Bioassay Tecniques For Drug Development*, Harwood Acedemic Publishers.
- Ray, B., *Fundamental Food Microbiology*. Crc Press, Inc., New York, Pp. 169-180, 1996.
- Rinsema T. J., 1999. One Hundred Years of Aspirin, *Medical History*, 43: 502-507.
- Sarikurkcu, C., Eryigit, F., Cengiz, M., Tepe, B., Cakir, A., Mete, E., 2012. Screening of the Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extract of *Mentha Pulegium* L. From Turkey. *Spectroscopy Letters*, 45, 352-358.
- Sarikurkcu, C., Uren, M. C., Tepe, B., Cengiz, M., Kocak, M. S., 2014. Phenolic Content, Enzyme Inhibitory and Antioxidative Activity Potentials of *Phlomis Nissolii* And *P. Pungens* Var. *Pungens*. *Industrial Crops and Products*, 62, 333-340.
- Selinheimo, E. (2008). *Tyrosinase and Laccase as Novel Crosslinking Tools for Food Biopolymers*. Helsinki.
- Sertürner F. W., 1805, *J. Pharmacie*, 13: 234-236.
- Syu M.J., Chen, Y.H., A Study on the A-Amylase Fermentation Performed By *Bacillus Amyloliquefacien*. *Chemical Engineering Journal*, 65: 237-247, 1997.
- Şirin, N., 2015. *Ramalina Farinacea (L.) Ach. ve Usnea İntermedia (A.Massal.) Jatta* Likenlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri Üzerine Araştırmalar Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 66s, Düzce.

- Türker C., 2014. A-Amilaz Enzimlerini Üreten Termofilik Bacillus Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 83 s, Osmaniye.
- Türker, C., 2014. A-Amilaz Enzimlerini Üreten Termofilik Bacillus Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, 83 s, Osmaniye.
- Vanni, A., Gastaldi, D., & Giunata, G., 1990. Kinetic Investigations on the Double Enzymatic Activity of the Tyrosinase Mushroom. *Annali Di Chimica*, 80, 35-60.
- Whitaker, J.R., 1994, *Principles of Enzymology for the Food Sciences Second Edition*, Marcel Dekker, Inc., New York-America, Pp. 517-520. Witkop, G.J., 1985, *Inherited Disorders of Pigmentation*, *American Journal of Clinical Dermatology*, 3, 70 -13.
- Wiseman A., 1987. *Handbook of Enzyme Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry* P. 274-373.
- Xie, L.P., Chen, Q.X., Huang, H., Wang, H.Z., & Zhang, R.Q. (2003). Inhibitory Effects of Some Flavonoids on the Activity Of Mushroom Tyrosinase. *Biochemistry (Moscow)*, 68, 487-491.
- Yavaşoğlu, M., 2012. Bazı Şifalı Bitkilerin Ekonomiye Kazandırılması: *Tere (Lepidium Sativum L.)* Bitkisinin Antioksidan, Sitotoksik, Enzim Aktif Özüt ve Bileşenlerinin Belirlenmesi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 111 s, Çanakkale.
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., 2014. *Sideritis Galatica* Bornm.: A Source of Multifunctional Agents for the Management of Oxidative Damage, Alzheimer's's and Diabetes Mellitus. *Journal of Functional Foods*, 11, 538-547.
- Zhang, X., 2002. *Who Traditional Medicine Strategy 2002-2005*. World Health Organization: Geneva, Switzerland.



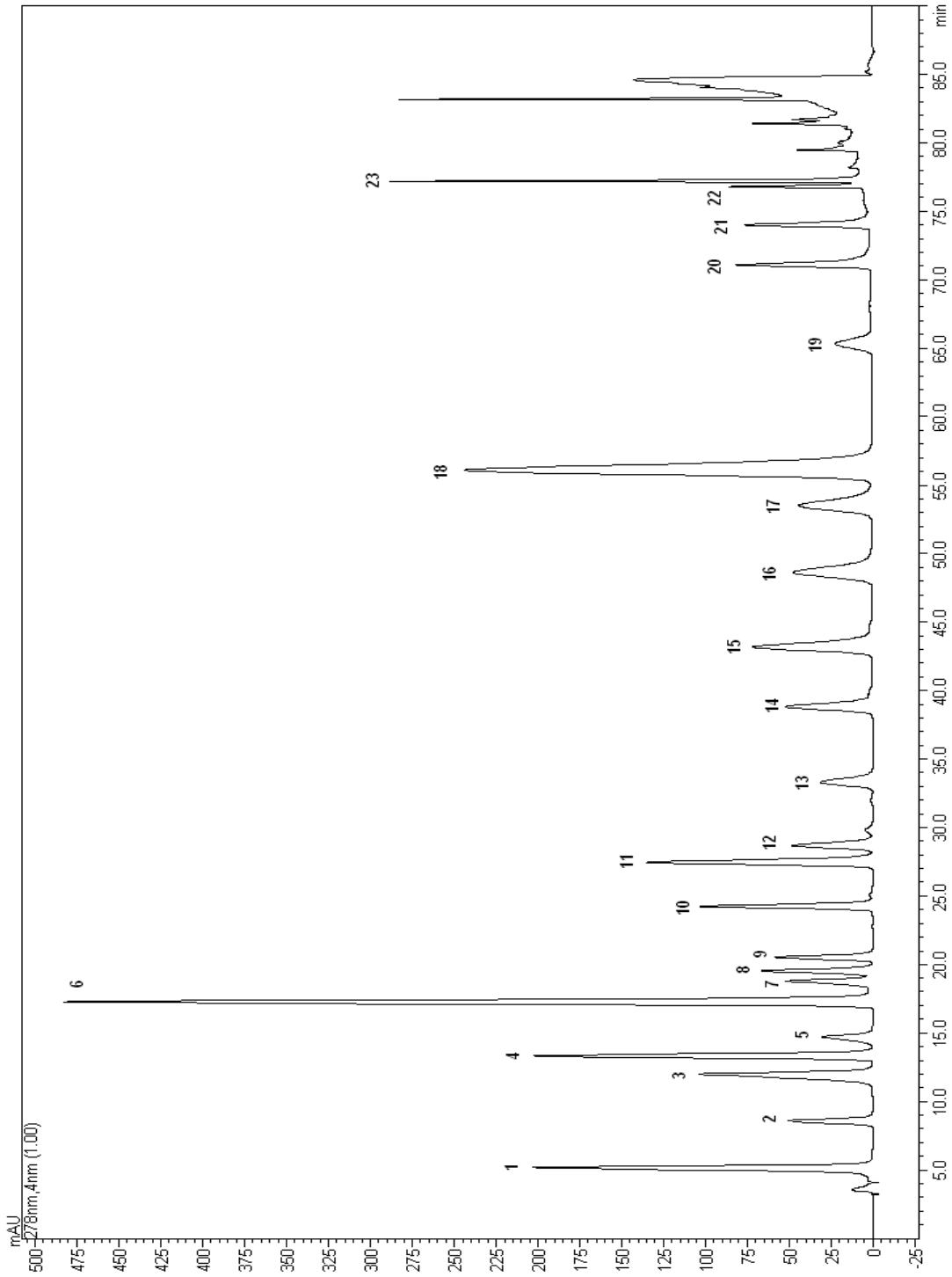
EKLER

EK A. Standart Fenoliklerin RP-HPLC Kromatogramları

EK B. *Pseudevernia furfuracea* Çözücü Özülerinin RP-HPLC Kromatogramları

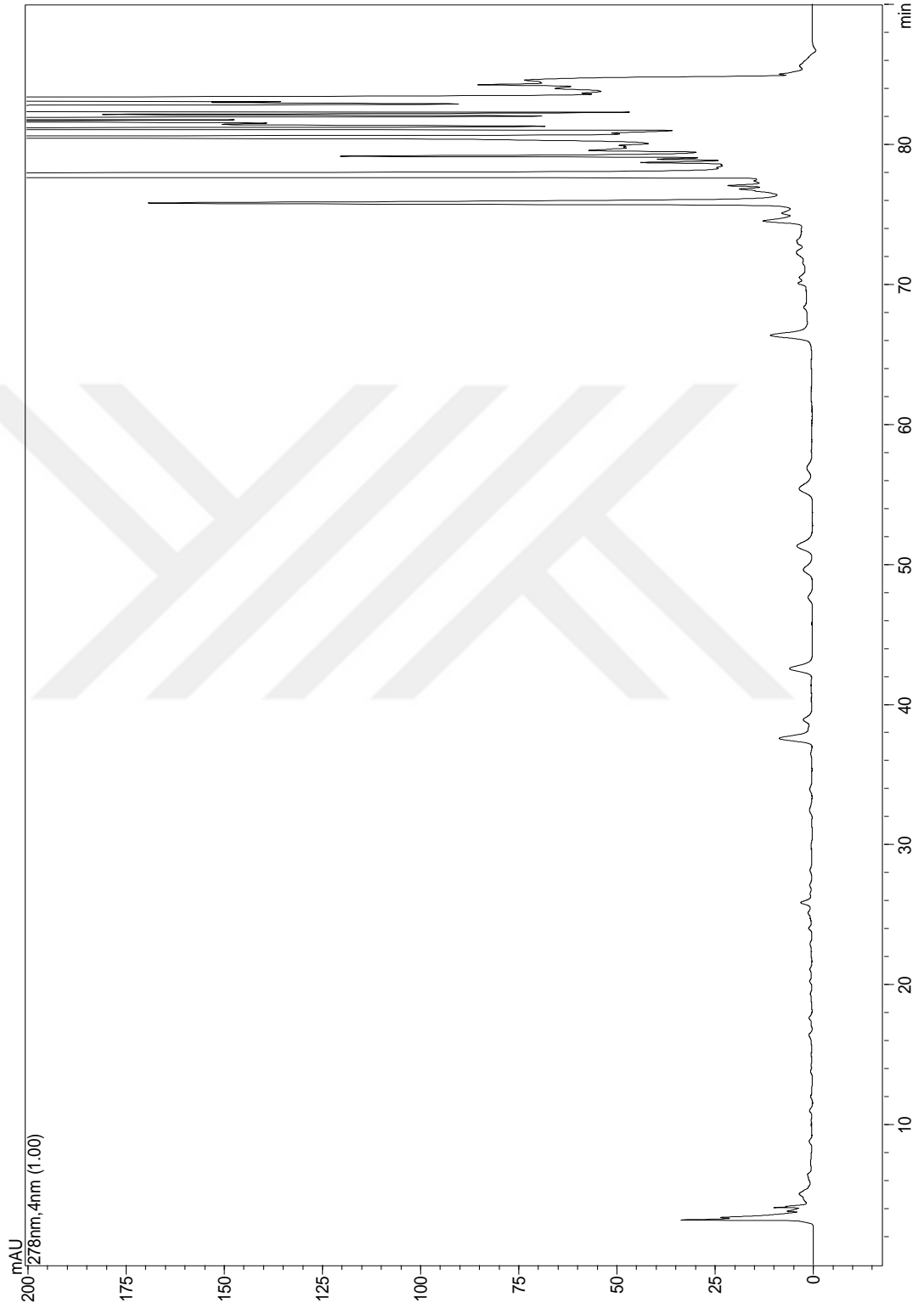


EK A. Standart Fenoliklerin RP-HPLC Kromatogramları

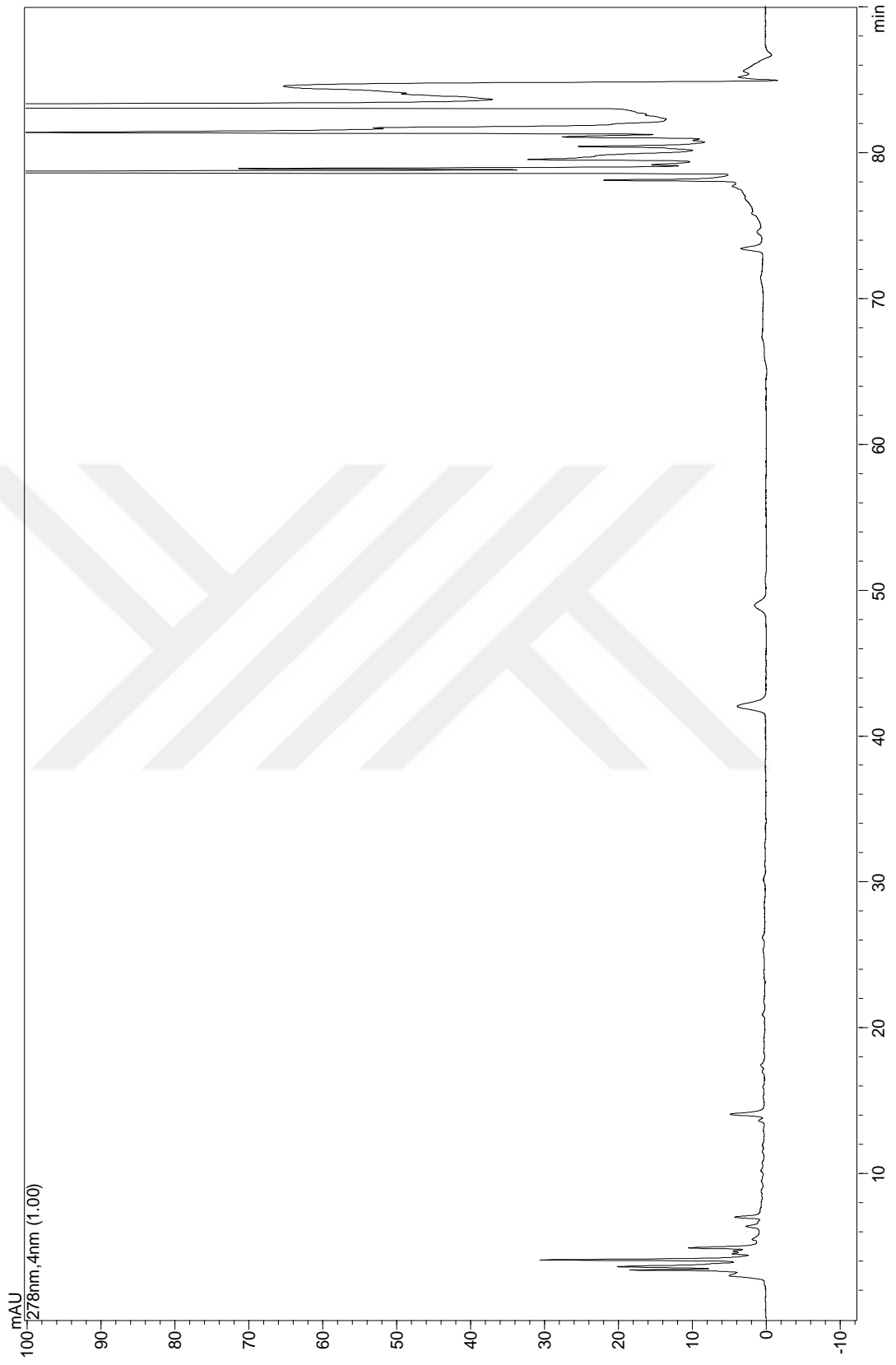


Şekil A.1. Standart fenolik bileşiklerin RP-HPLC kromatogramları (1. Gallik asit, 2. Protokateşik asit, 3. (+)-Kateşin, 4. p-Hidroksibenzoik asit, 5. Klorojenik asit, 6. Kafeik asit, 7. (-)-Epikateşin, 8. Şiringik asit, 9. Vanilin, 10. p-Kumarik asit, 11. Ferulik asit, 12. Sinapinik asit, 13. Benzoik asit, 14. o-Kumarik asit, 15. Rutin, 16. Hesperidin, 17. Rosmarinik asit, 18. Eriodiktiol, 19. Sınnamik asit, 20. Kuersetin, 21. Luteolin, 22. Kamferol, 23. Apigenin)

EK B. *Pseudevernia furfuracea* Çözücü Özütlerinin RP-HPLC Kromatogramları



Şekil B.1. *Pseudevernia furfuracea* metanol özütü RP-HPLC kromatogramı



Şekil B.2. *Pseudevernia furfuracea* su özütü RP-HPLC kromatogramı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Çiğdem ÖCAL

Doğum Yeri ve Yılı : Isparta, 1990

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : cigdem.ocal32@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Isparta Şaik Lisesi, 2008

Lisans : Bozok Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,
2013