

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

KOZMETİK AMAÇLI KULLANIM İÇİN KIR
MENEKŞESİ' NDE (*Viola odorata*) BAZI
BİYOKİMYASAL AKTİVİTELERİN ARANMASI VE
TANIMLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE DEMİRAY

ARALIK 2013

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

KOZMETİK AMAÇLI KULLANIM İÇİN KIR
MENEKŞESİ' NDE (*Viola odorata*) BAZI
BİYOKİMYASAL AKTİVİTELERİN ARANMASI VE
TANIMLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞE DEMİRAY

ARALIK 2013

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

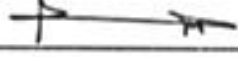
AYŞE DEMİRAY tarafından hazırlanan **KOZMETİK AMAÇLI KULLANIM İÇİN KIR MENEKŞESİ'NDE (*Viola odorata*) BAZI BİYOKİMYASAL AKTİVİTELERİN ARANMASI ve TANIMLANMASI** başlıklı tezinin, 09/12/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Yaşar DEMİR (Jüri Başkanı)

Kimya Anabilim Dalı,
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Burdur

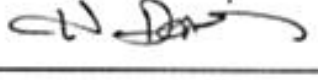
İmza:



Prof. Dr. Nazan DEMİR (Danışman)

Biyokimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

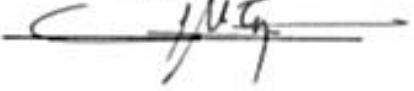
İmza:



Doç. Dr. Mustafa TEKE (Üye)

Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

~~Prof. Dr. Gül Afiye AYÇİÇEK~~ V. Doç. Dr. Ü. Anık

Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

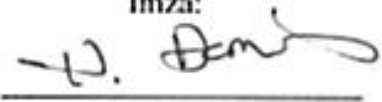
İmza:



Prof. Dr. Nazan DEMİR

Danışman, Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:



Savunma Tarihi: 09/12/2013

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.

Ayşe DEMİRAY

09/12/2013

(İmza)



ÖZET

KOZMETİK AMAÇLI KULLANIM İÇİN KIR MENEKŞESİNDE (*Viola odorata*) BAZI BİYOKİMYASAL AKTİVİTELERİN ARANMASI VE TANIMLANMASI

Ayşe DEMİRAY

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nazan DEMİR

Aralık 2013, 88 sayfa

Kozmetik sektörü gelişmeye açık bir alan olup, çok büyük bir tüketici kitlesine hitap etmektedir. Bu tüketici kitlesi gün geçtikçe daha da artmaktadır. Alanın bu kadar hızlı gelişmesi ve tüketici kesimin artması insan sağlığı açısından bazı sorunlara neden olmaktadır. Bu sorunlara karşı önlem almak isteyen tüketicilerin tercihleri hızlı sonuç alınan bitkisel kökenli organik ürünlerin lehine değişmektedir. Bu da üreticileri bu doğrultuda üretilen inovatif ürünlere yöneltmektedir.

Bu çalışmada Muğla yöresinde doğal olarak yetişen kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden proteaz enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi ve CM-selüloz iyon değişim kromatografisi ile kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE elektorofezi uygulandı.

Enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenerek 5 farklı substrat için K_M ve $V_{\max}$ değerleri belirlendi. En yüksek aktivitenin pH:7,0' de ve 40 °C' de olduğu gözlemlendi. Kazein, hemoglobin ve azokazein için K_M ve $V_{\max}$ değerleri belirlendi.

Yine enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM SDS, EDTA, β -merkaptotanol bileşiklerinin ve 10 mM, 1 mM, 0,1 mM Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} kationlarının etkisi araştırıldı.

Taze bitkiden alınan ekstrelerde organik bileşen analizi yapıldı. Buna göre % 38 1-octen-3-ol, % 19,3 2-Hexenal ve % 13,3 1-Hexanol içerdiği belirlendi. 1-Hexanol nem tutucu, kıvam artırıcı özelliğe sahip olan ve bitkiye güzel kokusunu veren aromatik bir bileşen olup nemlendirici ürünler için bitkiyi ideal kılmaktadır.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden elde edilen ekstrelerde demir indirgeme gücü belirlendi, DPPH' serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi, metal şelat aktivitesi, H_2O_2 uzaklaştırma aktivitesi ve fenolik bileşiklerin belirlenmesi tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar doğal ve sentetik olarak bulunan standartlarla karşılaştırıldığında yüksek aktivite gösterdiği belirlendi.

Ayrıca çiçekten alınan ekstrelerde suda çözünen vitaminler ile A, D, E ve K vitamin analizi yapıldı. Analiz sonuçlarına göre antioksidan aktivite gösteren bazı önemli vitaminler içerdiği bulundu.

Bu sonuçlar menekşeden yeni bitkisel kaynaklı cilt bakım ürünleri geliştirilmesine imkan tanımıştır. Proteaz enziminin varlığı tasarlanan ürüne peeling işlemi özelliği katacaktır. 1-Hexanol bileşiğinin nem tutma ve kıvam artırıcı özelliği tasarlanan nemlendiricinin etkisini arttıracaktır. Antioksidan özellikli olması ve vitamin içermesi yaşlanmayı geciktirici bir etki yaratacaktır.

Anahtar kelimeler: proteaz, kır menekşesi (*Viola odorata*), karakterizasyon, kozmetik, saflaştırma

ABSTRACT

INVESTIGATION AND DETERMINATION OF SOME BIOCHEMICAL ACTIVITIES OF SWEET VIOLET (*Viola odorata*) TO USE IN COSMETIC

Ayşe DEMIRAY

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Nazan DEMİR

December 2013, 88 pages

The cosmetics industry has a big potential for development, it is related with very large consumer group. The quantity of this consumer group increases day by day. Rapid development of industry and increase in number of consumers result in some problems on human health. Prefers of consumers who want to avoid these problems are changing towards to organic products with plant origin that gives result rapidly. So manufacturers also are directed to these kind of innovative products.

In this study, protease enzyme obtained from garden violet flowers (*Viola odorata*) which has grown spontaneously in Muğla region is purified and characterised. For determination of purity of protease enzyme which was purified from garden violet flowers (*Viola odorata*) by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and CM-cellulose ion exchange chromatography SDS-PAGE electrophoresis has been applied.

Optimum pH and temperature values of enzyme has been found and K_M and $V_{\max}$ values for 5 different substrates has been determined. It is observed that the highest activity is at Ph: 7,0 and 40 °C. K_M and $V_{\max}$ values for casein, hemoglobin and azocasein has been determined.

The effects of 10 mM, 1 mM, 0,1 mM SDS, EDTA, β -mercaptoethanol compounds and 10 mM, 1 mM, 0,1 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} cations on enzyme activity has been investigated.

Organic component analysis was performed in extracts of fresh plant and it was determined that the extract contains 38 % 1-octen-3-ol, 19,3 % 2-hexenal and 13,3 % 1-hexanol. 1-hexanol is an aromatic compound that has scent and some properties such as humectant, stabilizer. So, these properties makes ideal this compound for moisturizer products.

Iron reduction potential of the extracts from garden violet flowers (*Viola odorata*), DPPH $\cdot$ free radical scavenging activity, metal chelate activity, H_2O_2 scavenging activity and phenolic compound profile has been determined. The results show that these activities are high compared to natural and synthetic standarts.

In addition, vitamin analyses of extracts from flowers has been performed and some important vitamins which has antioxidant activity were determined.

These results show that it is possible to develop skin care products with plant origin. Presence of protease enzyme provides peeling process property to the product designed. Humectant and stabilizer properties of 1-hexanol increase the effect of moisturizer product. Antioxidant properties and vitamin content of the products also provide anti-aging effect.

Keywords: protease, sweet violet (*Viola odorata*), characterization, cosmetic, purification

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin başından sonuna kadar bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan danışman hocam **Prof. Dr. Nazan DEMİR'e**; deneysel çalışmalarım da aktardığı fikirleri ve bilgi birikimiyle tezime farklı açılardan yaklaşımamı sağlayan, tecrübe ve bilgilerini benden esirgemeyen hocam **Prof. Dr. Yaşar DEMİR'e**; kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinin UPLC-MS/MS, HPLC-DAD, GC/MSD çalışmalarını büyük bir titizlikle yapan **Uzman Dr. İbrahim KIVRAK'a**,

Teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma konusu Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 12/134 ve 13/90 nolu proje ile desteklenmiştir. Desteği için Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam.....	1
1.2. Literatür Özeti	2
1.2.1. Enzimler hakkında genel bilgiler	2
1.2.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması.....	6
1.2.2. Antioksidanlar hakkında genel bilgiler.....	7
1.2.2.1. Antioksidanların sınıflandırılması	9
1.2.3. Aroma bileşenleri hakkında genel bilgiler.....	9
1.2.4. Vitaminler hakkında genel bilgiler	10
1.2.4.1. Tiamin (B ₁ vitamini).....	10
1.2.4.2. Riboflavin (B ₂ vitamini).....	11
1.2.4.3. Nikotinamid (B ₃ vitamini)	11
1.2.4.4. Pantotenik Asit (B ₅ vitamini).....	12
1.2.4.5. Piridoksin (B ₆ vitamini).....	13
1.2.4.6. Biotin (B ₇ vitamini)	13
1.2.4.7. Folik asit (B ₉ vitamini).....	14
1.2.4.8. Kobalamin (B ₁₂ vitamini)	14
1.2.4.9. Askorbik asit (C vitamini)	15
1.2.4.10. A vitamini (Retinol).....	15
1.2.4.11. D vitamini.....	16
1.2.4.12. E vitamini	17
1.2.4.13. K vitamini	17
1.3. Dünyada ve Türkiyede Kır Menekşesi (<i>Viola odorata</i>)	18
2. MALZEME ve YÖNTEMLER.....	20
2.1. Malzemeler	20
2.1.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	20

2.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	20
2.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları	21
2.1.3.1. Homojenat elde etmek için kullanılan tampon çözelti	21
2.1.3.2. Coomassie brilant blue G–250 renk reaktifi	21
2.1.3.3. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan tampon	21
2.1.3.4. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi	21
2.1.3.5. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan çözelti	22
2.1.3.6. Enzimleri diyaliz etmek için kullanılan tampon	22
2.1.3.7. İyon değişim kolonu (CM-Selüloz) dengeleme tamponu	22
2.1.3.8. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan ayırma jelinin hazırlanması	22
2.1.3.9. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan yığma jelinin hazırlanması	22
2.1.3.10. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan numune tamponu	23
2.1.3.11. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu	23
2.1.3.12. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan fiksatif çözeltisi	23
2.1.3.13. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan boyama çözeltisi	23
2.1.3.14. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan renksizleştirme çözeltisi	23
2.1.3.15. Optimum pH çalışması için kullanılan pH' sı 4–9 arasında olan tampon çözeltiler	23
2.1.3.16. Substrat spesifikliğin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler	24
2.1.3.17. Proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin araştırılması için kullanılan çözeltiler	24
2.1.3.18. Proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin araştırılması için kullanılan çözeltiler	25
2.1.3.19. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan tampon çözelti	26
2.1.3.20. İndirgeme gücü tayini için kullanılan çözeltiler	26
2.1.3.21. Serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi tayini için kullanılan çözeltiler	27
2.1.3.22. Metal şelat aktivitesi tayini için kullanılan çözeltiler	27
2.1.3.23. H ₂ O ₂ uzaklaştırma aktivitesi tayini için kullanılan çözeltiler	27
2.1.3.24. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler	27
2.2. Yöntemler	27
2.2.1. Protein tayini	27
2.2.1.1. Kalitatif protein tayini	27

2.2.1.2. Bradford yöntemiyle protein tayini	28
2.2.2. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) proteaz enziminin saflaştırılması	28
2.2.2.1. Örneklerinin toplanması	28
2.2.2.2. Homojenatın hazırlanması	28
2.2.2.3. Amonyum sülfat çöktürmesi	29
2.2.2.4. Diyaliz	29
2.2.2.5. CM-Selüloz iyon değişim kolonunun hazırlanması.....	30
2.2.2.6. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) elde edilen homojenatın CM-Selüloz iyon değişim kolonuna tatbiki ve proteaz enziminin elüsyonu	30
2.2.3. Proteaz enzimi için aktivite tayini	31
2.2.4. SDS-PAGE ile alt birimlerin belirlenmesi	31
2.2.5. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi üzerine kinetik çalışmalar	32
2.2.5.1. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	33
2.2.5.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	33
2.2.5.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini	33
2.2.5.4. Enzimin V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi	34
2.2.5.5. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğin belirlenmesi	34
2.2.5.6. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin incelenmesi.....	35
2.2.5.7. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin araştırılması	36
2.2.6. Aroma verici uçucu organik bileşenlerin Headspace GC/MSD ile belirlenmesi	36
2.2.7. Kır Menekşesinin (<i>Viola odorata</i>) Vitamin Miktarlarının Belirlenmesi..	37
2.2.7.1. B grubu ve C vitamin içeriğinin UPLC-MS/MS ile belirlenmesi.....	37
2.2.7.2. A, D, E ve K grubu vitaminlerinin HPLC-DAD ile belirlenmesi.....	38
2.2.9. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde antioksidan aktivite tayini	39
2.2.9.1 Ekstrelerin hazırlanması	39
2.2.9.2. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde indirgeme gücü tayini.....	39
2.2.9.3. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi tayini	40
2.2.9.4. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde metal şelat aktivitesi tayini	40
2.2.9.5. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde H_2O_2 uzaklaştırma aktivitesi tayini	41

2.2.9.6. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi.....	41
3. BULGULAR ve İRDELEME	42
3.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri.....	42
3.2. Kır Menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) Proteaz Enzimi Saflaştırılması Sonuçları	42
3.2.1. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) proteaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırılması sonuçları	43
3.2.2. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) proteaz enziminin CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	43
3.2.3. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) proteaz enziminin saflaştırma basamakları sonuçları	44
3.2.4. SDS-Poli akrilamid jel elektroforezi sonuçları.....	44
3.3. Kır Menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Üzerine Yapılan Kinetik Çalışmaların Sonuçları	46
3.3.1. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH sonuçları	46
3.3.2. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları	46
3.3.3. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları.....	47
3.3.4. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratına karşı V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi	49
3.3.5. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğin belirlenmesi.....	49
3.3.6. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin belirlenmesi	51
3.3.7. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin belirlenmesi.....	57
3.4. Aroma Bileşenlerinin Headspace GC/MSD İle Analiz Sonuçları.....	59
3.5. Kır Menekşesinin (<i>Viola odorata</i>) Vitamin Miktarlarının Belirlenmesi.....	60
3.5.1. B grubu ve C vitaminlerinin UPLC-MS/MS ile analiz sonuçları.....	60
3.5.2. A, D, E ve K vitaminlerinin HPLC-DAD ile analiz sonuçları	62
3.6. Kır Menekşesi (<i>Viola odorata</i>) Bitkisinde Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları	65
3.6.1. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde indirgeme gücü tayini sonuçları	65
3.6.2. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi tayini sonuçları	65

3.6.3. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde metal şelat aktivitesi tayini sonuçları	66
3.6.4. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde H ₂ O ₂ uzaklaştırma aktivitesi tayini sonuçları	66
3.6.5. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinde toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi	67
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	69
KAYNAKLAR	74
EKLER.....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Headspace GC/MSD cihaz analiz parametreleri.....	36
Çizelge 2.2 Acquity UPLC cihaz analiz şartları	38
Çizelge 2.3 Xevo TQ-S MS/MS cihaz analiz şartları	38
Çizelge 2.4 HPLC-DAD cihaz analiz şartları	39
Çizelge 3.1 CM-Selüloz kolonunda kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) elde edilen proteaz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve homojenattan saflaştırılan proteaz enziminde enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.	44
Çizelge 3.2 Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğı sonuçları	51
Çizelge 3.3 Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin sonuçları	56
Çizelge 3.4 Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin sonuçları.....	59
Çizelge 3.5 Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinin aroma verici bileşenleri yüzdeleri	60
Çizelge 3.6 Kır menekşesinde (<i>Viola odorata</i>) bulunan, suda çözünebilen vitaminlerin UPLC-ESI-MS/MS ile analiz sonuçları (mg/100g kuru ağırlık $\pm$ standart sapma).	61
Çizelge 3.8 Serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi sonuçları	66
Çizelge 3.9 Metal şelat aktivitesi tayini sonuçları	66
Çizelge 3.10 H ₂ O ₂ uzaklaştırma aktivitesi sonuçları	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Coomassie brilliant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik.....	42
Şekil 3.2. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği.....	43
Şekil 3.3. CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı	45
Şekil 3.4. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	46
Şekil 3.5. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	47
Şekil 3.6. Standart proteinlerden* hazırlanmış olan jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği	48
Şekil 3.7. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbans grafiği.....	48
Şekil 3.8. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi için kazein substratı ile elde edilen Lineweaver – Burk grafiği.....	49
Şekil 3.9. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi için hemoglobin substratı ile elde edilen Lineweaver – Burk grafiği.....	50
Şekil 3.10. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi için azokazein substratı ile elde edilen Lineweaver – Burk grafiği.....	50
Şekil 3.11. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM HgCl ₂ ' ün etkisinin sonuçları	52
Şekil 3.12. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MnCl ₂ ' ün etkisinin sonuçları	52

Şekil 3.13. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM CaCl ₂ ' ün etkisinin sonuçları	53
Şekil 3.14. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM FeCl ₂ ' ün etkisinin sonuçları.....	53
Şekil 3.15. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM FeCl ₃ ' ün etkisinin sonuçları.....	54
Şekil 3.16. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM NiCl ₂ ' ün etkisinin sonuçları.....	54
Şekil 3.17. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MgCl ₂ ' ün etkisinin sonuçları	55
Şekil 3.18. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM SDS' in etkisinin sonuçları	57
Şekil 3.19. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM EDTA' in etkisinin sonuçları	58
Şekil 3.20. Kır menekşesinden (<i>Viola odorata</i>) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine β-merkaptotanolün etkisinin sonuçları.....	58
Şekil 3.21. Piridoksin (B ₆ Vitamini) UPLC-MS/MS MRM kromatogramı	61
Şekil 3.22. Nikotinik asit (B ₃ Vitamini) UPLC-MS/MS MRM kromatogramı	62
Şekil 3.23. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinin ekstresinin ve vitamin standartlarının HPLC-DAD kromatogramları	64
Şekil 3.24. Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) bitkisinin metanol ekstresinin indirgeme gücü tayini sonuçları.....	65
Şekil 3.25. Gallik asit standardı kalibrasyon eğrisi.....	68

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS	Amonyum Persülfat
CM	Karboksi Metil
dk	Dakika
DTT	Ditiyoeritrotiyol, glisin
E	Enzim
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EP	Enzim-Ürün kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-Inhibitör kompleksi
EU	Enzim Ünitesi
g	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
HNE	Hidroksi nonenal
I	İnhibitör
IU	Enzim Aktivitesi birimi
K _M	Enzimin substrata olan ilgisinin sabiti
L	Litre
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
P	Ürün
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektrofez
PUFA	Poliansatüre yağ asitleri
S	Substrat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	Trikloroasetik asit
TEMED	N',N',N',N'-Tetra metil etilen diamin)
Tris	Trihidroksi metil amino metan

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
V_{max}	Enzimin maksimum hızı
V_o	Reaksiyon başlangıç hızı

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Kozmetik sektörü gelişmeye açık bir alandır ve gün geçtikçe artan bir tüketici kitlesine hitap etmektedir. Alanın bu kadar hızlı gelişmesi ve tüketici kesimin artması insan sağlığı açısından bazı sorunlara neden olmaktadır. Bu sorunlara karşı önlem almak isteyen tüketicilerin tercihleri hızlı sonuç alınan bitkisel kökenli organik ürünlerin lehine değişmektedir. Bu da üreticileri bu doğrultuda üretilen inovatif ürünlere yöneltmektedir.

Bu çalışma ile Türkiye’ de doğal olarak yetişen bir bitki olan kır menekşesi (*Viola odorata*)’nin kozmetik ürünlerde, özellikle cilt bakım ürünlerinde kullanılıp kullanılamayacağı sorusuna cevap arandı.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinde proteaz enzim aktivitesi tayini yapıldı ve bu enzimin varlığı belirlendi. Proteaz enzimi kozmetik sektöründe cildi yenileyen ürünlerin yapımında kullanılmaktadır. Bu enzim peeling etkili cilt bakım ürünlerinin en önemli bileşenlerinden biridir.

Taze bitkiden alınan ekstrelerde organik bileşen analizi yapıldı. Alınan sonuçlara göre kır menekşesi (*Viola odorata*)’nin, % 38 1-octen-3-ol, % 19,3 2-Hexenal ve % 13,3 1-Hexanol içerdiği belirlendi. 1-Hexanol nem tutucu, kıvam artırıcı özelliğe sahip olan ve bitkiye güzel kokusunu veren aromatik bir bileşendir.

Ayrıca çiçekten alınan ekstrelerde suda çözünen vitaminler ile (A, D, E ve K), B ve C grubu vitaminlerin analizleri yapıldı. Analiz sonuçlarına göre kır menekşesi (*Viola odorata*)’nin antioksidan aktivite gösteren A, E, B₃ ve B₆ vitaminlerini içerdiği belirlendi. Bu vitaminlerin varlığı hem tasarlanan cilt bakım ürünlerinde yaşlanma karşısı etkiyi artırır, hemde ürünü bozunmalara karşı korur. Yani doğal antioksidan etkisi gösterir. Yapılan antioksidan aktivite tayinlerinden olumlu sonuç alınması bu düşüncüyü destekler niteliktedir.

1.2. Literatür Özeti

1.2.1. Enzimler hakkında genel bilgiler

Canlı organizmaların yaşamlarını sürdürebilmeleri için bazı kimyasal reaksiyonları gerçekleştirmeleri gerekmektedir. Çünkü yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan tüm molekülleri beslenme yoluyla doğrudan alamazlar. Aldıkları çoğu besinleri bir veya birden fazla kimyasal süreçten geçirerek kullanılabilir hale getirirler.

Kimyasal reaksiyonların meydana gelme hızı reaksiyonun türüne göre değişmektedir. Bazı reaksiyonlar çok kısa sürede gerçekleşebilirken bazı reaksiyonların meydana gelmesi aylar hatta yıllar alabilir. Bu süreyi belirleyen etken, kimyasal reaksiyonlarda reaksiyona katılan bileşikler ile oluşan ürünleri birbirinden ayıran enerji engelinin büyüklüğüdür. Enerji engellerinin büyüklüğü aktivasyon enerjisi olarak ifade edilir. Reaksiyonların kendiliğinden ve kontrolsüz bir şekilde meydana gelmemesindeki en büyük etken bu enerji engelleridir. Aktivasyon enerjisinin kolaylıkla aşılması reaksiyona katalizörün eşlik etmesi ile mümkündür.

Enzimler canlılar tarafından üretilen ve dokularda gerçekleşen kimyasal reaksiyonların hızını arttıran biyolojik katalizörlerdir (Altan, 2000). Reaksiyonların hücre gereksinimlerine uygun, kontrollü bir şekilde katalizlenmesini sağlarlar. Bilinen tüm enzimlerin hemen hemen hepsi protein yapısındadır. Ancak ribozimler katalitik olarak aktif olan nükleik asitlerdir (Koolman ve Rohm, 1996). Enzimleri diğer protein moleküllerinden ayıran en önemli özelliği biyokimyasal reaksiyonları katalizleme yeteneğidir ve bu yeteneği sayesinde pek çok çalışma alanının ilgi kaynağı olmuştur (Wolfson vd., 2008).

Enzim katalizörlüğünde gerçekleşen bir reaksiyonun hızı katalizörsüz olan reaksiyonun hızına göre yaklaşık olarak 10^8 - 10^{20} kat artış gösterir (Karlson ve Telefoncu, 1988). Hücrede gerçekleşen birçok reaksiyon enzimlerin varlığıyla kolaylaşmaktadır. Hatta canlı organizmanın yaşam süresinin bile yetmeyeceği kadar uzun zaman gerektiren kimyasal reaksiyonlar enzimler sayesinde gerçekleştirilmektedir. (Lehninger, 1982).

Katalizör olarak enzim içeren biyokimyasal reaksiyonlarda enzim ile reaksiyona giren moleküle substrat adı verilir. Kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği bölge aktif

bölge olarak adlandırılır ve substrat ile enzimin etkileşimi bu bölgede gerçekleşir. Başka bir deyişle bağ yapımı ve yıkımının gerçekleştirildiği, substratın ürüne dönüştürüldüğü, enzim içerisinde bir oyuk şeklinde bulunan ve katalitik olarak aktif olan bölgeye aktif bölge denilmektedir. Aktif bölgede meydana gelen etkileşimler, hidrofobik, elektrostatik, dipolar etkileşimler ve hidrojen bağlarıdır. Substrat ile enzim arasında gerçekleşen etkileşimler enzimin aktif bölgesinde bulunan ve yan zincirinde fonksiyonel grup içeren aminoasitler sayesinde meydana gelir. Karboksi, hidroksi, amino, imidazol ve tiol yan zinciri içeren glutamat, aspartat, serin, treonin, lisin, histidin, arginin, trozin ve sistein aminoasitleri aktif bölgede bulunan amino asitlerdir (Frey ve Hegeman, 2007).

Enzim ile substrat arasındaki bağlanma iki model ile açıklanır. Bunlar;

1. Anahtar-kilit modeli: Bu modelde substrat ile aktif bölge arasında birebir uyum söz konusudur.
2. Etkileşme sonucu uygunluk: Bu modele göre aktif bölge ile substrat arasında % 100 uyum söz konusu değildir. Küçük etkileşimler sonucunda aktif bölge ve substrat uyumlu hale gelir.

Aktif bölgenin üç boyutlu olması ve hacminin enzim hacmine kıyasla daha küçük olması tüm enzimlerin aktif bölgelerinin ortak özelliklerindendir (Onat ve Emerk, 1997). Bu özellikler dışında enzimler yapı, spesifiklik ve kataliz özellikleri açısından birbirlerinden farklıdır. Bazı enzimler aktif bir şekilde işlevini yerine getirebilmek için yalnızca protein yapıları ile yetinirken bazı enzimler farklı kimyasal gruplara ihtiyaç duymaktadır. İhtiyaç duyulan kimyasal gruplar kofaktör olarak adlandırılmaktadır. Kofaktörler enzimin protein kısmına farklı kuvvetlerle tutunmuş haldedirler (Sigman ve Boyer, 1970). Kofaktörlere örnek olarak Fe, Mg, Mn, Zn gibi metal iyonları verilebilir. Ayrıca enzimler koenzim olarak adlandırılan organik veya metalloorganik moleküller barındırabilirler. Metal iyonu veya koenzim ile aktivite gösteren enzimlere holoenzim, holoenzimin protein kısmına ise apoenzim denilmektedir (Lehninger, 2005). Holoenzimin kofaktörünün uzaklaştırılması enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olur. Yani apoenzim tek başına aktivite göstermez. Proteinlerin denatürasyonuna neden olan koşullardan koenzimler etkilenmemektedirler (Voet ve Voet, 1995).

Enzim katalizli reaksiyonlarda enzim, reaksiyona katılan bileşikler ile ürünleri birbirinden ayıran enerji bariyerini düşürür ve reaksiyonun gerçekleşmesini kolaylaştırır. Substrat ile kompleks (ES) oluşturarak substratı reaksiyona hazır hale getirir, reaksiyon entropisini düşürür (Fersht, 1985). Substratta meydana gelen değişikliklerin sonucunda bu kompleks enzim-ürün kompleksine (EP) dönüşür. Sonrasında enzim hiçbir değişikliğe uğramadan üründen ayrılır. Böylece enzim ilk haline geri döner ve tekrar substratı ile bağlanabilir (Karlson ve Telefoncu, 1997).

Enzimler bir veya birden fazla reaksiyonu katalizleyebilirler. Enzimlerin bazı bileşikler ve benzer bileşik grupları üzerinde etkili olması o enzimin spesifikliğı ile ilgilidir. Bazı enzimler çok dar bir spesifik aralığa sahipken, özellikle grup reaksiyonlarını katalizleyen enzimler daha geniş bir spesifik aralığa sahiptirler (Tekman, 1981; Koolman ve Rohm, 1996).

Enzimin aktivitesini ifade etmek için International unit (IU) olarak adlandırılan standart bir birim tanımlanmıştır. Buna göre bir ünite enzim (EU) bir dakikada 1 µmol ürünün oluşumunu (veya 1 µmol substratın ürüne dönüşümünü) katalizleyen enzim miktarıdır.

$$\text{Enzim Ünitesi (EU)} = \frac{\mu\text{mol}}{dk} \quad (1.1)$$

Enzim aktivitesi spesifik aktivite olarak adlandırılan başka bir birimle de hesaplanabilmektedir. Spesifik aktivite 1 mg protein başına düşen enzim ünitesinin sayısıdır ve saflığın bir ölçüsüdür (Bingöl, 1983).

$$\text{Spesifik Aktivite} = \frac{\text{EU}}{\text{mg protein}} \quad (1.2)$$

Bir enzimin kataliz yeteneğı ve etkinliğı o enzimin kinetiğinin irdelenmesiyle sayısal olarak ifade edilebilir. Kimyasal reaksiyonlarda reaksiyon hızı birim zamanda oluşan ürünün mol sayısı olarak ifade edilir. Enzimatik reaksiyonlarda da bu ifade değişmemektedir. Enzim katalizli reaksiyonların başlangıç hızı (V_0) substrat derişimine bağlıdır. Enzim derişimi sabit ve substrat derişimi düşük olan reaksiyonlarda reaksiyonun hızı substrat derişimine bağlıdır. Çünkü ortamda yeterince enzim molekülü bulunmaktadır. Substrat derişiminde meydana gelen en

ufak değişim reaksiyon hızının belirleyicisidir ve reaksiyon hızınının değişimi bu değişime paralel olarak değişmektedir. Reaksiyonlarda sıcaklığın yükselmesi enzimin işlevini gerçekleştirmesini ve ürün oluşumunu hızlandırır, fakat çok yüksek sıcaklık enzimin yapısını bozar ve enzim denatüre olur (Fersht, 1985). 0 °C ile 50 °C arasında sıcaklık yükselmesi enzimin etki hızını artırır, ancak sıcaklık 50 °C ile 90 °C arası olduğunda proteinler denatüre olur ve enzim etkinliğini kaybeder (Keskin, 1982).

Enzim çalışmalarında hidrojen iyonunun etkisini en aza indirmek için tampon kullanılır. Bir enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH' ya o enzimin optimum pH' sı denir. Optimum pH enzimin substratının yapısına ve enzimin elde edildiği kaynağa bağlıdır. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığa da optimum sıcaklık denir (Özata ve Kutlu, 2000).

Enzimli reaksiyonların hızlarını azaltan veya reaksiyonu tamamen durduran maddeler inhibitör olarak adlandırılırlar. Bu maddeler enzimlerin hem in vivo hem de in vitro aktivitelerini azaltır veya tamamen durdurur. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip olan bileşiklerdir. Birçok ilaç ve zehirli bileşiklerin etki mekanizması bu şekilde gerçekleşmektedir.

Enzim inhibisyonu dönüşümlü, dönüşümsüz veya allosterik olabilir.

Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır yada zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilen maksimum hız) azalır, K_M (enzimin substrata olan ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır.

Dönüşümlü inhibisyonunda enzim ile inhibitör etkileşmesi birer denge reaksiyonu şeklindedir. Yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı olmak üzere üç kısma ayrılır.

Yarışmalı inhibisyonunda inhibitör yapısal olarak substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak enzimin substrata bağlanmasını engeller. Substrat konsantrasyonu artırılarak inhibitörün inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Enzimin V_{max} değeri değişmez. Çünkü hem enzim - substrat, hemde enzim - inhibitör komplekslerinin ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğu için substrat konsantrasyonunun artması dengeyi ES kompleksi lehine kaydırır ve K_M değeri artar yani enzimin substrata olan ilgisi azalır.

Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanma enzimin farklı bölgelerinde olduğu için burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu arttırmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken K_M değeri sabit kalır.

Yarı yarışmalı inhibisyonda inhibitör serbest enzime değil sadece (ES) kompleksine bağlanır. Ortamda enzim – substrat - inhibitör (ESI) kompleksi sürekli bulunacağından V_{max} düşer. ES kompleksi ortamdan sürekli uzaklaşacağından enzimin K_M değeri azalır, enzimin substrata olan ilgisi artar.

Allosterik inhibisyon birden fazla polipeptid zincirinden meydana gelen ve allosterik enzim olarak adlandırılan enzimlerde gözlenir. Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitörler enzimin aktif merkezinden başka yere bağlanırlar ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek enzimin aktivitesini etkilerler (Lehninger, 2005).

1.2.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler 6 ana grupta sınıflandırılır.

1) Oksidoredüktazlar, oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Yükseltgenme; moleküle oksijen eklenmesiyle veya molekülden hidrojen ayrılmasıyla, yani + değer artmasıyla olur. İndirgenme ise; molekülden oksijen ayrılmasıyla veya moleküle hidrojen eklenmesiyle, yani + değer azalmasıyla olur. Bu tepkimeleri düzenleyen enzimler 2 gruba ayrılmıştır.

a) Dehidrogenaz: Hidrojen taşıyan ve aktaran enzimlerdir.

b) Oksidazlar: Elektron kaybeden ve aktaran enzimlerdir.

2) Transferazlar, molekülden H^+ dışında, başka grupların (C, N ve fosfor taşıyan gruplar) bir molekülden diğerine transferini katalizleyen enzimlerdir.

3) Hidrolazlar, su katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

4) Liyazlar, C - C, C - O, C - N ve C - S bağlarını yükseltgenme ve hidroliz dışında bir mekanizma ile kıran enzimlerdir.

5) İzomerazlar, optik ve geometrik izomerlerin rasemizasyonunu katalizleyen enzimlerdir. Başka bir deyişle molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştirirler.

6) Ligazlar, yüksek enerjili fosfatların enerjisini kullanarak karbon ile C, O, S, N arasında bağ oluşumunu katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

1.2.2. Antioksidanlar hakkında genel bilgiler

Vücudumuzda ve besinlerde bulunan lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler oksidasyona uğrayabilir ve canlı organizma için zararlı olabilecek yükseltgenme ürünleri oluşturabilirler (Papas, 1996). Yükseltgenme ürünleri reaktif oksijen türleri ve reaktif azot türleri olarak sınıflandırılabilir (Aruoma ve Cuppett, 1997). Bu iki sınıf kendi arasında radikal olanlar (süperoksit $O_2^{\bullet -}$, azot oksit $NO^{\bullet}$...) ve radikal olmayanlar (hidrojen peroksit H_2O_2 , nitroz asit HNO_2 ...) olarak ikiye ayrılır.

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 (Çetintaş, 2013).

Serbest radikaller biyomoleküllerin çoğunu etkiler, ancak lipitler en hassas olanlarıdır (İgari vd., 1982). Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştukları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nın oksidatif yıkımı, lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlerler. Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle son bulur. Bu ürünlerden başlıcaları olan hidroksinonenal (HNE) ve malondialdehit MDA, proteinlere ve DNA'ya bağlanarak kalıcı değişiklikler oluşturur. Lipit peroksitlerinin hücre yaşamı için en önemli etkileri, membran yapısında ve hücre bölünmesinde meydana getirdikleri değişimlerdir (Erden, 1992; Akkuş, 1995).

Serbest radikaller proteinler üzerinde birikmişse veya proteinlerin belirli bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki yapar (Erden, 1992; Cheeseman vd., 1993; Uçkaya, 2011).

Bazı biyomoleküllerin (dopamin, adrenalin, sitokrom P450, tetrahidrofolat ve elektron transport zincirlerinin bazı bileşikleri) oksijen tarafından doğrudan yükseltgenmesiyle süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı artabilir (Fridovich, 1986; Halliwell, 1994). Aynı zamanda vücuda dışarıdan da alınabilir.

Antioksidanlar, oksidasyonu başlangıç ve/veya gelişme basamağında geciktiren ya da önleyen maddelerdir. Antimutajenik, antikarsinojenik ve yaşlanmayı geciktirmek gibi çoğu etki canlılardaki antioksidan özellikteki maddelerden kaynaklanır (Cook ve Samman, 1996). Antioksidan maddelerin eksikliğinde reaktif oksijen ve reaktif azot türleri kanser, diyabet, kireçlenme, parkinson, AIDS, beyin ve kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın ortaya çıkmasına sebep olurlar (Packer ve Cadenas, 2002).

Normal koşullarda serbest oksijen radikalleri ve radikal toksisitesi ile koruyucu antioksidan sistem üretiminde bir denge vardır. Antioksidan ve oksidanlar arasındaki bu dengenin oksidanlar lehine bozulması oksidatif stres olarak bilinir. Oksidatif stres hastalıklarda hücresel ve moleküler doku hasarı oluşum mekanizmalarının bir parçasıdır (Gutteridge, 1993; Ercan ve Fidancı, 2012; Tabakoğlu ve Durgut, 2013)

Doğal kaynaklı antioksidanlar, bitkilerin içerdiği fenolik bileşikler (tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler), azotlu bileşikler (alkaloitler, klorofil türevleri, proteinler, aminler), organik asitler ve karotenoidlerdir (Larson, 1988; Hudson, 1990). Bunların yanında sistein, metiyonin, histidin, triptofan ve lizin (Taylor ve Richardson, 1980) gibi aminoasitler ile sülfürlere zengin olan tiyoredoksin (Buchanan vd., 1994) proteini de antioksidan özellik gösterirler.

Diğer taraftan gıdaların bozunmasını önlemek ve raf ömrünü uzatmak için sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Günümüzde BHA (bütillenmiş hidroksi- anisol), BHT (bütillenmiş hidroksitoluen), PG (propil gallat) ve TBHQ (*t*- bütildihidrokinon) en çok kullanılan sentetik antioksidanlardır. Ancak sentetik antioksidanlar ve oluşturdukları yan ürünlerin çeşitli hastalıklara yol açabileceğini ortaya koyan çalışmalar vardır (Tepe vd., 2007; Yamazaki vd., 2007). Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde

kullanılmalarına ciddi sınırlamalar hatta yasaklar getirilmiştir (Öztürk vd., 2002; Köksal, 2007; Yağcı vd., 2008). Bu nedenle doğal antioksidan deposu olan meyvelere, sebzelere, baharatlara ve bitki çaylarına olan ilgi artmıştır (Tzia ve Liadakis, 2003; Koca, 2007).

1.2.2.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanların sınıflandırılması farklı şekillerde yapılabilmektedir. Yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayan, reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar bu sınıflandırmalara örnek olarak verilebilir.

Enzimatik antioksidanlar serbest radikallerin birikmesini ve lipid peroksidasyonunun başlamasını önler. Superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH- Px), katalaz (CAT) en önemli enzimatik antioksidanlardır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbik asit (Vitamin C), alfatokoferol (Vitamin E), glutatyon (GSH), β -karoten (Vitamin A) ve diğer antioksidanlardan oluşur (Gutteridge, 1995; Valko vd., 2007).

Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlangıç aşamasını erteleyen veya engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır. Sentetik birincil antioksidanlara örnek olarak bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksitoluen, propil gallat ve *t*-bütil hidrokinon verilebilir. Tokoferoller ve karotenoitler doğal kaynaklı birincil antioksidanlardır. İkincil (tip-2 veya koruyucu antioksidanlar) antioksidanlar çok çeşitli reaksiyon mekanizmalarına sahiptirler. Bu antioksidanlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar, fakat serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürmezler. 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 (Reische vd., 2002).

1.2.3. Aroma bileşenleri hakkında genel bilgiler

Aroma maddeleri özellikle gıda endüstrisinde sıkça kullanılan katkı maddeleri arasında yer almaktadır. Uzun zamandan beri bitkiler aroma maddelerinin esas kaynağı olmuşlardır. Ancak bugün piyasada kullanılan aroma maddelerinin yaklaşık

% 80' den fazlasını sentetik aroma maddeleri oluşturmaktadır. Son zamanlarda kimyasal ürünlerin insan sağlığını ve çevreyi tehdit etmesi ve uluslararası mevzuatlarda kimyasal yollarla elde edilen ürünlere getirilen kısıtlamalar nedeniyle tüketiciler doğal ürünleri tercih etmektedir (Yılmaztekin vd., 2008).

Bitki uçucu yağları uzun yıllardan beri değişik amaçlara yönelik, özellikle bilimsel ve ticari olarak birçok alanda kullanılmaktadır. Bu kullanım alanlarının başında kozmetik, ilaç, gıda sanayi, aromaterapi ve fitoterapi gelmektedir (Hammer vd., 1999). Uçucu yağlar bitkilerin çiçek, meyve, kabuk, yaprak, rizom, reçine ve odun kısımlarından elde edilmektedir. Tıpta, alternatif tedavide ve kozmetikte kullanılan uçucu yağların doğal olarak bitkilerden elde edilmesi; organik çözücü maddeler yardımıyla ilgili bitki kısımlarının preslenmesi, su buharı distilasyonu veya ekstraksiyonu ile olmaktadır (Dorman ve Deans, 2000).

Çiçeklerin aroması yüzlerce farklı uçucu bileşenin ortak etkisi sonucu oluşmaktadır. Her bir bileşenin aroma profiline katkısı farklı düzeylerde olmaktadır. Düşük konsantrasyonlarda bulunup bitkinin aromasını oluşturan bu uçucu maddelere 'aroma aktif bileşenler' denir. Aroma aktif bileşenler bitkilerde ppm ve ppb gibi çok düşük konsantrasyonlarda bulunmalarına rağmen insan burnu tarafından algılanabilmektedir (Reineccius, 1994).

1.2.4. Vitaminler hakkında genel bilgiler

1.2.4.1. Tiamin (B_1 vitamini)

Tiamin en kararsız vitaminlerden biridir. Çeşitli prosesler tiamin miktarını büyük ölçüde azaltabilir. Isı, oksijen, sülfür dioksit, süzme işlemi ve nötr veya alkali pH seviyesi gibi etkilerin hepsi tiaminin yok olmasına sebep olabilir. Işığın ise bir etkisi yoktur. Enzim, pH 3,5 veya daha düşük olan asidik şartlarda karardır. Nötr veya alkalik pH seviyesinde B_1 vitamini kaynatıldığında ve hatta oda sıcaklığında yok olabilir. Tiamin en çok bira mayasında ve buğday, pirinç, arpa gibi tahılların kabuğunda bulunur (deMan, 1999).

Bu vitamin karbohidrat metabolizmasında bir koenzim gibi davranır ve tüm canlı dokularda bulunur. α -keto asitlerin dekarboksilasyonundaki tiamin difosfat formunda işlemleri yerine getirir. Tiamin klorür ve nitrat formlarında mevcuttur. İnsanın

günlük tiamin ihtiyacı aldığı karbohidrat miktarına bağlıdır. Metabolik aktivitenin arttığı hamilelik, hastalık ve ağır işlerde çalışma durumunda tiamin ihtiyacı artar. Tiamin içeriği genellikle mg/100g cinsinden ölçülmesine rağmen nadiren 3µg tiamin hidroklorüre karşılık gelen IU birimide kullanılır. (deMan, 1999).

1.2.4.2. Riboflavin (*B₂ vitamini*)

Riboflavin sulu çözeltisi sarımsı yeşil floresans renktedir. B₂ vitamini iki koenzimin bileşenidir. Bunlar flavin mononükleotit (FMN) ve flavin adenin dinükleotit (FAD)'dir. Molekül izoalloksazin halkasına bağlı bir d-ribitol yapısına sahiptir. Moleküldeki en ufak bir değişiklik vitamin aktivitesi kaybına sebep olur. Flavoproteinler elektron taşıyıcı olarak görev alırlar ve glukoz, yağ asitleri ve amino asitlerin oksidasyonu ile alakalıdır. En iyi riboflavin kaynakları süt ve süt ürünleridir (deMan, 1999).

Riboflavin oksijenli ortamda ve asidik pH' da kararlıdır ancak alkali ortamlara ve ışığa karşı hassastır. Işığa maruz kaldığında, pH ve sıcaklığın artmasıyla bozunma hızlanır. Asidik ya da nötral şartlarda ısı vitaminin bozunmasına yol açmaz.

İnsanın riboflavin ihtiyacı metabolik aktivitesine ve vücut ağırlığına göre günlük 1 mg'dan 3 mg' a kadar çeşitlilik gösterir. Normal yetişkin bir insanın ihtiyacı günlük 1,1 - 1,6 mg'dır. Flavinnükleotidler, flavoproteinler veya flavoenzimler olarak bilinen redoks enzimlerinin prostetik gruplarıdır. Bu enzimler piruvatın, yağ asitlerinin, aminoasitlerin oksidatif yıkımına ve elektron taşıma olayına katılırlar (deMan, 1999).

1.2.4.3. Nikotinamid (*B₃ vitamini*)

Niasin terimi hem nikotinik asit hemde nikotinamid grubuna özgü kullanılır. Nikotinamid, glikoliz, yağ sentezi ve doku solunumu ile ilgili iki önemli enzim olan NAD ve NADP' nin bileşeni olarak işlev görür. Niasin pellagra önleyici faktör olarak da bilinir. B₃ vitamininin diğer adı PP vitaminidir. Bu ad pellegra hastalığı önlemesi sebebiyle "pellegra preventive" den baş harfleri alınarak verilmiştir (deMan, 1999; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

İnsanların niasin ihtiyacı vücuda alınan triptofan miktarı ile ilgilidir. Hayvansal proteinler yaklaşık % 1,4, bitkisel olanlar ise % 1 triptofan içerir. Alınan 60 mg triptofanın 1 mg niasine karşılık geldiği düşünülebilir. Bu dikkate alındığında beslenmede ortalama 500 - 1000 mg triptofan günlük alındığında 8 – 17 mg niasine eşdeğerdir (deMan, 1999).

Niasin belkide B vitaminleri içinde en kararlı olanıdır. Isıdan, ışıktan, oksijenden, asitten ve alkali ortamdan etkilenmezler. Asıl kayıp filtreleme işlemlerini kapsayan proseslerde meydana gelir. Sebzelerin haşlanması yaklaşık % 15’lik bir kayba sebep olabilir. Salamura proseslerinde ise bu kayıp % 30’a kadar çıkabilir. Pastörizasyon, sterilizasyon, buharlaştırma ve kurutma gibi süt prosesleri nikotinik asit seviyesini çok az etkiler ya da etkilemez. Aslında sütte bulunan niasinin tamamı nikotinamid formunda bulunur. Birçok gıdada uygulanan kızartma ve fırınlama gibi ısı işlem uygulamaları mevcut niasin miktarını artırır (deMan, 1999).

1.2.4.4. Pantotenik Asit (*B₅ vitamini*)

Bir β -alanin türevi olan pantotenik asit, 2,4-dihidroksi-3,3-dimetilbutirik asit olan pantoik asitin karboksil grubuyla β -alaninin amino grubunun amid bağıyla bağlanmasından meydana gelmiştir. Bitkiler ve çoğu mikroorganizmalar tarafından sentezlenen pantotenik asit, omurgalıları için de mutlak esansiyel bir vitamindir. Serbest asit halde çok kararsızdır ve higroskopik yağ görünümündedir. Kalsiyum ve sodyum tuzları daha kararlıdır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Pantotenik asit tüm canlı hücrelerde ve dokularda bulunur. Pantotenik asit kaynağı olarak et, ciğer, böbrek, meyveler, sebzeler, tahıllar ve fındık önemli besinlerdendir. Hayvansal ürünlerde pantotenik asitin çoğu bağı olarak bulunur ancak sütte ise sadece dörtte biri bağı olarak bulunur. Yeterli çalışma olmadığından dolayı bu vitamin için RDA (tavsiye edilen günlük miktar) yoktur. Günlük ihtiyaç 5-20 mg olarak tahmin edilmektedir. Bu vitamin havaya (oksijen) karşı kararlıdır ama kuru sıcaklığa karşı kararsızdır. pH aralığı 5 - 7 olan çözeltilerde kararlı iken bu aralığın dışında ise kararsızdır (deMan, 1999).

1.2.4.5. Piridoksin (*B₆ vitamini*)

Vitamin B₆ üç formda bulunur. Hayvan dokularında piridoksal ve piridoksamin formunda ya da fosfat tuzları formunda bulunurken, bitkisel ürünlerde piridoksin formunda bulunur. Her üç bileşikte tuz olarak bulunabilir. B₆ vitamininin bu üç formu farelerde eşit aktiviteye sahiptir. Aynı etkinin insanlarda da olması beklenmesine rağmen bu tam olarak ispatlanamamıştır (deMan, 1999).

B₆ vitamini birçok gıdada bulunur ve bu vitaminin eksikliği nadir görülür. Yetişkinler için tavsiye edilen miktar günlük 2 mg'dır. Bu ihtiyaç yüksek protein tüketiminde artış gösterir.

Piridoksin ısıya ve yüksek asidik ortamlara karşı kararlıdır, ışığa karşı hassastır. Özellikle piridoksal ve piridoksamin hava, ısı ve ışığa maruz kaldığında hızlı bir şekilde yok olur. Bu vitaminin gıdalarda tayini zor olduğundan varlığı hakkında bilgi eksikliği vardır (deMan, 1999).

1.2.4.6. Biotin (*B₇ vitamini*)

Yapısal formülü üç asimetrik karbon içeren ve sekiz farklı stereoizomeri bulunan biotin sadece dekstrorotatori D-biotin formu doğal olarak bulunur ve biyolojik aktiviteye sahiptir. Biotine H vitamini veya koenzim R de denir. Biotin bazı ürünlerde (sebze, meyve ve süt) serbest halde bulunur ve diğer ürünlerde (sakatat, tohumlar ve maya) ise proteine bağlı olarak bulunur. Biotin açısından zengin besin kaynakları, et, ciğer, böbrek, süt, yumurta sarısı, maya, sebze ve mantarlardır (deMan, 1999).

Biotin birçok metabolik reaksiyonda, özellikle yağ asitleri sentezinde önemlidir. İnsan organizmasının biotin desteğinin bir kısmı sadece beslenmeden sağlanır. Günlük alınması gereken biotin miktarı 100-300 µg'dır. Tavsiye edilen herhangi bir miktar oluşturulmamıştır (deMan, 1999).

Biotinin kararlılığı ile ilgili veri sınırlı miktardadır. Bu vitaminin oldukça kararlı olduğu görülmektedir. Isıl işlemler az miktarda kaybına neden olur. Hava, asidik ve nötral pH ortamlarına karşı kararlıdır (deMan, 1999).

1.2.4.7. Folik asit (*B₉ vitamini*)

Folik asit; pterin, p-aminobenzoik asit ve glutamik asit olmak üzere üç ayrı bileşikten oluşan serinin asıl temsilcisidir. Mevcut ticari şekli bir tane glutamik asit içerir ve pteroilglutamik asit (PGA) olarak adlandırılır. Doğal olarak bulunma şekli hem PGA hem de triglutamat ve heptaglutamat gibi çeşitli sayıda glutamik asit kalıntısı içeren konjüгатları şeklindedir. En çok görülen vitamin eksikliği folik asit eksikliğidir. Eksiklik özellikle hamile bayanlarda meydana gelmektedir. Folik asit için RDA (günlük tavsiye edilen miktar) yetişkinlerde 400 µg' dır. Hamilelik döneminde günlük 400 µg, emzirme döneminde ise 200 µg ek olarak alınmalıdır (deMan, 1999).

Doğal olarak bulunan folatların çoğu son derece kararsızdır ve pişirilmeyle kolayca yok olur. Folik asit ısıya karşı asidik ortamlarda kararlıdır ancak nötral ya da alkali şartlar altında kolayca yok olur. Çözeltide bu vitamin ışık altında kolayca kaybolur (deMan, 1999).

1.2.4.8. Kobalamin (*B₁₂ vitamini*)

Bu vitamin vitaminler içinde en karmaşık yapıya sahip olanıdır ve molekül yapısında metal (kobalt) içermesi ile de eşsizdir. Molekül, üç değerlikli merkez kobalt atomunun etrafında oluşmuş koordinasyon kompleksidir ve iki ana kısımdan oluşur (deMan, 1999).

Siyanokobalamin birkaç koenzimin bileşimidir ve folat havuzuna geri dönen 5-metil-tetrahidrofolat çevriminde nükleik asit oluşumunda etkisi vardır. Vitaminin en önemli kaynağı hayvansal ürünlerdir. B₁₂ vitamini aynı zamanda birçok mikroorganizma tarafından üretilir. B₁₂ vitamini eksikliğinin sadece vejeteryanlarda görülmesi şaşırtıcı değildir (deMan, 1999).

Bu vitamin gıdalarda peptid bağları ile proteinlere bağlıdır ve bağırsak sistemi tarafından kolayca absorbe edilebilir. Yetişkinler için önerilen günlük alım 3 µg' dır. Gıdalardaki B₁₂ vitamini alkali çözeltilerde kaynatılmadığı sürece yüksek derecelerde pişirilmeyle yok olmaz (deMan, 1999).

1.2.4.9. Askorbik asit (C vitamini)

C vitamini askorbik asit olarak da bilinir. Yapı itibari ile en basit vitaminlerden biridir. Bir şeker asidinin laktonundan oluşur. Birçok hayvan ve bitki askorbik asidi glukozdan ve diğer basit ön basamaklardan sentezleyebilir. Mikroorganizmalarda askorbik asit yoktur. İnsan dahil bazı omurgalılar için esansiyeldir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Askorbik asit ayrıca, 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 (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

C vitamini sentezi yapamayan canlılar insanlar ve maymunlardır. İnsanın C vitamini ihtiyacı tam olarak belirlenmemiştir. Günlük ihtiyacın 45 ila 75 mg arasında olduğu ortaya konmuştur ancak strese ve ilaç alımına bağlı olarak ihtiyaç artabilir. C vitamini doğada yaygın şekilde özellikle turuncgiller gibi meyvelerde, yeşil sebzelerde, domates, patates ve çilek türü meyvelerde bulunur. Geniş şekilde yayılmasına rağmen en yüksek seviyede kuşburnu ve batı hint kirazında bulunur. Vitamin C tüm vitaminler içinde en az kararlı olan, işleme ve depolamada en çabuk yok olan vitamindir (deMan, 1999).

1.2.4.10. A vitamini (Retinol)

A vitamini tabiatta iki yaygın şekliyle bulunmaktadır. Memeli dokularında ve deniz suyu balıklarında bulunan A₁ vitamini veya retinol, tatlı su balıklarında bulunan A₂ vitamini veya retinol 2. 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 karotenoidler (özellikle α -, β - ve δ - karoten) de A vitamini aktivitesi gösterir. Bu karotenoidler bağırsak zarında ve karaciğerdeki enzimatik reaksiyonlarla A vitaminine dönüşür. Simetrik bir yapıya sahip olan β - karoten ortadan bölünür ve iki molekül retinol oluşur. Retinol, memeli hayvan dokularında

bulunur ve kanda uzun zincirli yağ asidiyle ester oluşturarak taşınır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

A vitamini eksikliği genç hayvanlarda, büyüme geriliğine, kemik ve sinir sisteminin doğru gelişmemesine sebep olur, deri kurur ve kalınlaşır; böbrekler ve değişik bezler dejenerasyona uğrar ve kısırılık görülür. A vitamini eksikliğinden en fazla etkilenen gözlerdir. Genç hayvanlar ve küçük çocuklarda vitamin eksikliğinin erken belirtisi olarak kseroflami 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 (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

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 karotene zengindir. A vitamininin fazla alınması toksiktir ve çocuklarda kolay kırılan kemiklerin oluşmasına sebep olur (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

1.2.4.11. D vitamini

D vitamini birkaç formda bulunur, en önemli iki formu D₂ (Ergokalsiferol) ve D₃ (Kolekalsiferol) vitaminleridir. D₂ ve D₃ vitaminin öncülleri sırasıyla ergosterol ve 7-dehidrokolesterol'dür. Bu öncüller yani provitaminler UV ışığı ile D vitaminine dönüşebilirler. Bu iki ana provitamine ek olarak ışınlı 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 bu vitaminin eksikliğinde ortaya çıkan raşitizm hastalığını yok etmede yardımcı olmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Yetişkin bir insanın D vitamini ihtiyacı günlük yaklaşık 20 µg'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 transpotunda ve depolanmasında rol oynadığını göstermektedir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

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

1.2.4.12. E vitamini

E vitamini etkisi gösteren bileşikler α -, β -, δ -, γ -tokoferoller olarak bilinirler. Tokoferoller içinde en bol bulunan ve en aktif olanı α - tokoferoldür. Tokoferoller bir kroman halka sistemi ve izoprenoid bir yan zincir ihtiva ederler. Kroman halka sistemi, bir benzen halkası ile bir pıran halkasının kondansasyonundan meydana gelir. 2-Metil-2-fetil-6-hidroksi kromanatokol denir. Bütün tokoferoller tokol türevidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

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 lipidlerindeki birçok doymamış yağ asitlerini moleküler oksijenin bozucu etkisine karşı korumaktır. Tokoferoller en çok buğday tanesi yağında bulunurlar.

1.2.4.13. K vitamini

Naftokinon halkası ihtiva eden K vitamininin etkisini gösteren doğal ve sentetik birçok bileşik vardır. K_1 (phylloquinone) ve K_2 (menaquinone) vitamini şeklinde gösterilen iki doğal K vitamini bilinmektedir. K_2 vitamini aktif şekil olarak görünmektedir. Sentetik K vitamini olan K_3 vitamini (menadione) uzun yan zincir ihtiva etmez.

K_1 ve K_2 vitamini birlikte bulunur. K_1 vitamini özellikle ıspanak, kaba yonca gibi yeşil yapraklarda bulunur. Ayrıca, lahana, karnabahar, domates, soya fasulyesi, pirinç kepeği, ve yulaf filizlerinde de bulunur. K_2 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 karalıdır ama alkali ortamda kararsızdır (Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

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

1.3. Dünyada ve Türkiyede Kır Menekşesi (*Viola odorata*)

Taksonomik olarak, kapalı tohumlular bölümünde, iki çenekliler sınıfı içinde yer alan, meneksegiller yaklaşık 500 tür içermektedir. Menekşe kozmetik sektöründe değerli bir materyaldir. Özellikle parfümeri sektörü menekşenin kokusundan sıklıkla faydalanmaktadır.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) 10-15 cm' ye kadar boylanabilen, çok yıllık, rizomlu, dayanıklı otsu bir bitkidir. Koyu yeşil renkli, kalp biçimli, kenarları dişli ve uzun saplı yaprakları vardır. Yaprak sapları ve ayanın alt ve üst yüzü kısa tüylerle kaplıdır. Kış sonu ile ilkbahar başlarında açan beş taç yapraklı çok güzel görünümlü çiçekleri mor renklidir. Bu çiçekler çok hoş bir koku taşır ama sadece koparıldıkları zaman kokarlar. Kokulu menekşe bitkisi, kısa rizomlarıyla toprağa değdiği yerde kök atar ve çevresine yayılır. Bu nedenle çok iyi yer örtüsü oluşturan bitkilerdendir. Yarıgölge yerlerde, ağaç altlarında yetiştirilmeye pek uygundur. Gölge ve yarıgölge ortamları; organik madde yönünden zengin biter ve süzek (suyu iyi akıntılı) toprakları sever ancak toprak tipi konusunda seçici değildir. Toprağının nemli kalacak ölçüde sulanması ve ara sıra biraz gübrelenmesi yeterli olur. (North vd., 2004).

Çiçeğin kulakçıkları geniş, mızrak şeklindedir. Tacın üst uç yaprağı birbirine yaklaşmıştır. Kapsülleri olgunlaştığında yere kadar uzanır. Gövdesiz, uzun sürünücü, 3–12 cm boyunda, stolonlar veren bir bitkidir. Dünyanın birçok yerinde yetişebilmekle beraber en çok Kuzey Yarımkürede yetişir. Ayrıca Havai ve Güneydoğu Asya' da da yetişmektedir (Beyazoğlu, 1987).

Kır menekşesi Avrupa' da antik çağlardan beri kozmetik ve sağlık için yetiştirilmektedir (Marcussen, 2006). Akdeniz bölgesi, güney-batı Avrupa ve Batı

Asya'nın bazı bölgelerinde orjinal alanın ötesinde dağılıma sahiptir (Valentine vd., 1968; Hulten ve Fries, 1986; Marcussen ve Borgen, 2000).

Kır menekşesi bugün hemen hemen bütün kıtaların ılıman bölgeleri boyunca yetiştirilir. Bronşit, mide ağrısı, ateş, grip, pnömoni, ve öksürük için kır menekşesinin (*Viola odorata*) çiçek ve yaprakları yerli halk tarafından ilaç olarak kullanılır. Bu bitki dünya çapında geniş uygulamalara sahiptir. Farklı yazarlara göre: İtalya ve Bulgaristan' da öksürüğe karşı kullanılır (Leporatti ve Ivancheva, 2003); Karayip bölgesinde balgam söktürücü olarak kullanılır (Halberstein, 2005); İtalya Marches' de deri hastalıkları için önerilir (Pieroni vd., 2004); ve İsrail' de yaygın olarak doğal bir ilaç şeklinde kullanılır (Lev, 2006).

Kır menekşesi (*Viola odorata*) İran halk hekimliğinde geleneksel olarak kullanılan tıbbi bitkidir. Ekzama, ağız enfeksiyonları ve tümörlerin tedavisinde diğer bitkilerle birlikte kullanılmıştır ve balgam söktürücü, idrar söktürücü, enfeksiyon giderici, iltihap sökücü ve laksatif özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (Schimmer ve Parker, 2001).

Kır menekşesinin (*Viola odorata*) kökü çocuklarda kusturucu olarak kullanılmıştır (Kocher, 1988).

Kır menekşesinin (*Viola odorata*) tarihi M.Ö. 500' lere kadar dayanır. O zamanlarda kanserden dolayı oluşan ağrıları gidermek için kullanılmıştır (Kapoor, 1990).

Geleneksel sistemde, endişe (Keville, 1999), uykusuzluk ve düşük kan basıncına (Duke vd., 2002) tedavi olarak kullanılmıştır.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) alkaloid, glikozit, saponinler, metil silikat ve zambak içerir (Stuart, 1989).

Osmanlı toplumundaki hastalıkların tedavisinde çeşitli bitkilerin şerbetleri kullanılmıştır. Tedavi amaçlı kullanılan bu şerbetlerin arasında menekşe şerbeti de bulunmaktadır. Menekşe şerbetinin, baş ağrısı, böbrek ağrısı, zatürre ve kuru öksürük gibi hastalıklara iyi geldiğine inanılmış (Kemikli, 2007).

2. MALZEME ve YÖNTEMLER

2.1. Malzemeler

2.1.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Bu çalışmada kullanılan metanol, standart serum albümin, TEMED (N',N',N',N'- Tetra metil etilen diamin), N,N'- metilen bisakrilamid, akrilamid, β -merkaptotanol, amonyum persülfat (APS), izopropil alkol, fosforik asit, SDS (sodyumdodesilsülfat), DTT (ditiyoeritrotiyol), glisin, asetik asit, gliserin, coomassie brillant blue G-250 ve R-250, bromtimol mavisi, magnezyum klorür, potasyum klorür, sodyum klorür, sodyum hidroksit, sodyum asetat, sodyum sülfat, sodyum fosfat, hidroklorik asit, sülfürik asit, etanol, metanol, aseton, EDTA (etilen diamin tetra asetik asit), tris (trihidroksimetil amino metan), sephadex G-100, kazein, TCA (trikloroasetik asit), Na_2CO_3 , folin-ciocalteu fenol reaktifi , H_2O_2 , ferrozin, FeCl_2 , DPPH, FeCl_3 , potasyum ferrisiyanür, amonyum sülfat, CM-selüloz, Sigma ve Fluka Chemical Corp.' dan, diyaliz torbaları E. Merck AG' den, sağlanmıştır.

2.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

HPLC-DAD	Agilent 1260 Quat. Pump, 1260 ALS, 1260 TCC, 1260 DAD VL
Headspace GC-MSD	Agilent J&W 19091S-431UI HP-5MS UI
UPLC-MS/MS	Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS
Spektrofotometre	Thermo Evulation-100
Evaporatör	Heidolph Hei-VAP Value
pH Metre	Thermo Orion 5 Star
Buzdolabı	Arçelik
Masa Üstü Santrifüj	Hettich EBA 20
Çalkalayıcı	İKA Schüttler MTS 2
Magnetik Karıştırıcı	BOECO MSH 300

Güç Kaynağı	CONSORT E 844
Su Banyosu	MEMMERT
Mikrodalga Fırın	Arçelik MD 554
Elektroforez Tankı	MAX FILL V20 SCDC
Peristaltik Pompa	MASTERFLEX L/S
Otomatik Pipetler	Transferpette
Etüv	BINDER

2.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

Çalışma süresi boyunca kullanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin nasıl hazırlandıkları aşağıdaki gibidir.

2.1.3.1. Homojenat elde etmek için kullanılan tampon çözelti

0,1 M'lık Fosfat tamponu (pH: 7,6); 1,42 g primer sodyum fosfat (Na_2HPO_4) 95 mL saf suda çözöldü ve 0,1 M'lık HCl ile pH: 7,6'ya kadar titre edildi. Son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

2.1.3.2. Coomassie brilant blue G-250 renk reaktifi

0,1 g Coomassie brilliant blue G-250, 100 mL % 95'lik fosforik asitte çözöndü. 3 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 50 mL % 95'lik etanol katılarak boyanın tam olarak çözünmesi sağlandı ve çözelti hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

2.1.3.3. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan tampon

0,1 M'lık fosfat tamponu (pH: 7,6); 1,42 g Na_2HPO_4 95 mL saf suda çözöldü ve 0,1 M'lık HCl ile pH: 7,6'ya kadar titre edildi. Son hacim 100 mL'ye saf su ile tamamlandı. Bu çözelti substrat çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

2.1.3.4. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi

% 1'lik kazein; 1,0 g kazein 80 mL 0,1 M fosfat tamponunda (pH: 7,6) çözöldü. 20 dakika, sıcaklığı 95 °C olan su banyosunda bekletildi. Son hacim aynı tampon ile 100

mL' ye tamamlandı. Çözelti kullanım süresi boyunca +4 °C' de bekletildi. Çözeltinin stabilitesi yaklaşık 1 haftadır.

2.1.3.5. Proteolitik aktivite ölçümünde kullanılan çözelti

% 5' lik TCA; 5,0 g TCA 95 mL saf suda çözöldü ve son hacim 100 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.6. Enzimleri diyaliz etmek için kullanılan tampon

10 mM Tris-HCl (pH: 7,0); 1,211 g tris, 950 mL saf suda çözöldü. 0,1 M HCl ile pH: 7,0' ye kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim saf su ile 1 L' ye tamamlandı.

2.1.3.7. İyon değişim kolonu (CM-Selüloz) dengeleme tamponu

0,05 M CH₃COONa (pH: 5,7); 4,1 g CH₃COONa alınarak 900 mL saf suda çözöldü, pH: 5,7' ye kadar 0,1 M' lik HCl ile titre edildi ve son hacim saf su kullanılarak 1 L' ye tamamlandı.

2.1.3.8. SDS-poliakrilamid jel 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 % 10' luk 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 persölfat (APS) ilave edildi.

2.1.3.9. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan yığma jelinin hazırlanması

1,24 mL Tris-HCl (1 M, pH: 6,8), 1 mL % 30' luk akrilamid-% 0,8' lik bisakrilamid, 0,1 mL % 10' luk 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 persölfat (APS) ilave edildi.

2.1.3.10. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan numune tamponu

0,65 mL 1M'lık Tris-HCl (pH: 6,75), 1 mL % 10' luk SDS, 1 mL % 100' lük gliserol ve 1 mL % 0,1' lik brom timol mavisi karıştırıldı, hacimleri saf su ile 10 mL' ye tamamlandı. Hazırlanan numune tamponu kullanılmadan önce 1 mL başına 50 µL olacak şekilde β-merkaptoetanol eklendi.

2.1.3.11. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu

6,0 g tris ve 28,8 g glisin alınarak 200 mL saf su içerisinde çözöldü. Son olarak 20 mL % 10' luk SDS ilave edildi ve toplam hacim saf su ile 2 L' ye tamamlandı.

2.1.3.12. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan fiksatif çözeltisi

500 mL metanol ve 100 mL asetik asit karıştırıldı. Hacim saf su ile 1 L' ye tamamlandı.

2.1.3.13. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan boyama çözeltisi

1,0 g coomassie brilliant blue R-250 tartıldı ve 500 mL metanolde çözöldü. 100 mL asetik asit ilave edildikten sonra hacim saf su ile 1 L' ye tamamlandı.

2.1.3.14. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan renksizleştirme çözeltisi

100 mL metanol ve 150 mL asetik asit karıştırıldı, son hacim saf su ile 2 L' ye tamamlandı.

2.1.3.15. Optimum pH çalışması için kullanılan pH' sı 4–9 arasında olan tampon çözeltiler

pH: 4–5 aralığı için; 0,1 M asetat tamponu kullanıldı. Bu çözelti 1,36 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 80 mL saf suda çözöldü. 0,1 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. 1,74 g Na_2HPO_4 80 mL saf suda çözüldü. 0,1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 8–9 aralığı için; 0,1 M tris tamponu kullanıldı. 1,21 g tris 80 mL saf suda çözüldü. 0,1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

pH: 10 için; 0,1 M borat tamponu kullanıldı. 1,38 g borik asit 80 mL saf suda çözüldü. 0,1 M HCl kullanılarak istenen pH ayarlandı ve hacim saf su ile 100 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.16. Substrat spesifikliğinin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler

% 1' lik hemoglobin çözeltisi; 1,0 g hemoglobin 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda (pH: 7,6) çözüldü ve son hacim aynı tamponla 100 mL' ye tamamlandı.

% 1' lik azokazein çözeltisi; 1,0 g azokazein 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda (pH: 7,6) çözüldü ve son hacim aynı tamponla 100 mL' ye tamamlandı.

% 1' lik azoalbumin çözeltisi; 1,0 g azoalbumin 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda (pH: 7,6) çözüldü ve son hacim aynı tamponla 100 mL' ye tamamlandı.

% 1' lik jelatin çözeltisi; 1,0 g jelatin 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda (pH: 7,6) çözüldü ve son hacim aynı tamponla 100 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.17. Proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin araştırılması için kullanılan çözeltiler

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

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

10 mM'lık β -merkaptoetanol: 69 μ L β -merkaptoetanol alındı, 95 mL saf suda çözüldü ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

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

2.1.3.18. Proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin araştırılması için kullanılan çözeltiler

10 mM'lık FeCl_3 : 0,162 g FeCl_3 alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

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

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

10 mM'lık MgCl_2 : 0,095 g MgCl_2 alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM'lık CaCl_2 ; 0,111 g CaCl_2 alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM'lık NiCl_2 ; 0,130 g NiCl_2 alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

10 mM'lık HgCl_2 ; 0,472 g HgCl_2 alındı, saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Çalışmalarımız için kullandığımız 1 mM'lık FeCl_3 , FeCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 , NiCl_2 ve HgCl_2 çözeltilerini hazırlamak için daha önceden hazırladığımız 10 mM'lık çözeltilerden 10 mL alındı ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0,1 mM'lık FeCl_3 , FeCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , CaCl_2 , NiCl_2 ve HgCl_2 çözeltilerini hazırlamak için 1 mM'lık çözeltilerden 10 mL alınarak hacim 100 mL'ye tamamlandı.

2.1.3.19. Jel filtrasyon kromatografisinde kullanılan tampon çözelti

0,05 M Na_3PO_4 /1 mM DTT (ditiyoeritrotiyol) (pH: 7,0); 7,8 gram Na_3PO_4 ve 0,15 g DTT tartıldı ve 950 mL saf su içerisinde çözüldü. 0,1 M HCl ile pH: 7,0 oluncaya kadar titre edildikten sonra hacim saf su kullanılarak 1 L'ye tamamlandı.

2.1.3.20. İndirgeme gücü tayini için kullanılan çözeltiler

0,2 M'lık fosfat tamponu (pH: 6,6); 2,84 g primer sodyum fosfat (Na_2HPO_4) 95 mL saf suda çözüldü ve 0,1 M'lık HCl ile pH: 6,6'ya kadar titre edildi. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

% 1'lik potasyum ferrisiyanür [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$]; 1,0 gram potasyum ferrisiyanür 80 mL saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

% 10'luk TCA; 10,0 g TCA 95 mL saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

% 1' lik FeCl₃; 1,0 gram FeCl₃ 80 mL saf suda çözüldü ve son hacim 100 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.21. Serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi tayini için kullanılan çözeltiler

0,1 mM DPPH'; 0,4 mg DPPH' tartılarak 100 mL etil alkolde çözüldü.

2.1.3.22. Metal şelat aktivitesi tayini için kullanılan çözeltiler

2 mM FeCl₂; 40,0 mg FeCl₂.4H₂O tartılarak 100 mL deiyonize suda çözüldü.

5 mM Ferrozin; 25,0 mg ferrozin tartılarak 10 mL deiyonize suda çözüldü.

2.1.3.23. H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesi tayini için kullanılan çözeltiler

40 mM H₂O₂; 0,136 g H₂O₂ 100 mL' lik balon jojeye konuldu. Önce bir miktar distile su ile çözüldü. Sonrasında distile su ile hacmi 100 mL' ye tamamlandı.

2.1.3.24. Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi için kullanılan çözeltiler

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + CuSO₄) satın alındığı şekilde kullanıldı.

% 2' lik Sodyum karbonat; 2,0 g Na₂CO₃ 100 mL' lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile 100 mL' ye tamamlandı.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Protein tayini

2.2.1.1. Kalitatif protein tayini

Kromotografi işlemleri sırasında toplanan tüplerde kalitatif protein miktarı tayini 280 nm' de absorbans okunarak gerçekleştirildi. Bu yöntem 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.

2.2.1.2. *Bradford yöntemiyle protein tayini*

Homojenatta amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ve kromatografi işleminden sonraki aktif eluatlardaki protein miktarı tayini Bradford yöntemiyle yapıldı. Bu yöntem boyanın farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerinde farklı şiddette mavi renk oluşturmamasından 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).

2.2.2. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) proteaz enziminin saflaştırılması

2.2.2.1. *Örneklerinin toplanması*

Kır menekşesi (*Viola odorata*) Şubat ayında Muğla kırsalından toplanmıştır. Ayrıca Muğla pazarındaki yerli pazarcılardan da satın alınmış ve çalışmalarımızda kullanılıncaya kadar -18°C’ de, derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

2.2.2.2. *Homojenatın hazırlanması*

-18°C’ de muhafaza edilen kır menekşesinden 25,0 g tartıldı. Sıvı azot ile muamele edildikten sonra mekanik olarak parçalandı ve 50 mL 0,1 M’ lık fosfat tamponu (pH: 7,6) içerisine alındı. Proteinlerin çözeltiliye geçmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika boyunca karıştırıldı ve süzgeç kâğıdı kullanılarak süzüldü. Katı kısım atıldıktan sonra 6000 rpm’ de 20 dakika boyunca santrifüjlendi, çökelek atıldı, süpernatant çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanıldı.

2.2.2.3. Amonyum sülfat çöktürmesi

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

Çöktürme işleminde kullanılan amonyum sülfat miktarı denklem 2.1' deki formül ile hesaplandı.

$$\text{AmonyumSülfat Miktarı (g)} = \frac{1,77 \times V \times (S - S_0)}{3,54 - S} \quad (2.1)$$

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, % 80 - 100 doygunluklarında proteolitik aktivite gözlemlendi. 80-100 doygunluk oranındaki çökelekteki proteolitik aktivitenin diğer doygunluk oranlarındakinden daha fazla olduğu gözlemlendi. İlk olarak homojenatta doygunluk % 50 oluncaya kadar katı (NH₄)₂SO₄ azar azar eklendi, ekleme sırasında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve ortam sıcaklığı +4 °C' ye düşürüldü. 6000 rpm' de 15 dakika santrifüj işleminden sonra çökelek atıldı ve süpernatant % 80 doygunluğa ulaşınca kadar aynı işlem tekrarlandı. % 100 doygunluktan elde edilen çökelek uygun tamponda çözülerek saflaştırmanın diğer basamaklarında kullanıldı.

2.2.2.4. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesinde elde edilen çökelek 0,05 M CH₃COONa tamponunda (pH: 5,7) çözöldükten sonra ilk olarak 1 saat boyunca saf suya karşı diyalizlendi. Daha sonra 6 saat boyunca 0,05 M asetat tamponuna (pH: 5,7) karşı diyaliz işlemi tekrarlandı. Diyaliz işlemleri +4°C' de yapıldı ve diyaliz süresince manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Bu işlem sonunda enzim çözeltisi CM-Selüloz iyon değişim kolonuna yüklemeye hazır hale geldi.

2.2.2.5. CM-Selüloz 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 ($C_2H_4N^+H_2$) ve dietilaminoetil ($C_2H_4N^+(C_2H_5)_2$) 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-Selüloz iyon değişim kromatografisi kullanıldı. İlk olarak 5 gram kuru CM-Selüloz tartıldı ve saf su içerisinde bir gece boyunca şişmeye bırakıldı. CM-Selüloz materyalinin aktif gruplarının (CH_2COO^-) ortaya çıkarılması için 0,5 M NaOH ile yarım saat boyunca muamele edildi. 0,5 M HCl ile nötralleştirildikten sonra kolon materyali kolona (1,5x30) dolduruldu. Kolon 4 saat boyunca 0,05 M asetat tamponu (pH: 5,7) ile dengelendi.

2.2.2.6. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) elde edilen homojenatın CM-Selüloz iyon değişim kolonuna tatbiki ve proteaz enziminin elüsyonu

0,05 M asetat tamponu (pH: 5,7) ile dengelenen CM-Selüloz kolonuna enzim çözeltisi yüklendi. 0,05 M asetat tamponu (pH: 5,7) kullanılarak 280 nm' de absorbans görülmeyinceye kadar kolon yıkandı. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 20 mL / saat' e ayarlandı. 300 mL 0,1-1,0 M NaCl ihtiva eden 0,05 M asetat tamponu (pH: 5,7) ile gradientli mikser kullanılarak enzim elüe edildi. Elüatlar her bir tüpte 5 mL olacak şekilde toplandı. Elüsyon işlemine, toplanan elüatlarda 280 nm' de absorbans görülmeyinceye kadar devam edildi. Toplanan elüsyonlarda 280 nm dalga boyunda spektrofotometre ile kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde proteaz aktivite tayini yapıldı. Proteaz aktivitesi gösteren

fraksiyonlar birleştirilerek enzim havuzu oluşturuldu ve karakterizasyon işlemi için saklandı.

2.2.3. Proteaz enzimi için aktivite tayini

Kır menekşesinden saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivitesi % 1' lik kazein varlığında kazeinin sindirimi yöntemine göre belirlendi. 1,0 g kazein 95 mL 0,1 M fosfat tamponunda (pH: 7,6) 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. Kör çözelti için enzim çözeltisi yerine tampon çözelti ilave edildi. 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 60 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 yöntemi ile belirlendi. Proteolitik aktivite enziminin dakikada parçaladığı μg protein / mL olarak hesaplandı (Fadıloğlu, 2001).

2.2.4. SDS-PAGE ile alt birimlerin belirlenmesi

Laemmli tarafından geliştirilen SDS-PAGE ile saflaştırılan proteaz enziminin 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 iki enjektör yardımıyla plakalara döküldü. Jel yüzeyinin düzgün olması için 1 mL n-bütanol hazırlanan ayırma jelinin üzerine döküldü ve jelin katılaşması beklendi. Jel katılaşınca üzerindeki n-bütanol döküldü ve saf su ile yıkandı. Daha sonra plakaların üst kısımlarına kadar yığma jeli döküldü. Tarak dikkatlice yığma 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. Hazırlanan numuneler 3 dakika boyunca kaynayan suda bekletildi. 3 dakika sonunda numunelerin soğuması beklendi ve otomatik pipet yardımıyla numuneler her biri 100µL olacak şekilde tarak yuvalarına yüklendi. Elektroforez tankının alt ve üst kısımlarından 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 100 V' a ayarlandı. Proteinlerin tamamı ayırma jeline geçtiğinde voltaj 120 V' a yükseltildi ve elektroforez işlemi sonlanana kadar bu şekilde sabit tutuldu.

Elektroforez sonlandırıldıktan sonra plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı ve 30 dakika boyunca çalkalayıcıda fiksatif çözelti içinde bekletildi. Fiksatif çözeltiden alınan jel, boyama çözeltisi içerisinde çalkalayıcıda 20 dakika süresince boyandı ve boyama işlemi bittikten sonra jel tekrar 2 dakika fiksatif çözelti ile yıkandı. Daha sonra fiksatif çözeltiden alınan jel renksizleştirme çözeltisine alındı. Protein bantları görünür hale gelinceye kadar çalkalayıcıda, çözeltisi birkaç kere değiştirilerek yıkama işlemine devam edildi. Protein bantları görünür hale geldiğinde jelin fotoğrafı çekildi (Laemmli, 1970).

2.2.5. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi üzerine kinetik çalışmalar

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) 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, hemogloblin, kazein substratları için V_{max} ve K_M değerleri belirlendi.

2.2.5.1. Optimum pH'nin belirlenmesi

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'ının belirlenmesi için kazein substratına karşı proteolitik aktivitesinden yararlanıldı. Optimum sıcaklığın 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'ı 0,1 M HCl ve 0,1 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 çözeltide enzim yerine tampon kullanıldı.

2.2.5.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirleyebilmek için 10 - 90°C aralığında sıcaklık 10°C artırılarak 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 60 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra, süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford, 1976).

2.2.5.3. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) proteaz enzimi saflaştırdıktan sonra jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak molekül ağırlığı tayin edildi.

6 gram kuru Sephadex G-100 saf suda çözüldü ve 1 gece boyunca oda sıcaklığında şişmeye bırakıldı. Daha sonra jel (1,5x20 cm) kolona yüklendi. 0,05 M Na₃PO₄/1 mM DTT tamponu ile kolonda 280 nm'de absorbans gözlenmeyinceye kadar dengeleme işlemine devam edildi. Kolon dengelendikten sonra konsantrasyonu 20 µg / mL olacak şekilde BSA (66 kDa), CA (sığır) (29 kDa), α-laktalbümin (14 kDa)

standart protein çözeltileri yüklenerek 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM DTT tamponu ile elüe edildi. Eluatlar her tüpte 4 mL olacak şekilde toplandı ve elüsyon işlemine 280 nm’ de absorbans gözlenmeyinceye kadar devam edildi. Eluatların 280 nm’ de absorbansları alınarak standart grafik oluşturuldu. Kolon tekrar 280 nm’ de absorbans vermeyinceye kadar 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 ve elüsyon işlemine 280 nm’ de absorbans gözlenmeyinceye kadar devam edildi. Okunan absorbans değerleri grafik edildi ve oluşturulan standart grafik yardımıyla enzimin moleküler ağırlığı belirlendi.

2.2.5.4. Enzimin $V_{\max}$ ve K_M değerlerinin belirlenmesi

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin $V_{\max}$ ve K_M değerlerini belirlemek için enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanıldı. 100 mL’ sinde 1,0 g kazein bulunan çözeltiden her bir tüpe 100 μL , 200 μL , 400 μL , 600 μL , 800 μL ilave edildi ve hacim saf su kullanılarak 1 mL’ ye tamamlandı. 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. 60 dakika sonunda çöken proteinler 6.000 rpm’ de 20 dakika boyunca santrifüjlendi ve daha sonra filtre edilerek, süpernatant içerisinde bulunan protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford, 1976). Kör aynı substrat konsantrasyonlarında enzimsiz olarak hazırlandı, enzim yerine tampon çözelti kullanıldı.

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

2.2.5.5. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğin belirlenmesi

Hemoglobin, jelatin, azoalbümin, azokazein substratlarına karşı, kır menekşesinden (*Viola odorata*) 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 60 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm' de 20 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra, süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford Yöntemi ile belirlendi (Bradford, 1976). Enzim için proteolitik aktivite parçaladığı µg protein / mL.dk olarak hesaplandı (Pauling, 1973).

2.2.5.6. Kır menekşesinden (Viola odorata) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin incelenmesi

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) 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 yöntemine 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 60 dakika süreyle beklemeye bırakıldı. 20

dakika boyunca 6.000 rpm de santrifüjlendi ve süpernatant filtre edildi. Süpernatant içerisindeki parçalanmış ürün miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi (Bradford, 1976).

2.2.5.7. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin araştırılması

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine SDS (Sodyum dodesil sülfat), EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) ve β -merkaptoetanolün etkileri incelendi. Bunun için saflaştırılan enzimin kazein substratına karşı proteolitik aktivitesinden yararlanıldı.

0,1 mM, 1 mM ve 10 mM'lık hazırlanan SDS, EDTA ve β -merkaptoetanol 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. Hacim tampon çözelti kullanılarak 2,5 mL'ye tamamlandı. Enzimin dakikada parçaladığı protein miktarı Bradford Yöntemi ile hesaplandı (Bradford, 1976).

2.2.6 Aroma verici uçucu organik bileşenlerin Headspace GC/MSD ile belirlenmesi

Bitkiye kokuyu veren uçucu organik bileşikler laboratuvarında yeni geliştirilen metot ile analiz edilmiştir. Parçalara ayrılan taze kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçekleri 20 mL'lik headspace vialine 5,0 g olacak şekilde tartıldı. Daha sonra üzerine susuz magnezyum sülfat ($MgSO_4$) ilave edildi ve çiçek ile tamamen karışması sağlandı. Vial headspace örnekleyicisine 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 2.1 Headspace GC/MSD cihaz analiz parametreleri

Fırın Parametreleri	
Dengeleme Süresi	2 dk
Maksimum Sıcaklık	300°C
Fırın Programı	60 °C 'de 1 dk sonra 10 °C/dk ile 100 °C 'ye gelince 1 dk sonra 10 °C/dk, 260 °C 'ye gelince 8 dk
Çalışma Süresi	30 dk

Çizelge 2.1 (devam)

MMI Giriş Parametreleri	
Yöntem	Parçalama
Isıtıcı	250 °C
Termal Aux (Transfer Hattı)	
Isıtıcı	Açık
Sıcaklık	250 °C
Kolon	
Adı	Agilent J&W 19091S-431UI HP-5MS UI (15m x250µm x0.25µm)
Basınç	21,801 psi
Akış	1,8 mL/dk
MS Toplama Parametreleri	
Toplama Yöntemi	Taramak
EM Gerilimi	1200
Alçak Kütle	35.0
Yüksek Kütle	400.0
Eşik	150
MS Kaynak	230 °C - 250 °C
MS Kuadropol	150 °C - 200 °C
Tepeboşluğu Parametreleri	
Fırın Sıcaklığı	95 °C
Döngü Sıcaklığı	110 °C
Transfer Hattı Sıcaklığı	120 °C
Flakon dengeleme	30 dk
Enjeksiyon Süresi	1 dk
GC Çevrim Süresi	40 dk
Flakon Boyutu	20 mL
Doldurma Tipi ve Basınç	Basınç / 14psi
Doldurma Süresi	0,5 dk
Ekstraksiyon Tipi	Çoklu Ekstraksiyon

2.2.7. Kır Menekşesinin (*Viola odorata*) Vitamin Miktarlarının Belirlenmesi

2.2.7.1. B grubu ve C vitamin içeriğinin UPLC-MS/MS ile belirlenmesi

Kır menekşesi (*Viola odorata*) çiçeklerinden hazırlanan örnekten yaklaşık 3,0 g alınarak üzerine 30 mL H₂O:CH₃CN (80:20) karışımı ilave edildi ve +4 °C’ de 6 saat ekstraksiyona bırakıldı. Soğutucudan çıkartılan karışım ultrasonik banyoda 15 dakika bekletildi. Ekstrakt 4000 rpm’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 0,20 µm

filtrelerden geçirilerek UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı ile analiz edildi.

Çizelge 2.2 Acquity UPLC cihaz analiz şartları

Acquity UPLC Cihaz Parametreleri				
Kolon	Acquity UPLC BEH C18 column (1,7µm x 2,1 x 100 mm)			
Mobil Faz A	%0,5' lik CH ₃ COOH içeren H ₂ O			
Mobil Faz B	%0,5' lik CH ₃ COOH içeren MeCN			
Kolon Fırını Sıcaklığı	40 °C			
Injection Volume	1 µL			
Gradient Program	Time (dk.)	Flow (mL/dk.)	% Solvent A	% Solvent B
	0.00	0.500	99.00	01.00
	2.00	0.500	99.00	01.00
	3.00	0.500	45.00	55.00
	6.00	0.500	99.00	01.00
	12.00	0.500	99.00	01.00

Çizelge 2.3 Xevo TQ-S MS/MS cihaz analiz şartları

Xevo TQ-S MS/MS Cihaz Parametreleri	
İyon Tipi	ESI (+) yada ESI(-)
Kapiler Gerilimler	3000 V
Koni Gerilimler	10-50 V
Kaynak Dengesi	60 V
Desolvasyon Sıcaklığı	500 °C
Desolvasyon Gaz Akışı	1000 (L/hr)
Koni Gaz Akışı	150 (L/hr)
Nebülizatör	7.0 bar
Kaynak Sıcaklığı	150 °C
LM Ayrışma	3
HM Ayrışma	15
Çarpışma Gaz Akışı	0.17
Çarpışma Enerjisi	0-40

2.2.7.2. A, D, E ve K grubu vitaminlerinin HPLC-DAD ile belirlenmesi

Çiçek örnekleri küçük parçalara ayrıldıktan sonra, hekzan kullanılarak ekstrakte edildi. Çiçekler hekzan içinde her seferinde 6 saat bekletilerek, toplam 3 defa ekstraksiyona tabi tutuldu. Hekzan rotary evapotatörde buharlaştırıldıktan sonra, ham ekstreler elde edildi.

Elde edilen hekzan ekstresinden 100 mg alınıp 10 mL metanolde çözüldü. Üzerine 100 mg askorbik asit ilave edildi ve 1 dakika karıştırıldı. Sonra 100 µL 2 N metanol içinde çözünmüş KOH ilave edildi. Tüpün ağzı kapatılarak 1 dakika boyunca vortekslendi. 10 dakika 4000 rpm’de santrifüjlendikten sonra üst faz Macherey-Nagel Chromafil Xtra PTFE-20/25 0,20 µm filtreden süzülde ve HPLC-DAD (Agilent 1260 Quat. Pump, 1260 ALS, 1260 TCC, 1260 DAD VL) cihazı ile A vitamini için 325 nm, Ergosterol, D₂, K₁ ve K₂ vitaminleri için 260 nm ve E vitamini için ise 285 nm dalga boylarında analiz edildi.

Çizelge 2.4 HPLC-DAD cihaz analiz şartları

HPLC-DAD Cihaz Parametreleri	
Kolon	Poroshell 120 EC-C18 kolonu (2.7 µm x 4.6 x 100 mm)
Mobil Faz A	MeOH : H ₂ O (95:05)
Kolon Fırın Sıcaklığı	40°C
Dedektör Sıcaklığı	30°C
Akış	0.5mL/dk.
Dedektör Dalga Boyu	260 nm, 280 nm ve 325 nm
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

2.2.9. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde antioksidan aktivite tayini

2.2.9.1 Ekstrelerin hazırlanması

5,0 g Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisi alınıp önce sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Toz haline getirilen örnek 10 mL kaynayan su ile yaklaşık 1 saat kadar karıştırıldı. Ardından süzölüp su liyofilize edilerek uzaklaştırıldı. Alkol ekstresi içinde aynı işlem alkol kullanılarak tekrarlandı.

*2.2.9.2. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde indirgeme gücü tayini*

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstreleri için indirgeme gücü tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı (Oyaizu, 1986). 1 mL distile sudaki farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları (25 - 800 µg / mL) 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH: 6,6) ve 2,5 mL % 1’ lik potasyum ferrisiyanür [K₃Fe(CN)₆]’ e ilave edildi. Karışım 50° C’ de 20 dakika inkübe edildi. 2,5 mL % 10’ luk TCA ilave edilip

10 dakika santrifüjlendi. Üst fazdaki solüsyondan 2,5 mL alınarak, 2,5 mL saf su ve 0,5 mL % 1' lik FeCl₃ ile karıştırıldı ve 700 nm' de absorbansı okundu. Kör olarak distile su kullanıldı. Aynı işlem metanol ekstresi için tekrarlandı.

2.2.9.3. *Kır menekşesi (Viola odorata) bitkisinde serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi tayini*

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstresinin serbest radikali giderim aktivitesi, DPPH[•] serbest radikali kullanılarak belirlendi (Blois, 1958). 0,1 mM DPPH[•] den 1 mL alınarak ve suda hazırlanan 3 mL bitki ekstresine (25 - 800 µg / mL) ilave edildi. 30 dakika sonra 517 nm' de absorbansı okundu. Pozitif kontrol olarak sentetik antioksidan olan vitamin C ve BHA kullanıldı. DPPH[•] radikalini süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100 \quad (2.3)$$

A₀= Kontrol reaksiyonunun absorbansı

A₁= Örnek reaksiyonunun absorbansı

Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı IC₅₀ (etkin konsantrasyon) değerini vermektedir. % inhibisyon değerleri kullanılarak IC₅₀ (µg / mL) aktiviteleri belirlendi.

2.2.9.4. *Kır menekşesi (Viola odorata) bitkisinde metal şelat aktivitesi tayini*

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinde metal şelat aktivitesi; kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstreleri ve standart ile demir iyonları arasında şelat oluşması Dinis yöntemine göre yapıldı (Dinis vd., 1994). Bitki ekstreleri (25 – 800 µg / mL), 0,05 mL 2 mM FeCl₂' e ilave edildi. Reaksiyon ortamına 0,2 mL 5 mM ferrozin ilave edildi ve iyice karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 562 nm' de absorbansı ölçüldü. % inhibisyon miktarı 2.3 numaralı denklem kullanılarak hesaplandı.

2.2.9.5. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde H_2O_2 uzaklaştırma aktivitesi tayini

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinde H_2O_2 uzaklaştırma aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri yöntemle göre yapıldı (Ruch vd., 1989). Bu işlem için 40mM'lık H_2O_2 çözeltisi hazırlandı. Bitkinin (25 - 800 μg / mL) hazırlanmış olan ekstreleri, 0,6 mL H_2O_2 çözeltisine ilave edildi. 10 dakika inkübe edildi ve 230 nm' de absorbansı okundu. Kör olarak H_2O_2 içermeyen fosfat tamponu kullanıldı.

$$\% H_2O_2 \text{ Uzaklastirma} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right] \times 100 \quad (2.6)$$

2.2.9.6. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinde toplam fenolik bileşiklerin varlığı Silinkart ve Singleton yöntemlerine göre yapıldı (Slinkard ve Singleton, 1977). 1 mL bitki ekstresine 1 mL folin-Ciocalteau çözeltisi ilave edildi ve karıştırıldı. 3 dakika sonra % 2'lik $NaHCO_3$ 'dan 3 mL ilave edilerek 2 saat manyetik karıştırıcı ile karışmaya bırakıldı. Ardından 700 nm' de absorbansı ölçüldü.

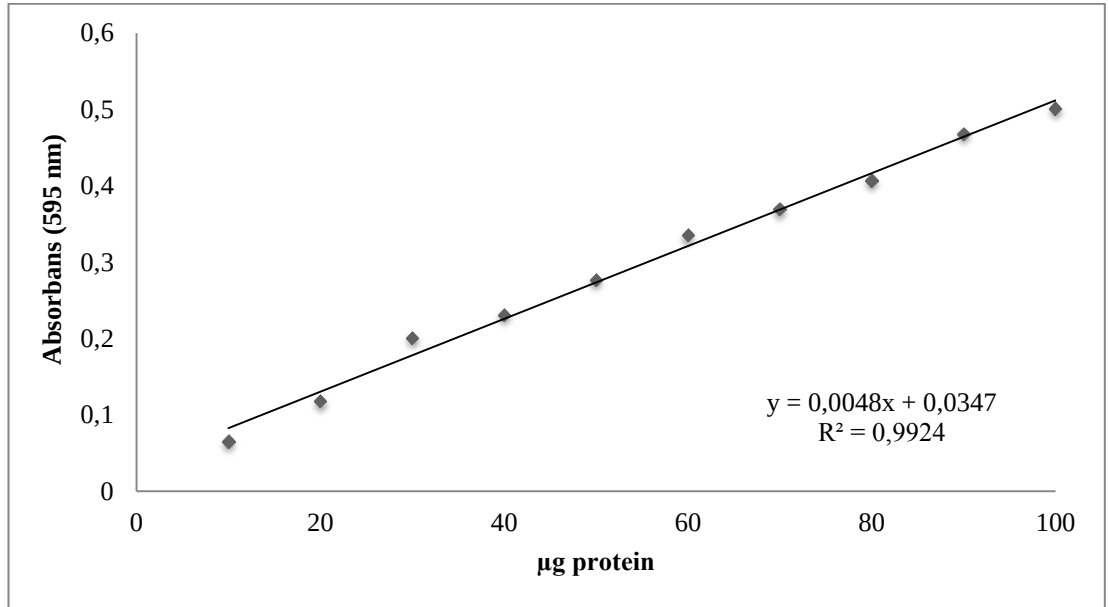
$$\text{Absorbans} = 0,0008x + \text{Gallik asit (g)} \quad (2.7)$$

Gallik asit standart grafiği kullanılarak elde edilen denklemden toplam fenolik bileşiklerin miktarı belirlendi.

3. BULGULAR ve İRDELEME

3.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Proteinlerin kantitatif tayini için comassie brillant blue yönteminden faydalandı. Standart eğri grafiği hazırlamak için BSA kullanıldı. Homojenat ve saflaştırılan enzim çözeltilerinde proteolitik aktivite tayini için bu standart eğri grafiği kullanıldı. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.1.' de gösterildi.



Şekil 3.1. Coomassie brillant blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

3.2. Kır Menekşesinden (*Viola odorata*) Proteaz Enzimi Saflaştırılması Sonuçları

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) proteaz enziminin saflaştırılması iki basamakta gerçekleştirildi.

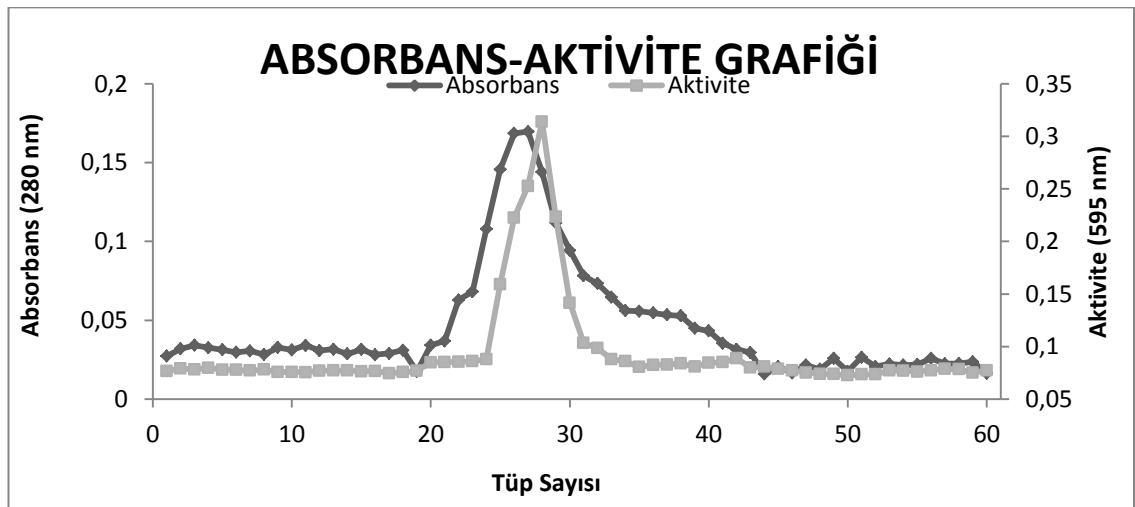
3.2.1. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) proteaz enziminin amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırılması sonuçları

1. basamakta hazırlanan homojenatta % 0 - 100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Her basamak sonucunda elde edilen çökelek 0,05 M fosfat tamponunda (pH: 7,6) çözöldü ve aktivite tayini yapıldı. Ayrıca her adımda süpernatant kısmının da enzim aktivitesine bakıldı. Yapılan tayinler sonucunda en yüksek proteolitik aktiviteye % 80 - 100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılan çökelekte rastlandı.

3.2.2. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) proteaz enziminin CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları

2. basamakta 0,05 M'lık asetat tamponu (pH: 5,7) ile dengelenen CM-Selüloz iyon değişim kolonuna homojenat yüklendi. Kolon 0,05 M'lık asetat tamponu (pH: 5,7) ile yıkandı. Yıkama işlemine 280 nm' de 0,05 M'lık asetat tamponuna (pH: 5,7) karşı elüsyonün absorbans değeri sıfır oluncaya kadar devam edildi. Enzim kolondan 0,1 -1,0 M NaCl içeren aynı tampon ile elüe edildi. Toplanan elüatların 280 nm' de absorbansı alındı ve proteolitik aktivitesine bakıldı. Proteolitik aktivitesi yüksek olan elüatlar ile enzim havuzu oluşturuldu.

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiğı Şekil 3.2.' de gösterildi.



Şekil 3.2. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiğı

3.2.3. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) proteaz enziminin saflaştırma basamakları sonuçları

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) hazırlanan homojenatta, amonyum sülfat çöktürmesinden sonra elde edilen enzim çözeltisinde ve CM-Selüloz iyon değişim kolonundan elde edilen elüatlarda Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı ve bu üç basamakta proteaz enziminin kaç kat saflaştırıldığı ayrı ayrı hesaplandı (Bradford, 1976).

Saflaştırma sonuçları Çizelge 3.1’ de gösterildi.

Çizelge 3.1 CM-Selüloz kolonunda kır menekşesinden (*Viola odorata*) elde edilen proteaz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve homojenattan saflaştırılan proteaz enziminde enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.

Basamaklar	Hacim mL	Aktivite EU/mL	Toplam Aktivite		Protein miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite EU/mg	Saflaştırma oranı
			EU	%			
Ham ekstrakt	25	0,118	2,95	100	1,056	0,112	1
% 80 - 100 (NH ₄) ₂ SO ₄	10	0,097	0,97	32,881	0,076	1,27	11.339
CM-Selüloz	5	0,314	1,57	51,19	0,065	4,83	43,125

3.2.4. SDS-Poli akrilamid jel elektroforezi sonuçları

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin alt birime sahip olup olmadığını belirlemek için SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Saflaştırılan proteaz enzimi SDS-poliakrilamid jel yuvalarına yerleştirildi. Elde edilen sonuçlar kır menekşesinden saflaştırılan proteaz enziminin iki alt birime sahip olduğunu gösterdi.

Protein bantlarının fotoğrafı Şekil 3.3.’ de gösterildi.



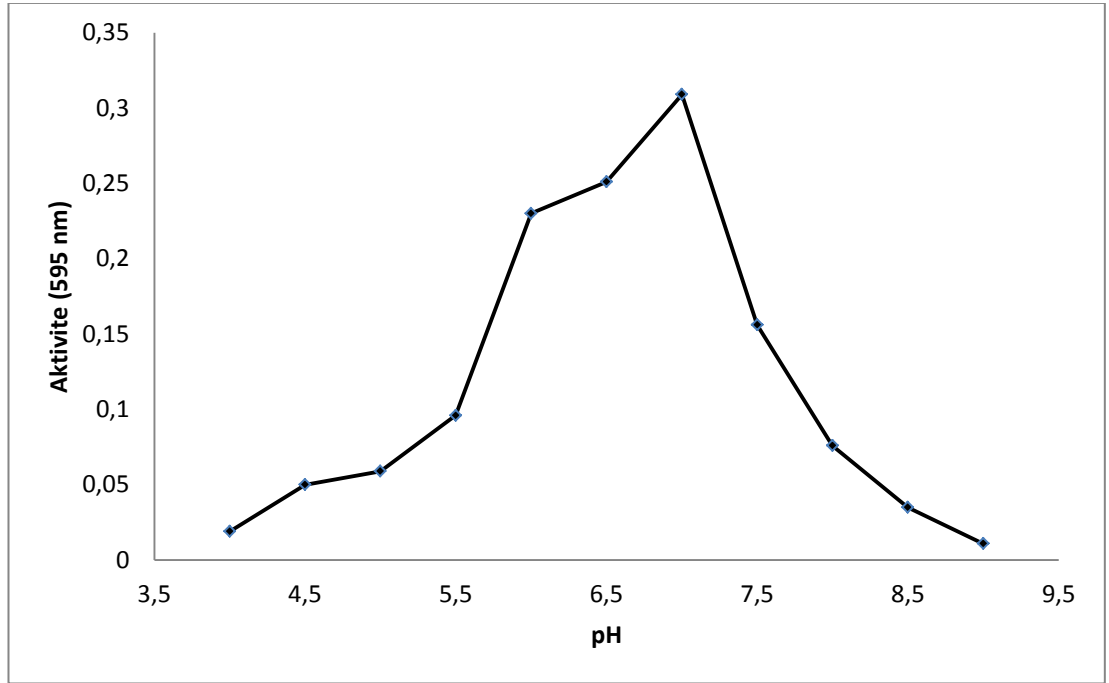
Şekil 3.3. CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı

***(I-II: Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi)**

3.3. Kır Menekşesinden (*Viola odorata*) Saflaştırılan Proteaz Enzimi Üzerine Yapılan Kinetik Çalışmaların Sonuçları

3.3.1. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH sonuçları

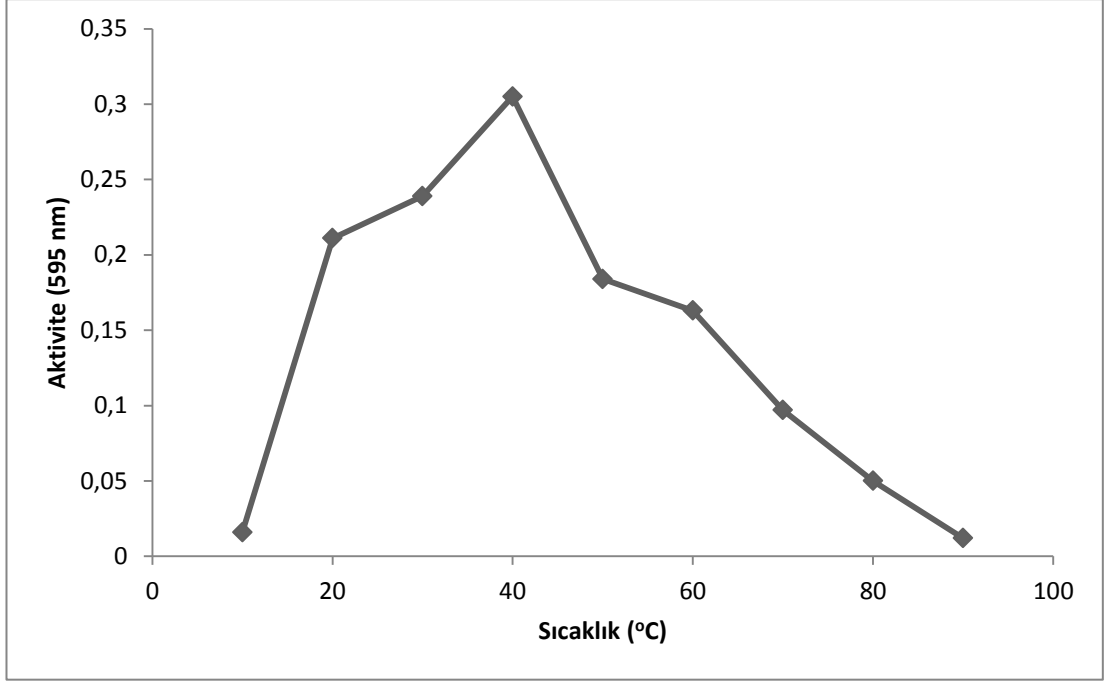
Optimum pH belirleyebilmek için pH 4-9 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. pH 4-5 için 0,1 M asetat tamponu, pH 6-7 için fosfat tamponu, pH 8-9 için Tris-HCl tamponu kullanıldı. pH değişimine karşı proteolitik aktivite miktarı Şekil 3.4.' de verildi.



Şekil 3.4. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

3.3.2. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Optimum sıcaklığı 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. Sıcaklık değişimine karşı proteolitik aktivite miktarı Şekil 3.5.' de gösterildi.

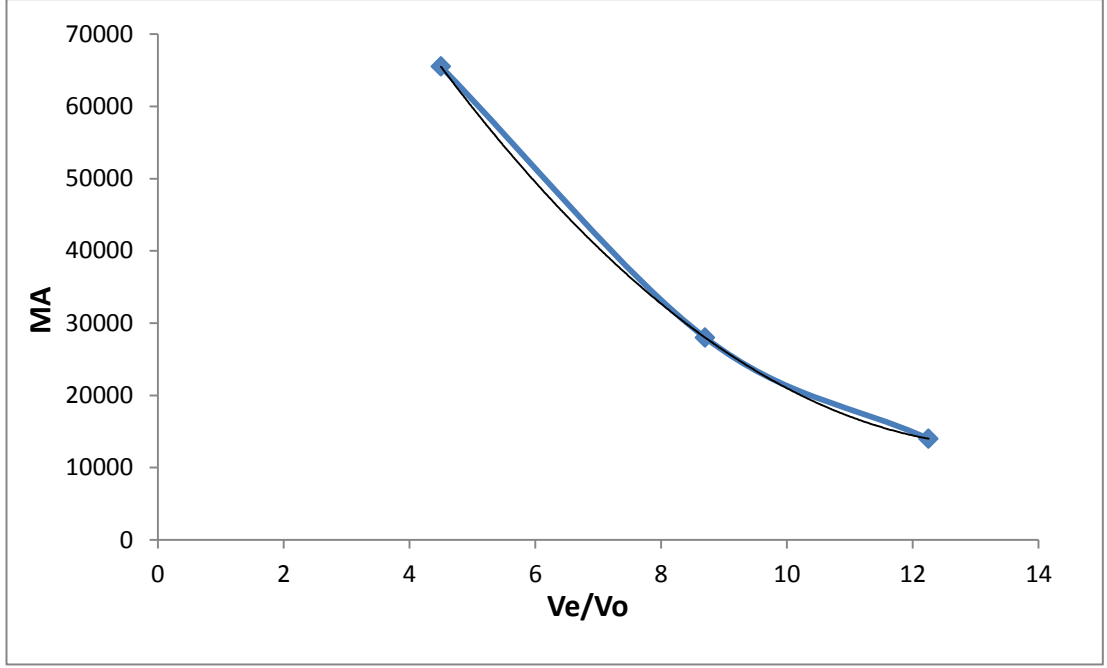


Şekil 3.5. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

3.3.3. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini sonuçları

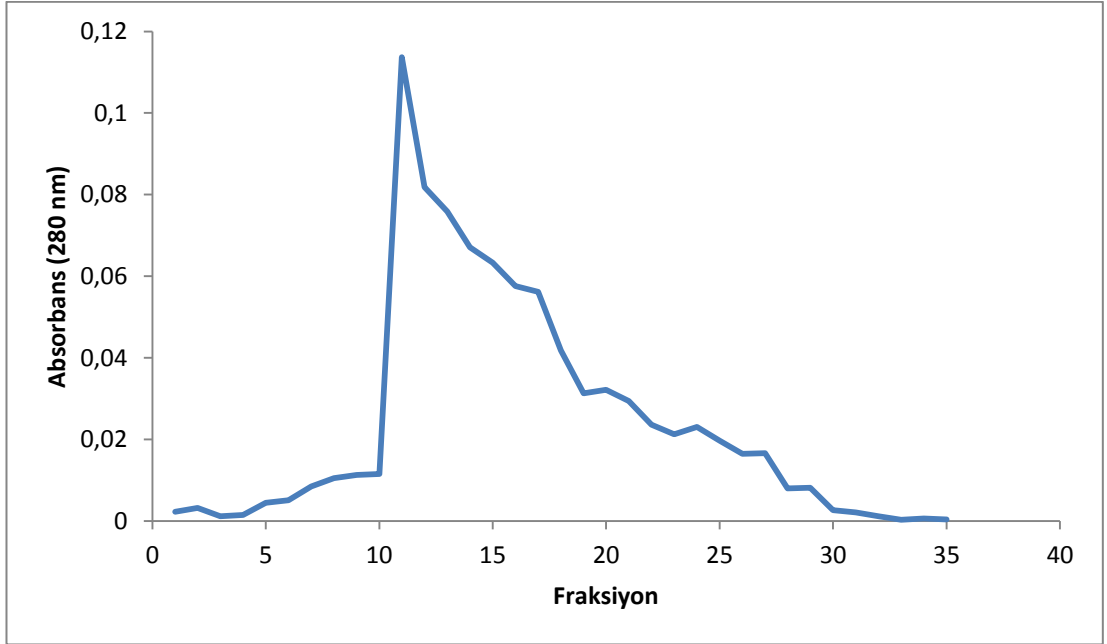
Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi yardımı ile belirlendi. 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM DTT (pH: 7,0) tamponu ile dengelenen kolona öncelikle molekül ağırlığı bilinen standart proteinler yüklendi. Bu standart proteinler BSA (66 kDa), CA (sığır) (29 kDa) ve α -laktalbümin (14 kDa). Yüklenen standart proteinler 0,05 M Na_3PO_4 /1 mM DTT (pH: 7,0) tamponu ile elüe edildi ve standart grafik oluşturuldu. Sonrasında saflaştırılan proteaz enzimi kolona yüklendi ve yine aynı tamponla elüe edildi. Elde edilen sonuçlar standart grafik ile karşılaştırıldı.

Standart grafik ile karşılaştırma sonucunda kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığı 25 kDa olarak belirlendi. Standart proteinlerden hazırlanmış olan standart grafik Şekil 3.6.' da gösterildi. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisinden alınan fraksiyon - absorbans grafiği ise Şekil 3.7.' de verildi.



Şekil 3.6. Standart proteinlerden* hazırlanmış olan jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği

* (BSA (66kDa), CA bovine (29 kDa), α -laktalbumin (14 kDa))

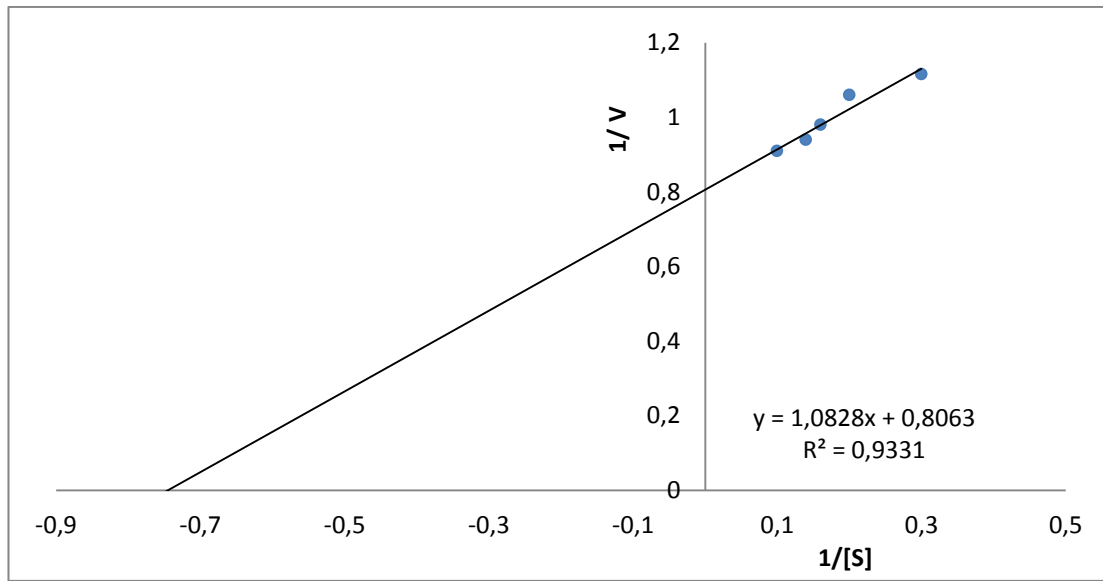


Şekil 3.7. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile molekül ağırlığı tayini için hazırlanan absorbands grafiği

3.3.4. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratına karşı $V_{\max}$ ve K_M değerlerinin belirlenmesi

$V_{\max}$ ve K_m değerleri enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanılarak belirlenmiştir. $1/V'$ ye karşılık $1/[S]$ Lineweaver - Burk grafiği çizildi ve çizilen Lineweaver - Burk grafiği Şekil 3.8.' de gösterildi. Bu grafikten yararlanarak $V_{\max}$ ve K_m değerleri hesaplandı.

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratına karşı olan $V_{\max}$ ve K_m değerleri sırasıyla $1,24 \mu\text{g} / \text{mL}$ ve $1,33 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı.



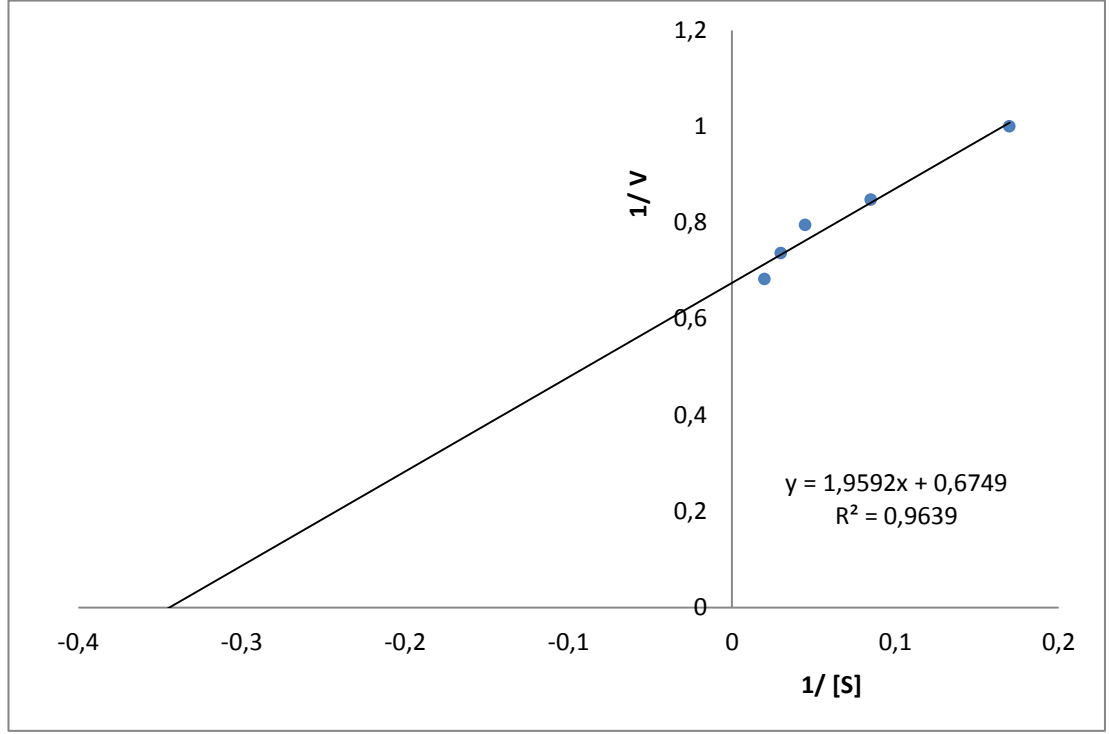
Şekil 3.8. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi için kazein substratı ile elde edilen Lineweaver – Burk grafiği

3.3.5. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğin belirlenmesi

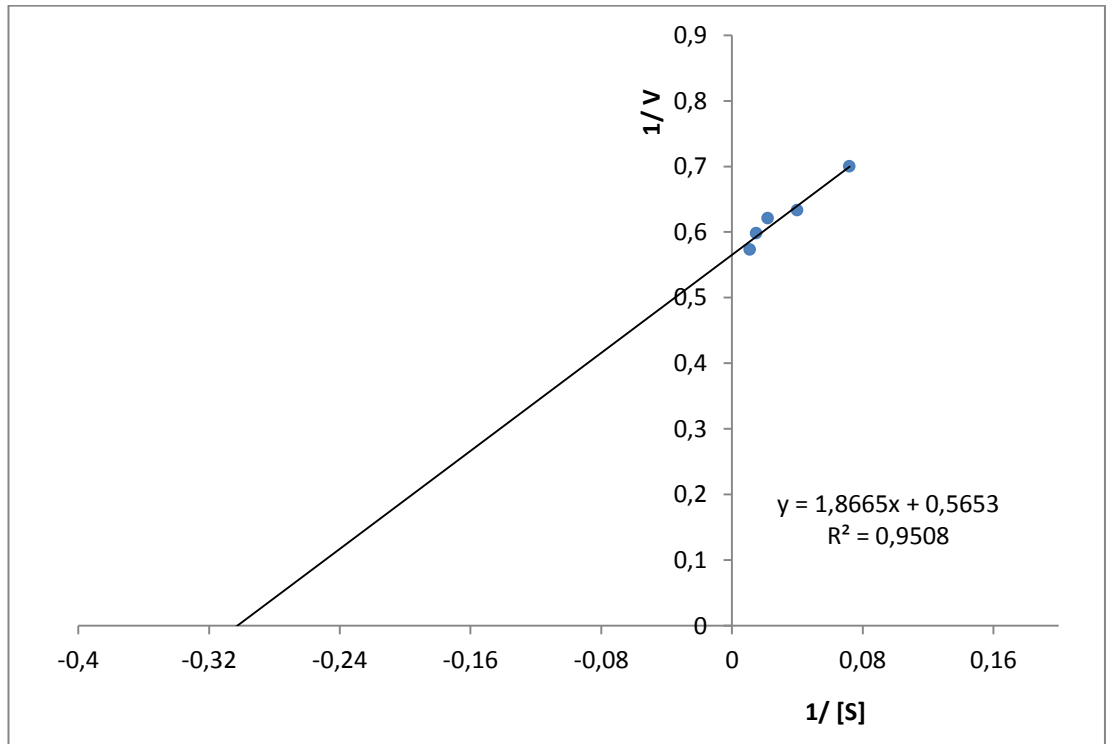
Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliği, hemoglobin, jelatin, azoalbumin ve azokazein substratlarına karşı belirlenmiştir. Bu belirleme işleminde enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanılmıştır. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin jelatin ve azoalbumini hidrolizlemediği gözlemlendi. Hemoglobin ve azokazeini hidrolizlediği belirlendi.

Hidrolizlenen iki substrat için $1/V'$ ye karşılık $1/[S]$ Lineweaver - Burk grafiği çizildi ve bu grafiklerden yararlanarak $V_{\max}$ ve K_m değerleri ayrı ayrı hesaplandı.

Hidrolizlenen substratlar için çizilen Lineweaver - Burk grafiği Şekil 3.9. ve Şekil 3.10.' de gösterildi. Hesaplanan $V_{\max}$ ve K_m değerleri Çizelge 3.2' de verildi.



Şekil 3.9. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi için hemoglobin substratı ile elde edilen Lineweaver – Burk grafiği



Şekil 3.10. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi için azokazein substratı ile elde edilen Lineweaver – Burk grafiği

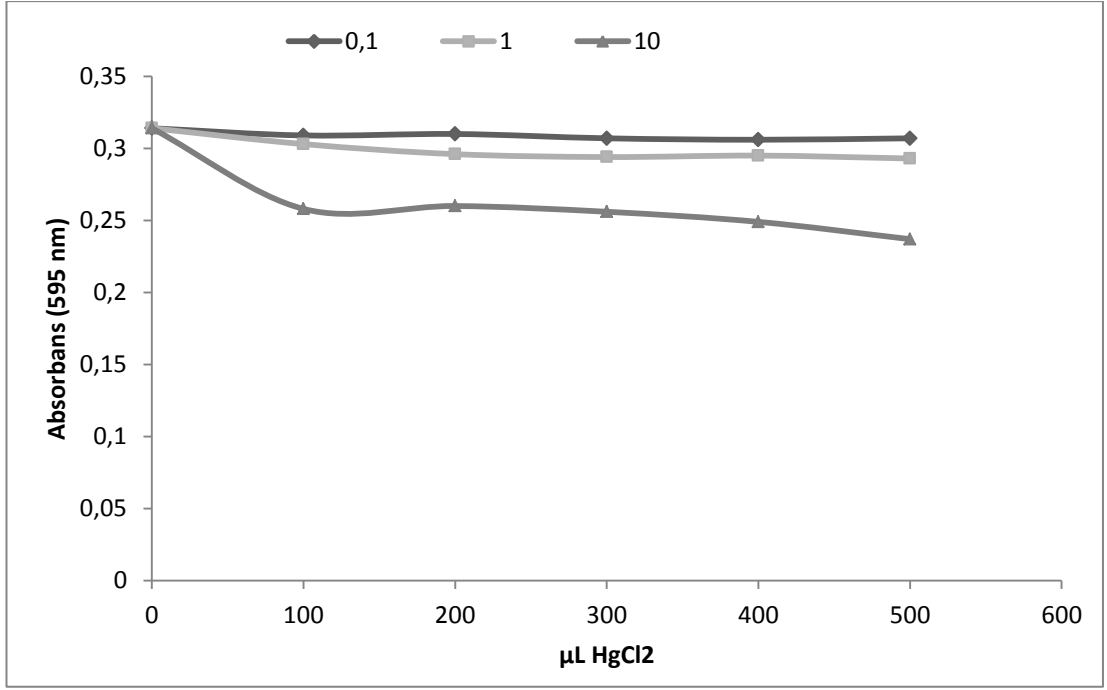
Çizelge 3.2 Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğı sonuçları

Substrat	KM (μM)	Vmax ($\mu\text{g/mL.dak}$)
Hemoglobin	2,90	1,4
Azokazein	2,54	1,87
Jelatin	0	0
Azoalbumin	0	0

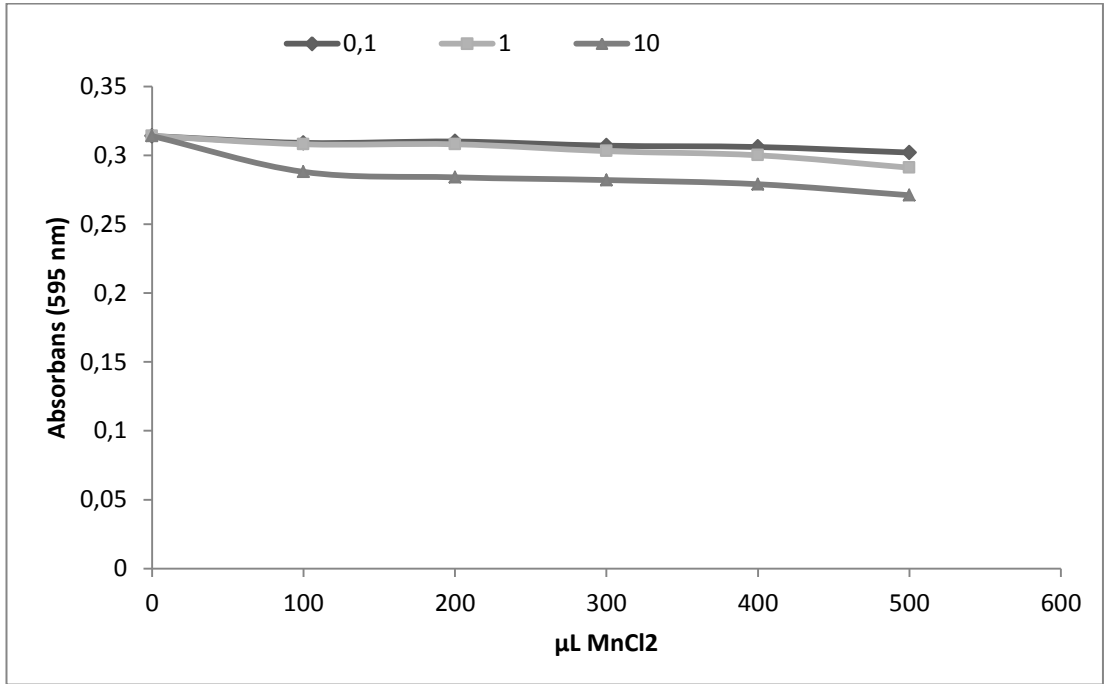
3.3.6. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin belirlenmesi

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM HgCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , NiCl_2 MgCl_2 bileşiklerinin etkileri incelendi. Proteolitik aktivite belirlenmesinde % 1' lik kazein varlığında kazeinin sindirimi yönteminden yararlanıldı.

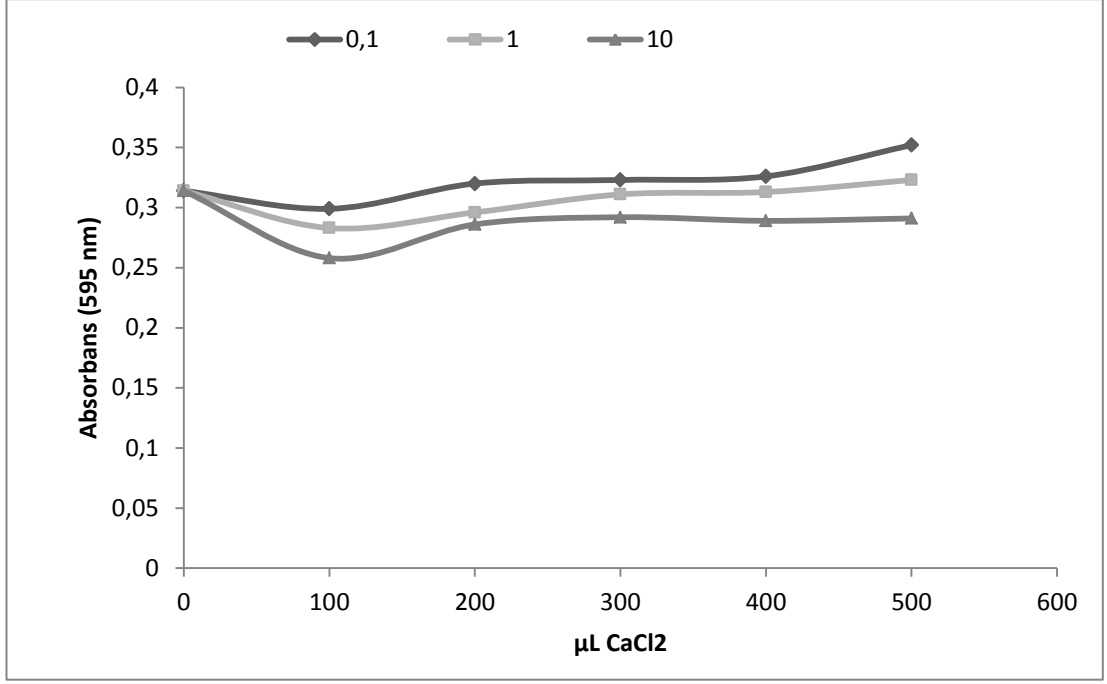
Her bir bileşik için katyon çözeltisinin artan oranının proteolitik aktiviteye etkileri ayrı ayrı Şekil 3.11., Şekil 3.12., Şekil 3.13., Şekil 3.14., Şekil 3.15., Şekil 3.16. ve Şekil 3.17.,' de gösterilmiştir. Ayrıca Çizelge 3.3' de HgCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , FeCl_2 , FeCl_3 , NiCl_2 MgCl_2 bileşiklerinin değişen konsantrasyonlarının varlığında saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivite değişim değerleri tablo halinde gösterilmiştir.



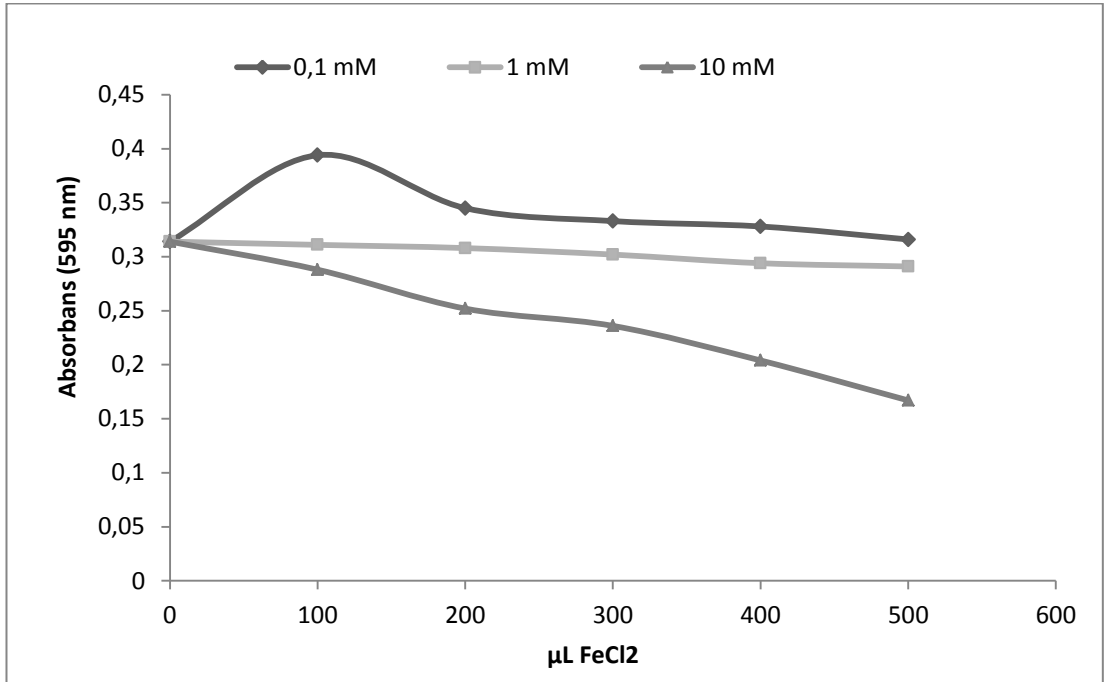
Şekil 3.11. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM HgCl₂' ün etkisinin sonuçları



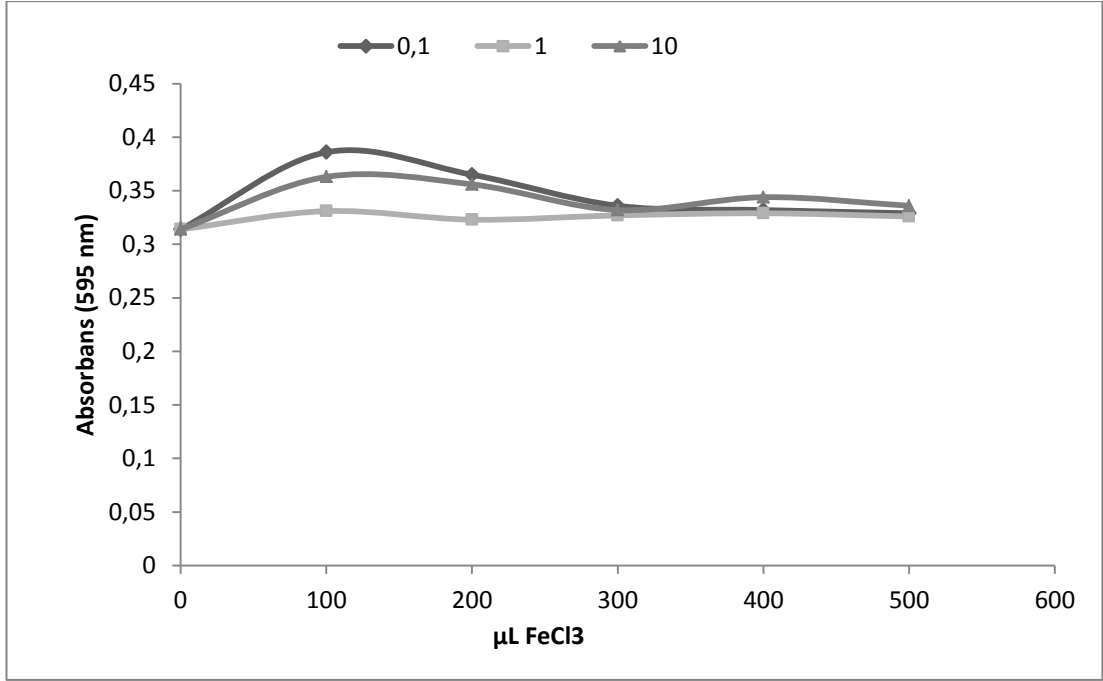
Şekil 3.12. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MnCl₂' ün etkisinin sonuçları



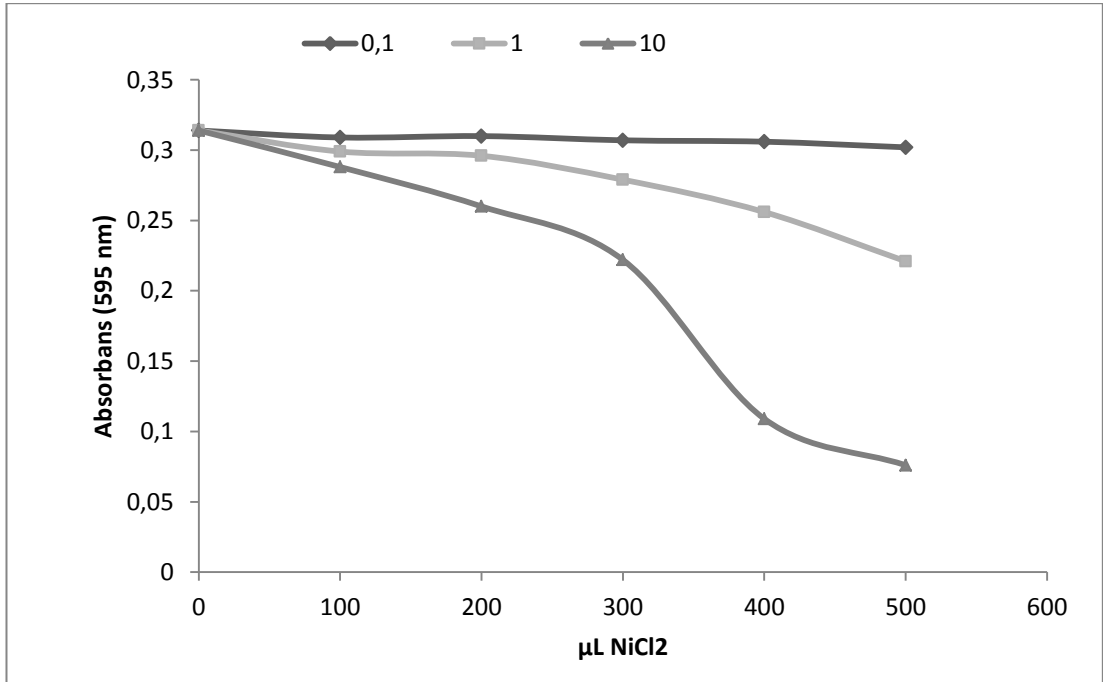
Şekil 3.13. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM CaCl₂' ün etkisinin sonuçları



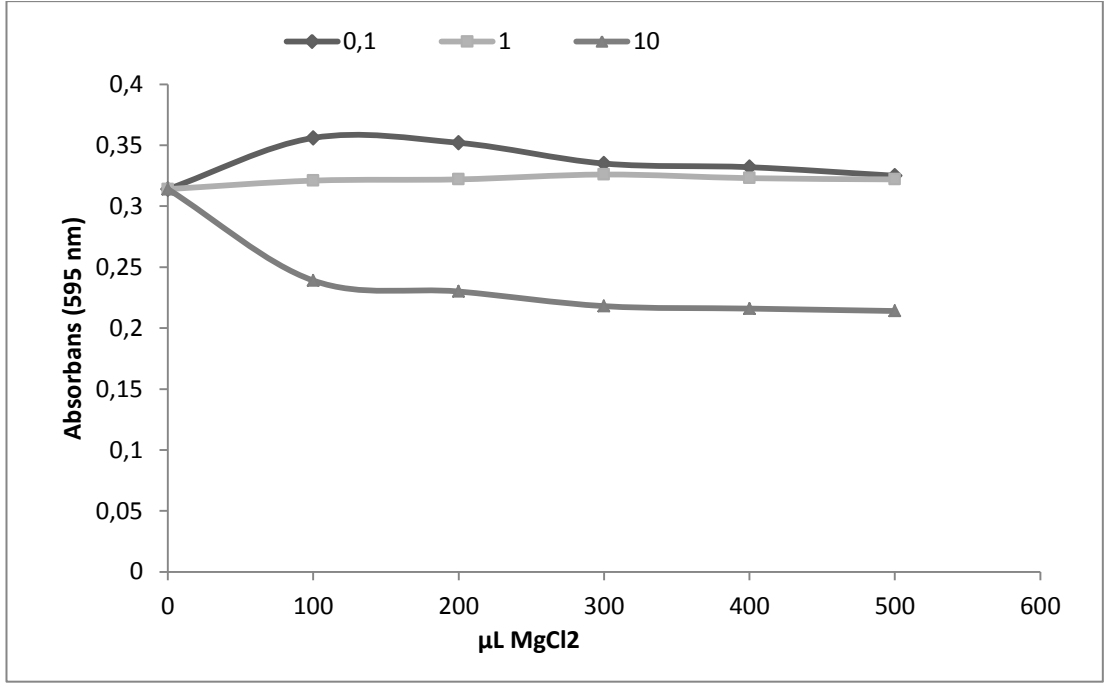
Şekil 3.14. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM FeCl₂' ün etkisinin sonuçları



Şekil 3.15. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM FeCl₃' ün etkisinin sonuçları



Şekil 3.16. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM NiCl₂' ün etkisinin sonuçları



Şekil 3.17. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM MgCl₂' ün etkisinin sonuçları

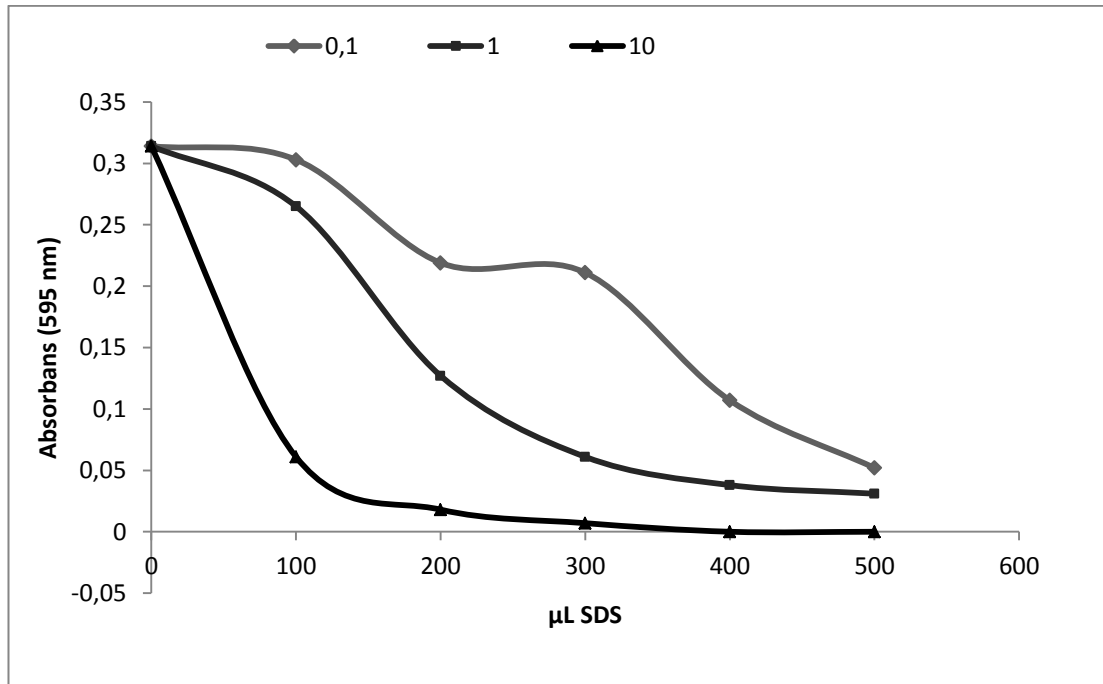
Çizelge 3.3 Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı katyonların etkisinin sonuçları

Kimyasallar	Konsantrasyon (mM)	Proteolitik Aktivite (%)
Kontrol	-	100
Mg^{+2}	0,1	108,28
	1	102,8
	10	71,15
Ca^{+2}	0,1	103,19
	1	97,20
	10	90,19
Mn^{+2}	0,1	97,70
	1	96,18
	10	89,43
Ni^{+2}	0,1	97,71
	1	86,05
	10	60,83
Hg^{+2}	0,1	98,03
	1	94,33
	10	80,26
Fe^{+2}	0,1	109,31
	1	95,92
	10	73,06
Fe^{+3}	0,1	111,34
	1	112,26
	10	104,21

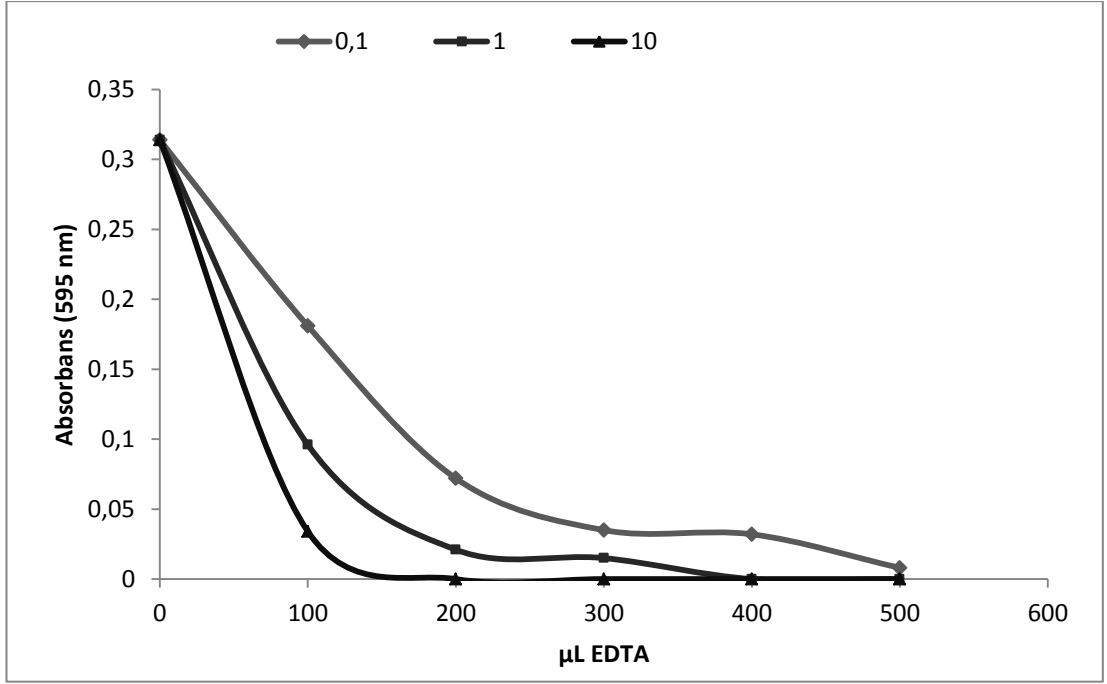
3.3.7. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin belirlenmesi

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM SDS (Sodyum dodesil sülfat), EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) ve β -merkaptoetanolün etkileri incelendi. Saflaştırılan enzimin kazein substratına karşı gösterdiği proteolitik aktiviteden yararlanarak bu işlem gerçekleştirildi.

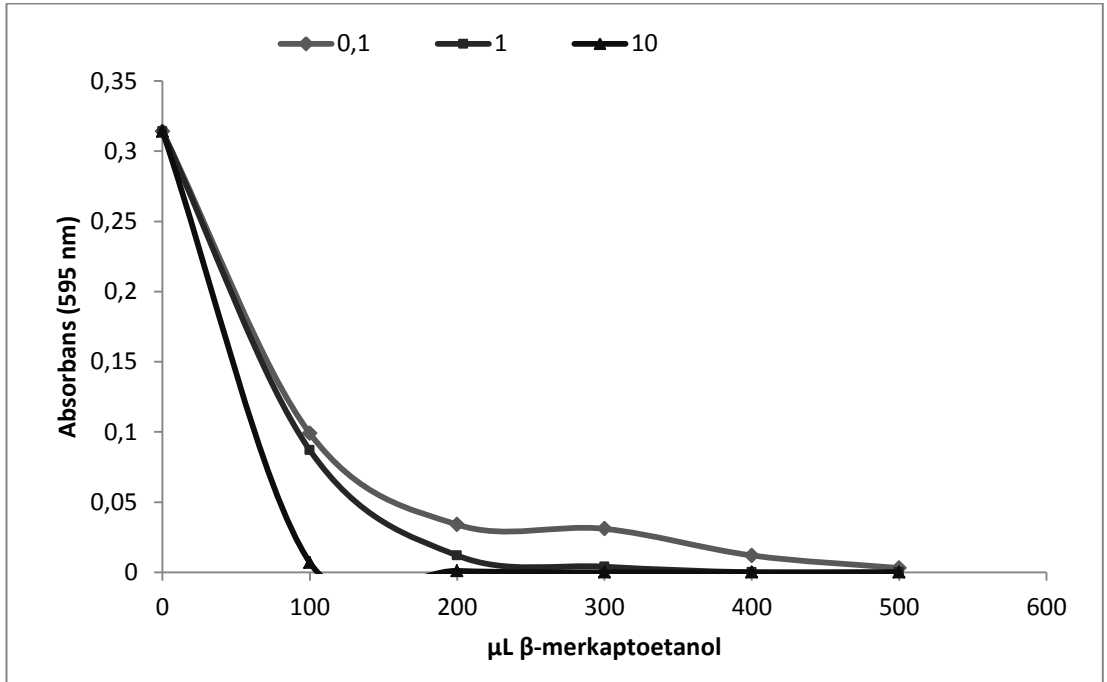
Saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivitesine etkisi incelenen kimyasalların her biri için ayrı ayrı artan miktara karşılık aktivite grafiği Şekil 3.18., Şekil 3.19. ve Şekil 3.20.,' de gösterilmiştir. Çizelge 3.4' de SDS (Sodyum dodesil sülfat), EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) ve β -merkaptoetanolün değişen konsantrasyonlarda gösterdiği proteolitik aktivite değerleri tablo halinde gösterilmiştir.



Şekil 3.18. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM SDS' in etkisinin sonuçları



Şekil 3.19. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM EDTA' in etkisinin sonuçları



Şekil 3.20. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine β-merkaptoetanolün etkisinin sonuçları

Çizelge 3.4 Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin sonuçları

Kimyasallar	Konsantrasyon (mM)	Proteolitik Aktivite (%)
Kontrol	-	100
SDS	0,1	56,81
	1	33,25
	10	5,48
EDTA	0,1	20,89
	1	8,40
	10	2,17
β -merkaptoetanol	0,1	11,40
	1	8,28
	10	0,51

3.4. Aroma Bileşenlerinin Headspace GC/MSD İle Analiz Sonuçları

Kır menekşesinin (*Viola odorata*) aroma maddeleri Headspace GC/MSD kullanılarak belirlendi. Taze kır menekşesinden (*Viola odorata*) 5,0 g alındı ve Headspace vialine yerleştirildi. Üzerine 1,0 g 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 trasferlile hattı ile GC/MSD' ye gönderildi ve analiz bu şekilde gerçekleştirildi. Analizden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.5' de gösterildi.

Çizelge 3.5 Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin aroma verici bileşenleri yüzdeleri

No	Bileşen Adı	Alıkonma Zamanı (dk.)	Yüzdesi (%)
1	Hexanal	0.733	3.01
2	2-Hexenal	0.963	19.31
3	1-Hexanol	1.040	13.28
4	Heptanal	1.267	1.76
5	1-Octen-3-ol	1.991	38.11
6	3-Octanone	2.084	2.23
7	2-pentyl-furan	2.137	1.99
8	Octanal	2.282	1.22
9	Nonanal	3.825	3.32
10	1,4-dimethoxy-benzene	4.872	8.89
11	2-Undecanone-6,10-dimethyl	14.623	2.41

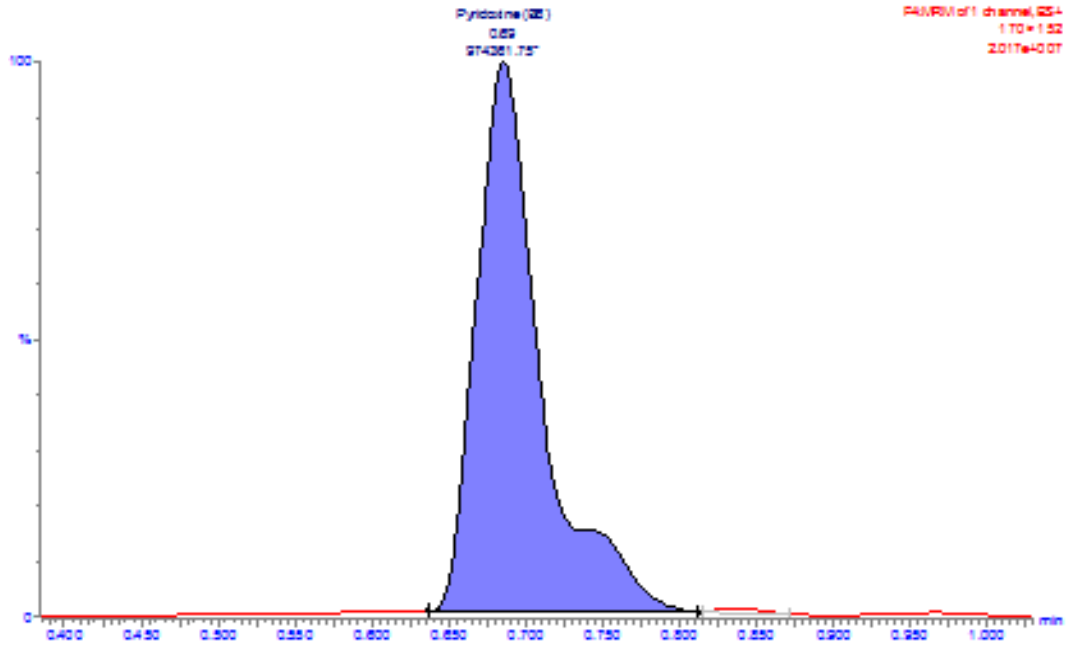
3.5. Kır Menekşesinin (*Viola odorata*) Vitamin Miktarlarının Belirlenmesi

3.5.1. B grubu ve C vitaminlerinin UPLC-MS/MS ile analiz sonuçları

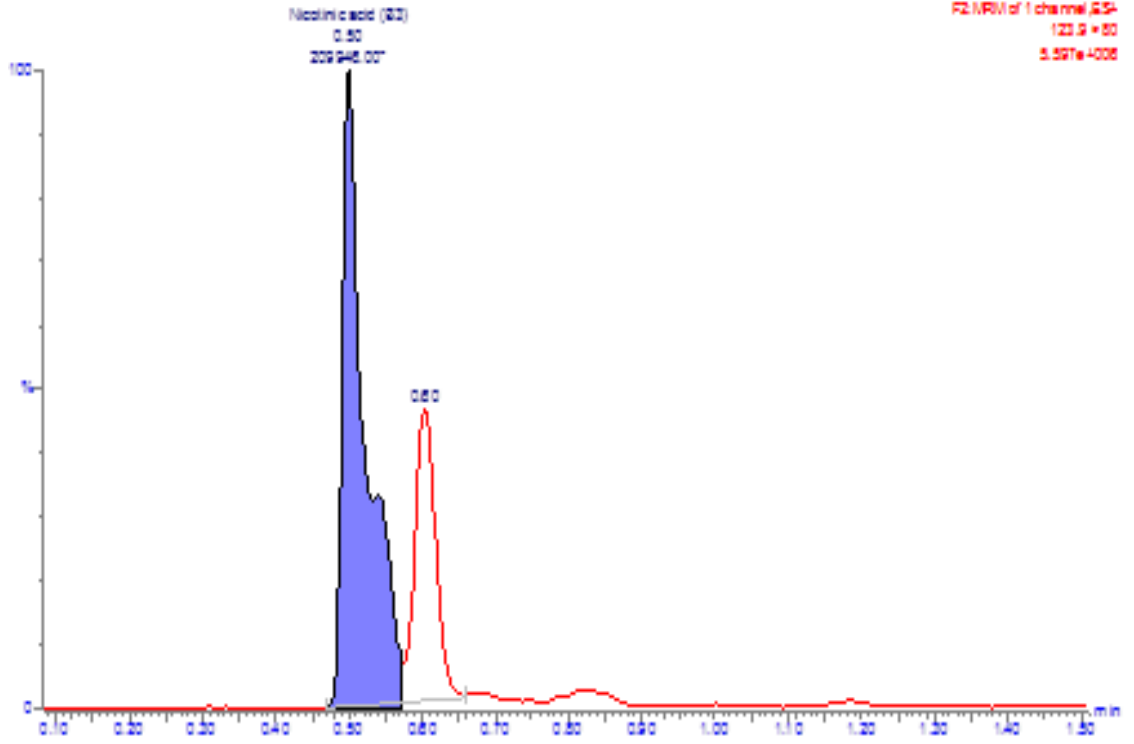
Tiamin (B₁ vitamini), Riboflavin (B₂ vitamini), Nikotinamid (B₃ vitamini), Nikotinik asit (B₃ vitamini), Pantotenik asit (B₅ vitamini), Piridoksin (B₆ vitamini), Biotin (B₇ vitamini), Folik asit (B₉ vitamini), Siyanokobalamin (B₁₂ vitamini) ve Askorbik asit (C vitamini), UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı ile analiz edildi. Ayrım Acquity UPLC BEH C18 kolonu (1,7 µm 2,1x100 mm) kullanılarak 40 °C’ da gerçekleştirildi. Numune sıcaklığı 10 °C ve enjeksiyon hacmi 1 µL’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 (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Kır menekşesinde (*Viola odorata*) bulunan, suda çözünebilen vitaminlerin UPLC-ESI-MS/MS ile analiz sonuçları (mg/100g kuru ağırlık $\pm$ standart sapma).

No	Vitamin Adı	Alıkonma Zamanı (dk.)	<i>Viola odorata</i>
1	Tiamin (B ₁ vitamini)	0.480	< RL
2	Riboflavin (B ₂ vitamini)	3.040	< RL
3	Nikotinamid (B ₃ vitamini)	0.860	< RL
4	Nikotinik asit (B ₃ vitamini)	0.510	0.28 $\pm$ 0.13
5	Pantotenik asit (B ₅ vitamini)	2.860	< RL
6	Piridoksin (B ₆ vitamini)	0.670	0.39 $\pm$ 0.03
7	Biotin (B ₇ vitamini)	3.070	< RL
8	Folik asit (B ₉ vitamini)	2.930	< RL
9	Siyanokobalamin (B ₁₂ vitamini)	2.950	< RL
10	Askorbik asit (C vitamini)	0.560	< RL



Şekil 3.21. Piridoksin (B₆ Vitamini) UPLC-MS/MS MRM kromatogramı



Şekil 3.22. Nikotinik asit (B₃ Vitamini) UPLC-MS/MS MRM kromatogramı

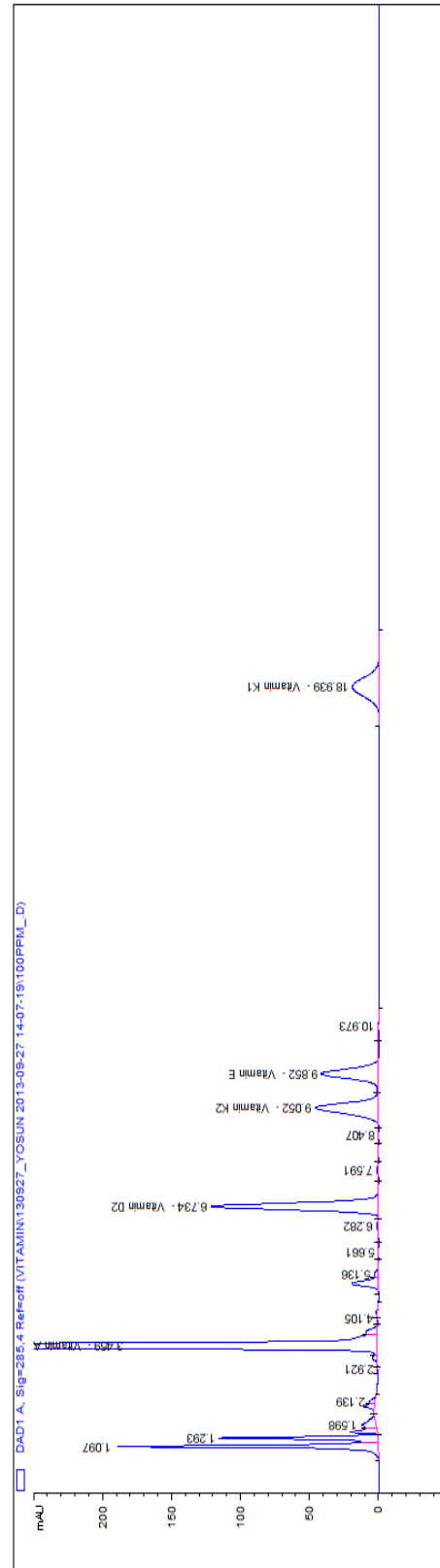
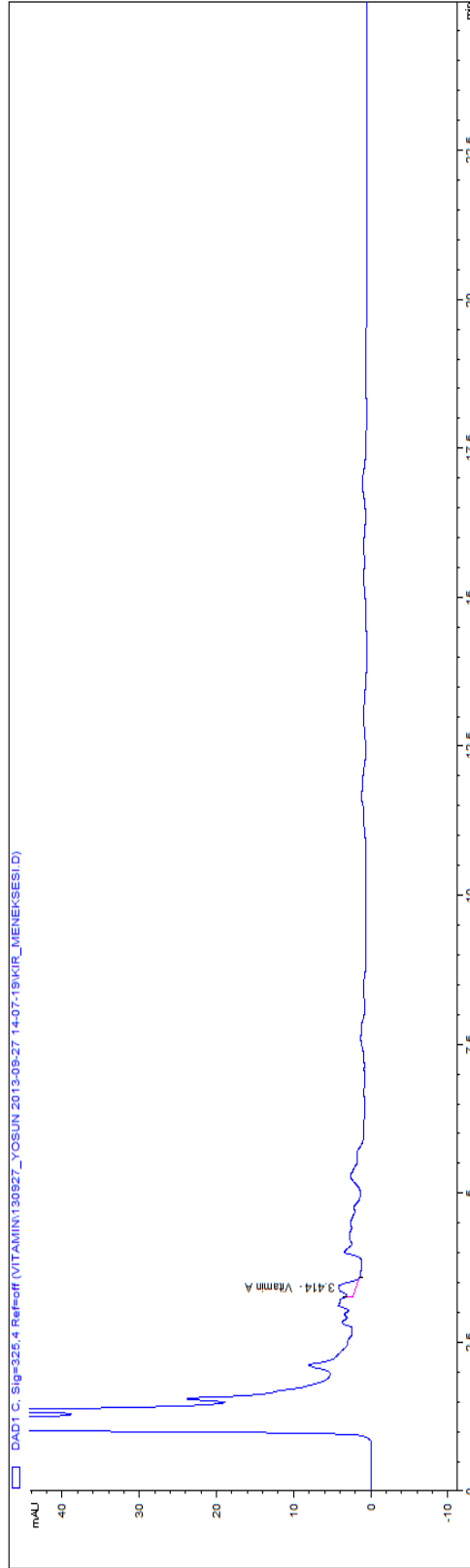
3.5.2. A, D, E ve K vitaminlerinin HPLC-DAD ile analiz sonuçları

Hekzan ekstraksiyonu ile elde edilip, temizlenen çözelti HPLC-DAD cihazı ile analiz edildi. Dedeksiyon A vitamini için 325 nm, D₂, K₁ ve K₂ vitaminleri için 260 nm ve E vitamini için ise 285 nm dalga boylarında ve ayırım Poroshell 120 EC-C18 kolonu (2,7 µm 4,6x100 mm) kullanılarak 40 °C’ de gerçekleştirildi. Numune sıcaklığı 20 °C ve enjeksiyon hacmi 20 µl’dir. Mobil faz olarak 0,5 mL/dk. akış hızı ile CH₃OH:H₂O (95:05) kullanılmıştır.

Çizelge 3.7’ de görüldüğü gibi kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin A, D, E ve K vitamin içeriği verilmiştir. Yapılan analizlerde kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinin A vitamini ve E vitamini içerdiği belirlendi. A vitamini ve E vitaminin kromatogramları Şekil 3.23.’ de verilmiştir.

Çizelge 3.7 Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde bulunan A, D, E ve K vitaminlerinin HPLC/DAD ile analiz sonuçları (mg/100 g kuru ağırlık $\pm$ standart sapma).

No	VitaminAdı	Alıkonma Zamanı (dk)	<i>Viola odorata</i>
1	A vitamini	3.567	0.12 $\pm$ 0.06
2	D ₂ vitamini	7.056	< RL
3	E vitamini	10.436	0.09 $\pm$ 0.02
4	K ₁ vitamini	20.142	< RL
5	K ₂ vitamini	9.504	< RL
6	Ergosterol (Provitamin D ₂)	8.490	< RL

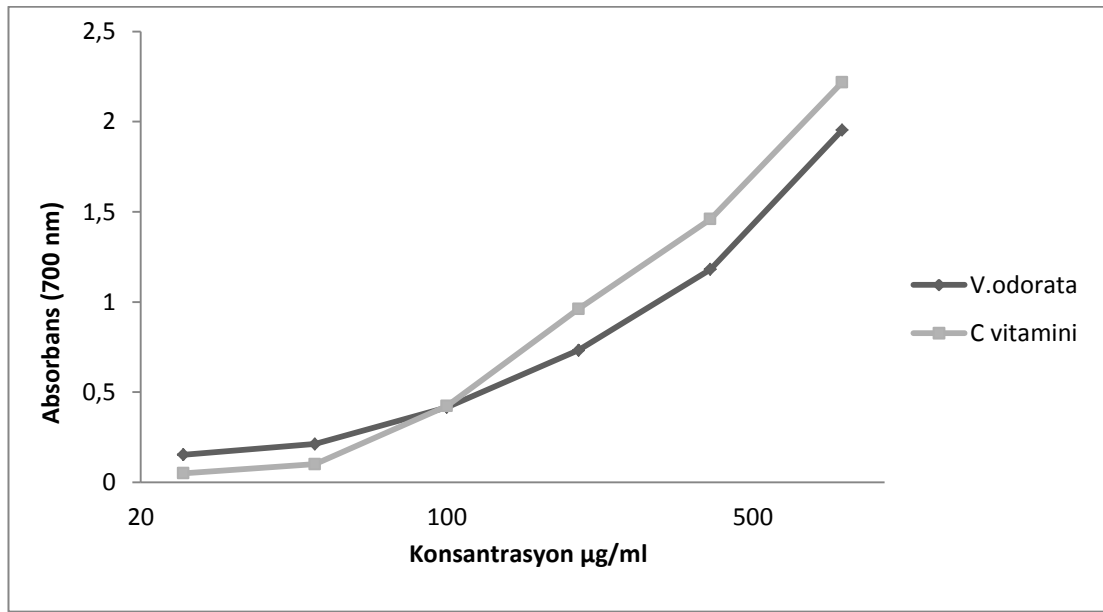


Sekil 3.23. Kır meneksesi (Viola odorata) bitkisinin ekstresinin ve vitamin standartlarının HPLC-DAD kromatogramları

3.6. Kır Menekşesi (*Viola odorata*) Bitkisinde Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları

3.6.1. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde indirgeme gücü tayini sonuçları

Kır menekşesi (*Viola odorata*) metanol ekstresi için indirgeme gücü tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı (Oyaizu, 1986). Standart olarak kullanılan C vitamini ile kır menekşesinin metanol ekstresinin indirgeme gücü tayin edildi, elde edilen sonuçlarla konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi ve Şekil 3.24.' de gösterildi.



Şekil 3.24. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin metanol ekstresinin indirgeme gücü tayini sonuçları

Kontrol için C vitamini kullanılmıştır.

3.6.2. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi tayini sonuçları

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinin radikal uzaklaştırma aktivitesi 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH[•]) yöntemiyle yapıldı (Blois, 1958). Reaksiyon ortamındaki DPPH[•] konsantrasyonunu bulmak için 517 nm' de ölçüm alındı. Absorbans değeri kullanılarak % DPPH[•] kapasitesi belirlendi. Sonuçlar Çizelge 3.8' de verildi. Kontrol olarak BHA ve vitamin C standartları kullanıldı.

Çizelge 3.8 Serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi sonuçları

Örnek	Serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi IC ₅₀ (µg/ ml)
Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) su ekstresi	228,2±5,7
Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) metanol ekstresi	197,5±8,3
BHA	48,47±3,7
Vitamin C	7,2±2,1

3.6.3. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde metal şelat aktivitesi tayini sonuçları

Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisi ekstrelerinde metal şelat aktivitesi tayini Dinis yöntemine göre yapıldı (Dinis vd., 1994). Yapılan işlemler sonucunda 562 nm’ de absorbans okundu ve okunan absorbanslardan % inhibisyon aktivitesi hesaplandı. Kontrol olarak EDTA standardı kullanıldı. Sonuçlar Çizelge 3.9’ da verildi.

Çizelge 3.9 Metal şelat aktivitesi tayini sonuçları

Örnek	Metal şelat aktivitesi IC ₅₀ (µg/ ml)
Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) su ekstresi	340,1±1,2
Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) metanol ekstresi	392,7±3,5
EDTA	21±0,9

3.6.4. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesi tayini sonuçları

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinde H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri yöntemine göre yapıldı (Ruch vd., 1989). Yapılan işlemler ve inkübasyon sonunda 230 nm’ de çözeltinin absorbansı okundu ve % H₂O₂

uzaklaştırma aktivitesi hesaplandı. Kontrol olarak vitamin C ve kersetin standartları kullanıldı. Sonuçlar Çizelge 3.10’ da verildi.

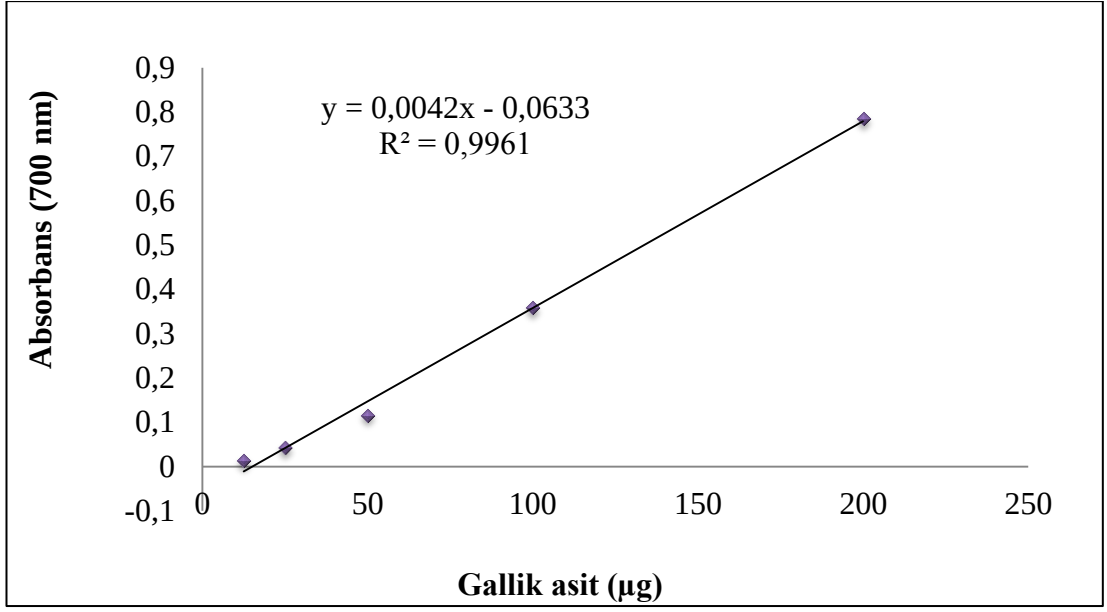
Çizelge 3.10 H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesi sonuçları

Örnek	H ₂ O ₂ uzaklaştırma aktivitesi IC ₅₀ (µg/ ml)
Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) su ekstresi	617±5,7
Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) metanol ekstresi	560±7,8
Vitamin C	20,8±0,73
Kersetin	49,3±2,38

3.6.5. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinde toplam fenolik bileşiklerin varlığı Silinkart ve Singleton yöntemlerine göre yapıldı (Silinkart ve Singleton, 1977). Bu yöntem doğrultusunda yapılması gereken tüm işlemler yapıldı ve sonrasında 700 nm dalga boyunda çözeltinin absorbansı okundu. Şekil 3.25.’ de verilen gallik asit standart grafiğinden faydalanılarak elde edilen denklemden toplam fenolik bileşiklerin miktarları belirlendi.

$$\text{Absorbans} = 0,0008x + \text{Gallik asit (g)}$$



Şekil 3.25. Gallik asit standardı kalibrasyon eğrisi

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Taksonomik olarak, kapalı tohumlular bölümünde, iki çenekliler sınıfı içinde yer alan, menekşegiller yaklaşık 500 tür içermektedir. Menekşe kozmetik sektöründe değerli bir materyaldir. Özellikle parfümeri sektörü menekşenin kokusundan sıklıkla faydalanılmaktadır.

Kır menekşesinin (*Viola odorata*) tarihi M.Ö. 500' lere kadar dayanır. O zamanlarda kanserden dolayı oluşan ağrıları gidermek için kullanılmıştır (Kapoor, 1990). Antik çağlardan beri Avrupa' da kozmetik ve sağlık için yetiştirilmektedir (Marcussen, 2006). Akdeniz bölgesi, güney-batı Avrupa ve Batı Asya'nın bazı bölgelerinde orjinal alanın ötesinde dağılıma sahiptir (Valentine vd., 1968; Hulten ve Fries, 1986; Marcussen ve Borgen, 2000). Bronşit, mide ağrısı, ateş, grip, pnömoni, ve öksürük için kır menekşesinin (*Viola odorata*) çiçek ve yaprakları yerli halk tarafından ilaç olarak kullanılır. Bu bitki dünya çapında geniş uygulamalara sahiptir. Farklı yazarlara göre: İtalya ve Bulgaristan' da öksürüğe karşı kullanılır (Leporatti ve Ivancheva, 2003); Karayip bölgesinde balgam söktürücü olarak kullanılır (Halberstein, 2005); İtalya Marches' de deri hastalıkları için önerilir (Pieroni vd., 2004); ve İsrail' de yaygın olarak doğal bir ilaç şeklinde kullanılır (Lev, 2006). İran halk hekimliğinde geleneksel olarak kullanılan tıbbi bitkidir. Ekzama, ağız enfeksiyonları ve tümörlerin tedavisinde diğer bitkilerle birlikte kullanılmıştır ve balgam söktürücü, idrar söktürücü, enfeksiyon giderici, iltihap sökücü ve laksatif özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (Schimmer ve Parker, 2001). Kır menekşesinin (*Viola odorata*) kökü çocuklarda kusturucu olarak kullanılmıştır (Kocher, 1988). Geleneksel sistemde, endişe (Keville, 1999), uykusuzluk ve düşük kan basıncına (Duke vd., 2002) tedavi olarak kullanılmıştır.

Yapılan bu çalışmada kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden proteaz enzimi saflaştırıldı, A vitamini, B₃ vitamini, B₆ vitamini ve E vitamini varlığı ve miktarı belirlendi. Ayrıca kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden elde edilen ekstraktlarda antioksidan aktivite tayini yapıldı. Yapılan tüm bu çalışmalarla birlikte kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden

saflaştırılan proteaz enziminin kozmetik endüstrisinde kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı.

Saflaştırma işlemi için yapılan literatür taramalarında bu işlemlerde yaygın olarak kullanılan yöntemin iyon değişim kromatografisi olduğu kanısına varıldı. Saflaştırma işlemi iki basamakta gerçekleştirildi.

1. basamakta amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı ve en yüksek aktiviteye sahip olan saflaştırma basamağı belirlendi. En yüksek aktiviteye sahip saflaştırma basamağının % 80 - 100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapılan çökelekte olduğu belirlendi.

2. basamakta kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden elde edilen homojenat önce diyalizlendi, sonra CM-Selüloz iyon değişim kolonuna yüklendi. CM-Selüloz iyon değişim kolonuna yüklenen enzim yıkama işlemlerinden sonra 0,1 - 1 M NaCl ile tuz gradienti oluşturularak kolondan elüe edildi, tüm elüatlarda proteolitik aktivite tayini yapıldı. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin aktivite - absorbans grafiği Şekil 3.2.' de gösterildi. Absorbans gözlenen fraksiyonlarla aktivite gösteren fraksiyonların çakışması, fraksiyonlardaki absorbans veren proteinlerin proteaz enzimi olduğunu kanıtlamaktadır.

Aktivite gösteren elüatlardan enzim havuzu oluşturuldu. Oluşturulan enzim havuzundan alınan örnekte proteolitik aktivite tayini yapıldı. Yapılan aktivite sonuçları saflaştırma tablosu halinde Çizelge 3.1' de verildi ve proteaz enziminin kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden % 43,125 kat saflaştırıldığı hesaplandı. Saflaştırılan proteaz enziminin iki alt birime sahip olduğu elde belirlendi ve Şekil 3.3.' te protein bantları SDS-PAGE fotoğrafı ile gösterildi.

Oluşturulan enzim havuzundan yararlanarak kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

Karakterizasyon çalışmalarının birincisi optimum pH' nın belirlenmesidir. Optimum pH değerinin belirlenmesi için pH 4 - 9 aralığında proteolitik aktivite tayini yapıldı, ölçümler alındı, pH - absorbans grafiği çizildi ve optimum pH: 7,0 olarak bulundu.

İkinci karakterizasyon çalışması optimum sıcaklığın belirlenmesidir. Optimum sıcaklık belirlemesi için proteolitik aktivite ölçümünün yapıldığı sıcaklık aralığı 10 - 90 °C' dir. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan

proteaz enziminin en yüksek aktivite ölçümünün alındığı sıcaklık 40 °C olarak belirlendi.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi kullanarak belirlendi. Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiği Şekil 3.6.' da, molekül ağırlığı tayini grafiği de Şekil 3.7.' de verilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi standart grafiğinden yola çıkarak kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığı 25 kDa olarak bulundu.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin kazein için K_m ve V_{max} değerleri Lineweaver - Burk grafiği oluşturularak hesaplandı. K_m değeri 1,33 μ M ve V_{max} değeri 1,29 μ g/mL olarak bulundu.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğini belirlemek için kazein hariç dört farklı substrat kullanıldı. Hemoglobin, jelatin, azoalbumin ve azokazein kullanılan substratlardır. Bu substratlarla proteolitik aktivite tayinleri yapıldı ve kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin jelatin ve azoalbumini hidrolizlemediği gözlemlendi. Kazein, hemoglobin ve azokazein için Lineweaver - Burk grafikleri çizildi. Çizilen Lineweaver - Burk grafiklerinden faydalanılarak her bir substrat için ayrı ayrı K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Bu değerler Çizelge 3.2' de verildi ve kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin ilgisinin en çok kazein substratına karşı olduğu belirlendi.

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM $HgCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $FeCl_2$, $FeCl_3$, $NiCl_2$ $MgCl_2$ bileşiklerinin etkileri de incelendi. Çizelge 3.3' de Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} ve Ca^{2+} , katyonlarının düşük konsantrasyonlarda kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesini artırdığını, Ni^{2+} katyonunun ise kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimini kısmen inhibe ettiği görüldü. Hg^{2+} katyonunun düşük konsantrasyonlarda enzimin aktivitesini etkilemediği belirlendi. $FeCl_3$ hariç yüksek konsantrasyonlardaki katyonların kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesini azalttığı gözlemlendi.

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine SDS (Sodyum dodesil sülfat), EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) ve β -merkaptotanolün (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) etkileri incelendi. Yapılan deneylerde SDS ve EDTA'nın düşük konsantrasyonlarında enzimin aktivitesinin kısmen inhibe olduğu, kullanılan tüm kimyasalların yüksek konsantrasyonlarda enzimi tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir (Çizelge 3.4). β -merkaptotanol varlığında aktivitenin düşmesi saflaştırılan enzimde disülfid bağlarının bulunduğunu gösterir. β -merkaptotanol disülfid bağlarını kırarak enzimin üç boyutlu yapısını değiştirir ve aktivitesini kaybetmesine neden olur. EDTA varlığında aktivitenin düşmesi enzimin kofaktör olarak metal iyonunu kullandığını gösterir.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) çiçeklerinin aroma maddeleri Headspace GC/MSD kullanılarak belirlendi (Çizelge 3.5). In-House bir metodun kullanıldığı analiz sonucunda kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinde hexanal (% 3,01), 2-hexenal (% 19.31), 1-hexanol (% 13.28), heptanal (% 1.76), 1-octen-3-ol (% 38.11), 3-octanone (% 2.23), 2-pentyl-furan (% 1.99), octanal (% 1.22), nonanal (% 3.32), 1,4-dimethoxy-benzene (% 8.89) ve 2-undecanone-6,10-dimethyl (% 2.41) bileşenlerine rastlanılmıştır.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) çiçeklerinin suda çözünebilen vitaminleri UPLC-ESI -MS/MS ile (Çizelge 3.6), yağda çözünen vitaminleri HPLC/DAD ile (Çizelge 3.7) analiz edildi. Yapılan analizler sonucunda nikotinik asit (0.28 ± 0.13), piridoksin (0.39 ± 0.03), A vitamini (0.12 ± 0.06) ve E vitamini (0.09 ± 0.02) bulunmuştur. UPLC-ESI -MS/MS ile varlığı belirlenen piridoksinin (B6 vitamini) kromatogramı Şekil 3.21.' de, nikotinik asidin (B₃ vitamini) kromatogramı Şekil 3.22.'de verilmiştir. HPLC/DAD ile analiz edilerek varlığı belirlenen A ve E vitaminlerinin kromatogramları da Şekil 3.23.' de verilmiştir.

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) alınan ekstrelerde antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Kır menekşesi (*Viola odorata*) metanol ekstresi için indirgeme gücü tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı (Oyaizu, 1986). Standart olarak C vitamini kullanılmıştır. İndirgeme gücü sonuçları Şekil 3.24.' de verilmiştir. Şekil 3.24.' e bakıldığında kır menekşesinden (*Viola odorata*) alınan ekstrelerin C vitaminine yakın aktivite gösterdiği görülmektedir.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinin serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) yöntemiyle yapıldı (Blois, 1958). Standart olarak C vitamini ve sentetik antioksidan olan BHA kullanıldı. Serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi tayini sonuçları Çizelge 3.8' de verilmiştir. Çizelge 3.8' e bakıldığında metanol ekstresinin su ekstresine göre daha aktif olduğu görülmektedir.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisi ekstrelerinde metal şelat aktivitesi tayini Dinis yöntemine göre yapıldı (Dinis vd., 1994). Standart olarak EDTA kullanıldı. Metal şelat aktivitesi tayini sonuçları Çizelge 3.9' de verilmiştir. Çizelge 3.9' da verilen sonuçlara göre kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinden su ekstresi metanol ekstresine göre daha aktiftir.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinde H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri yöntemle göre yapıldı (Ruch vd., 1989). Standart olarak vitamin C ve kersetin kullanıldı. H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesi tayini sonuçları Çizelge 3.10' de verilmiştir. Çizelge 3.10' da verilen sonuçlara göre kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinden metanol ekstresi su ekstresine göre daha aktiftir.

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinde toplam fenolik bileşiklerin varlığı Silinkart ve Singleton yöntemlerine göre yapıldı (Silinkart ve Singleton, 1977). Şekil 3.25.' de verilen gallik asit standart grafiğinden faydalanılarak elde edilen denklemden metanol ekstresinde toplam fenolik bileşiklerin miktarları 27,3µg GAE/mg iken su ekstresi için 41,8 µg GAE/mg olarak belirlendi.

Yapılan tüm çalışmaların sonucunda menekşeden bitkisel kaynaklı ve hızlı sonuç veren cilt bakım ürününün tasarlanıp üretilebileceği görülmüş, numune ürün üretimi yapılmıştır. Yapılan yeni cilt bakım kremi kullananlar, kullandıktan hemen sonra kremin etkisini gördüklerini dile getirdi. Proteaz enziminin varlığı tasarlanan ürüne peeling işlemi özelliği kattı ve ciltteki ölü deriyi uzaklaştırarak cildin yumuşamasını sağladı. 1-Hexanol bileşiğinin nem tutma ve kıvam artırıcı özelliği, tasarlanan cilt bakım ürününün nemlendirici etkisini arttırdı ve ciltteki kuruluğu giderdi.

KAYNAKLAR

- Akkuş, İ. (1995) Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri, *Mimoza yayınları*, Konya, 134s.
- Altan, N. (2000) *Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım*, 1. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 706s.
- Amin, A.S. (2001) Colorimetric determination of tocopheryl acetate (vitamin E) in pure form and in multi-vitamin capsules, *Eur J Pharm Biopharm*, 51: 267-272.
- Aruoma, O.I. ve Cuppett, S.L. (1997) *Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 241s.
- Beyazoğlu, O. (2005) *Tohumlu Bitkiler Sistematiği*, Esen Ofset Matbaacılık, ISBN:975-98513-6-9, Trabzon, 125s.
- Bingöl, G. (1983) *Biyokimya*, 3. Baskı, Güven Matbaası, Ankara, 380s.
- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199–1200.
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding, *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Buchanan, B.B., Schurmann, P., Decottignies, P.T. ve Lozano, R.M. (1994) Perspectives in biochemistry and biophysics: thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a
- Cheeseman, K, H., Slater, T,F. (1993) An Introduction to Free Radical Biochemistry, *Br. Med. Bull.*, 49(3): 479-480.
- Cook, N.C. ve Samman, S. (1996) Flavonoids-chemistry metabolism cardioprotective effects and dietary sources, *Nutr Biochem*, 7: 66–76.
- Çetintaş, Y. (2013) *Sarcosphaera crassa* (santi) Pouz. türünün pişirilmesiyle kimyasal bileşimlerinin ve biyoaktivitelerinin değişiminin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 128s.
- Dorman H.J.D. and Deans S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants antibacterial activity of plant volatile oils, *J Appl Microbiol*, 88: 308 - 316.
- deMan, J.M. (1999) *Principles of Food Chemistry*, 3. baskı, An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, 522s.

- Dinis, T.C., Madeira, V.M. ve Almeida, L.M. (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers, *Arch Biochem Biophys*, 315: 161-169.
- Duke, J.A., Bogenschutz-Godwin, M.J., Duccellar, J. ve Duke, P.A. (2002), *Handbook of Medicinal Herbs*, CRC Press, Boca Raton, 936s.
- Ercan N. ve Fidancı U.R. (2012) Piyodermalı köpeklerde idrarda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59: 163-168.
- Erden, M. (1992) Serbest radikaller , *T. Klin. Tıp Bilimleri Dergisi*, 12: 201-207.
- Fadıloğlu, S. (2001) Immobilization and characterization of ficin, *Nahrung*, 45 (2): 143-146.
- Fersht, A. (1985) *Enzyme structure and mechanism*, Freeman Publication, New York, 475s.
- Frey, P.A. and Hegeman, A.D. (2007) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University New York, 831s.
- Fridovich, I. (1986) Superoxide Dismutases, 61-97, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, John Wiley & Sons, USA, 389s.
- Gutteridge J.M.C. (1993) Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence, *Free Radic Res Commun*, 19(3): 141-158.
- Gutteridge, J.M.C. (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clin Chem*, 41: 1819-1828.
- Halberstein, R. (2005) Medicinal plants: historical ve cross-cultural usage patterns, *Ann Epidemiol*, 15: 686-699.
- Halliwell, B. (1994) Free Radicals and Antioxidants: A Personal View, *Nutr Rev.*, 52: 253-265.
- Hammer K.A., Carson C.F. ve Riley T.V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *J Appl Microbiol*, 86 (6): 985 - 990.
- Hudson, B.J.F. (1990) *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science, London and New York, 316s.
- Hulten, E. ve Fries, M. (1986) *Atlas of North European vascular plants north of the Tropic of Cancer*, 2.cilt, Koeltz Scientific Books, Königstein, 1172s.
- Igari, T., Kaneda, H., Houriuchi, S. ve Onu, S. (1982) A remarkable increase of superoxide dismutase activity in synovial fluid of patient with rheumatoid arthritis, *Clin Orthop Relat Res*, 162: 282-287.

- Karlson, P. (1988), Telefoncu, A. (1992) *Tıp ve Fen Bilimleri İçin Biyokimya*, Arkadaş Tıp Kitapları, İstanbul, 464s.
- Kapoor, L.D. (1990) *Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants*, CRC Press, Boca Raton, 416s.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. (2012) *Biyokimya*, Şafak Yayınevi, Erzurum, 653s.
- Kemikli, B. (2007) *Divan Şiirinde Hastalık ve Tedavi*, Uludağ Üniv. İlahiyat Fak. Der. 16: 19-36.
- Keskin, H. (1982) *Besin Kimyası*, 5. Baskı, Fatih Yayınevi ve Matbaası, İstanbul, 651 s.
- Keville, K. (1999) *Viola odorata L. in Illustrated Herb Encyclopedia*, Michael Friedman publishing group, New York, 224s.
- Kıvrak, İ. (2013) *Tuber aestivum ve Calvatia gigantea mantarlarının kimyasal bileşimlerinin headspace GC/MSD, HPLC/DAD-RID ve UPLC-MS/MS sistemleri ile analizi, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 283s.
- Koca, İ., (2007) Kızılcık ve Trabzon Hurması Pekmezlerinin Üretim Teknikleri, *GTED*, 2 (2): 33-37.
- Kocher, L. (1988) Systematic naloxone does not affect pain-related behavior in formalin-test in rats, *Physiol, Behavior* 43 (3): 265-268.
- Koolman, J. ve Rohm K.H. (1996) *Color atlas of biochemistry*, Thieme, Stuttgart, 435s.
- Köksal, E. (2007) Karnabahar (Brassica Oleracea L.) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Antioksidan Ve Antiradikal Aktivitesinin Belirlenmesi, Atatürk Üniversitesi, Doktora Tezi, Erzurum.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680–685.
- Larson, R.A. (1988) The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*, 27: 969–978.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. ve Cox, M.M. (1982) *Principle of Biochemistry*, Worth Publishers Inc., New York, 673s.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. ve Cox, M.M. (2005) *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers Inc., New York, 1158s.
- Leporatti, M.L. ve Ivancheva, S. (2003) Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy, *J Ethnopharmacol*, 87: 123–142.
- Lev, E. (2006) Ethno-diversity within current ethno-pharmacology as part of Israeli traditional medicine-a review, *J Ethnobiol Ethnomed*, 2: 4.

- Limited, S. ve Hyderabad, L.B.N. (1996) Colorimetric determination of vitamin-A with 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde, *Indian J. Pharm. Sci*, 58 (4): 171-3.
- Marcussen, T. ve Borgen, L. (2000) Allozymic variation and relationships within *Viola* subsection *Viola* (Violaceae), *Plant Syst Evol*, 223: 29–57.
- Marcussen, T. (2006) Allozymic variation in the widespread and cultivated *Viola odorata* in western Eurasia, *Bot J Linn Soc*, 151: 563-572.
- McIntosh, J. E. A., 1969. Carbonic anhydrase isoenzymes in the erthrocytes and dorsolateral prostate of the rat, *Biochem J*, 114 (3): 463-476.
- North, T., Pienaar, K., Purdy, G., Silk, J., Ryan, S. ve Schien, G. (2004) *Botanica*, Koenemann, Italy, 1019s.
- Onat, T. ve Emerk, K. (1997) *Temel Biyokimya*, 2. Baskı, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 496s.
- Oyaizu, M. (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Jpn J Nutr*, 44: 307–315.
- Özata, A. ve Kutlu, M. (2000) *Enjimoloji Ders Notları*, T. C. Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 117s.
- Öztürk, N., Tunalier, Z., Koşar, M. ve Başer, K.H. (2002) *Petroselinum Crispum*, *Anethum Graveolens* ve *Eruca Sativa*'nın Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir
- Packer, L. ve Cadenas, E. (2002) *Handbook of Antioxidants*, New York, Basel, USA, Marcel Dekker, 602s.
- Papas, A.M. (1996) Determinants of antioxidant status in humans, *Lipids*, 31: 77–82.
- Pauling, L. (1973) Die Natur der chemischen Bindung, *Chemie-Varlag*, Weinheim, 66 (1): 470-523.
- Pieroni, A., Quave, C., Villanelli, M.L., Mangino, P., Sabbatini, G., Santini, L., Boccetti, T., Profili, M., Ciccio, T., Rampa, L.G., Antonini, G., Girolamini, C., Cecchi, M. ve Tomasi, M. (2004) Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy, *J Ethnopharmacol*, 91: 331–344.
- Reineccius, G.A. (1994) *Source Book of Flavors*, Aspen Publisher, New York, 931s.
- Reische, D.W., Lillard, D.A. ve Eitenmiller, R.R. (2002) Oxidation. İçinde. Akoh CC, Min DB. editör. Food Lipids Chemistry, *Nutr Biotechnol*, New York: Marcel Dekker Inc, 335-542s.

- Ruch, R.J., Cheng S.J. ve Klaunig, J.E. (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, *Carcinogenesis*, 10 (6): 1003-1008.
- Schimmer, B.P. ve Parker, K. (2001) Adrenocorticotrophic hormones: Adrenocortical steroids and their synthesis and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones, 1649-1678, *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill Medical Publishing Company, New York, 2005s.
- Sigman, D.S. ve Boyer, P.D. (1970) *The Enzymes*, Academic Press, New York, 959s.
- Slinkard, K. ve Singleton, V.L. (1997) Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods, *Am J Enol Viticult*, 28: 49–55.
- Smirnoff, N. (2000) Ascorbic Acid: metabolism and function of a multifaceted molecule, *Curr Opin Plant Biol*, 3: 229-235.
- Stuart, M. (1989) *The Encyclopedia of Herbs and Herbalism*, Edited by: Stuart M., Caxton, Spain, 304s.
- Tabakoğlu, E. ve Durgut, R. (2013) Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri, *AVKAE Derg.*, 3(1): 69-75.
- Taylor, M.J. ve Richardson, T. (1980) Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin, *J Food Sci*, 30: 1223–1227.
- Tekman, S. ve Ömer, N. (1981) *Genel Biyokimya*, Fatih Yayın Evi Matbaası (3. Baskı), İstanbul, 335s.
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H.A. ve Aydin, 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.
- Tzia, C. ve Liadakis, G. (2003) *Extraction Optimization in Food Engineering*, CRC Press, Boca Raton, 409s.
- Uçkaya, F. (2011) Antalya’da yetişen *Ziziphus zizyphus*’un antioksidan aktivitesi ve biyokimyasal bileşiminin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Valentine, D.H., Merxmüller, H. ve Schmidt, A. (1968) *Viola L.*, 270-282, Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. ve Webb, D.A. (editörler), *Flora Europaea*, 2. Cilt, Cambridge University Press, Cambridge, 433s.
- Valko, M., Leibfritz D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M. ve Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 44–84

- Voet, D.ve Voet, J.G. (1995) *Biochemistry*, Wiley, New York, 1223s.
- Wolfson, D., Olmstead, S., Meiss D. ve Ralston J. (2008) *Making Sense of Digestive Enzymes*, Klaire LabsTM, A division of ProThera^R, Inc.
- Yağcı, C., Toker, M.C. ve Toker, G. (2008) Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoidler, *TJSR*, 1 (1): 47-58.
- Yamazaki, E., Inagaki, M., Kurita, O. ve Inoue, T. (2007) Antioxidant Activity of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum*) Fruit, *Food Chem*, 100: 171–177.
- Yılmaztekin, M., Cabaroğlu, T. Ve Erten, H. (2008) Biyoteknolojik yollarla aroma maddelerinin üretimi, *Gıda*, 33 (1): 35 - 41

EKLER



Kır menekşesi (*Viola odorata*) 10-15 cm' ye kadar boylanabilen, çok yıllık, dayanıklı otsu bir bitkidir. Koyu yeşil renkli, kalp biçimli, kenarları dişli ve uzun saplı yaprakları vardır. Yaprak sapları ve ayanın alt ve üst yüzü kısa tüylerle kaplıdır. Kış sonu ile ilkbahar başlarında açan beş taç yapraklı çok güzel görünümlü çiçekleri mor renklidir. Bu çiçekler çok hoş bir koku taşır ama sadece koparıldıkları zaman kokarlar. Kokulu menekşe bitkisi, kısa rizomlarıyla toprağa değdiği yerde kök atar ve çevresine yayılır. Bu nedenle çok iyi yer örtüsü oluşturan bitkilerdendir.



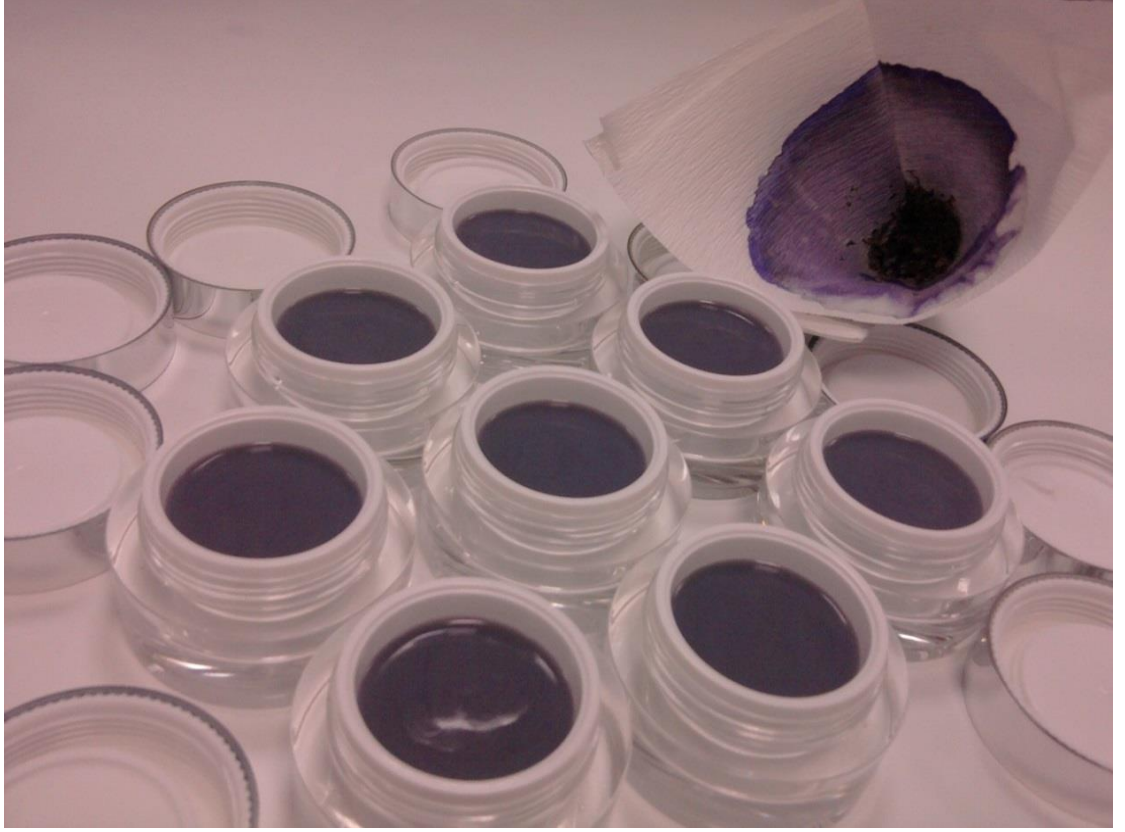
Doğal ortamından toplanan çiçekler laboratuvara getirildi. Saplarından ayrılan çiçeklerin neminin uzaklaşması için süzgeç kağıdının üzerinde iki saat kadar bekletildi. Kokusunu kopartıldıktan sonra veren çiçeklerin hoş kokusu bu bekleme süresinde daha da olgunlaştı.



Nemi uzaklaştırılan çiçekler ekstraksiyon işlemi için hazır hale getirildi. Hazırlık aşamasında çiçekler havanda iyice ezildi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çiçeklerin özütünün sıvı faza geçmesi için ekstraksiyon işlemi yapıldı.



Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen özüt ile gerekli kimyasallar karıştırılarak menekşe özlü cilt bakım kremi yapıldı.



Yapılan kremler krem kaplarına boşaltıldı ve kapların ağız kapakları ile kapatıldı.



Son işlem olarak menekşe özlü cilt bakım ürününe özel etiket tasarlandı ve krem kapları etiketlendi. Tasarlanan bu ürün 3. AR-GE Proje Pazarına proje olarak sunuldu. Proje tanıtımında numune olarak götürülen menekşe özlü nemlendirici bakım kremleri katılımcılar tarafından ilgi gördü. Kullanan katılımcılar gün içerisinde ürünün etkili olduğunu ve ciltlerindeki değişikliği kısa sürede gördüklerini iletiler.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Ayşe Demiray
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : 26/04/1987
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 0 554 676 59 55
E-posta : aysedemiray165@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Anafartalar Lisesi	2005
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2013

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2008	Denizli	Stajyer
2010	Denizli	Ücretli Öğretmenlik
2011	Denizli	Ücretli Öğretmenlik

Yabancı Dil(ler)

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

Bilimsel Faaliyetler

Bildiriler

1. Nazan DEMİR, İbrahim Kıvrak, Ayşe DEMİRAY, Fatih UÇKAYA, Mansur Harmandar, Yaşar DEMİR, “Kırmızı Anemon (*Anemone coronaria L.*) Çiçeğinin Kozmetik Amaçlı Kullanılabilirliğinin Araştırılması Amacıyla Bazı Enzim ve Biyolojik Aktivitelerinin Ölçülmesi”, XXVI. Ulusal Kimya Kongresi Muğla Üniversitesi, 1-6 Ekim 2012, Muğla, Poster
2. Nazan DEMİR, Fatih UÇKAYA, Ayşe DEMİRAY, Yaşar DEMİR, Ceyhun Işık, “Bataklık Süseni (*Iris pseudacorus*) Bitkisinin Çiçeğinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu”, XXVI. Ulusal Kimya Kongresi, Muğla Üniversitesi, 1-6 Ekim 2012, Muğla, Poster
3. Nazan DEMİR, Ayşe DEMİRAY, Yaşar DEMİR, Onur AKÇAY, Şeyda KIVRAK, “Kır Menekşesinde (*Viola Odorata*) Bazı Biyokimyasal Aktivitelerin Aranması ve Kozmetik Ürünlerde Kullanılabilirliğinin Araştırılması” XIII. Ulusal Spektroskopi Kongresi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, 15-18 Mayıs 2013, Burdur, Poster

Projeler

1. Kozmetik Amaçlı Kullanım İçin Kır Menekşesinde (*Viola odorata*) Bazı Biyokimyasal Aktivitelerin Aranması ve Tanımlanması, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Projesi – Araştırmacı – (2012 - 2013) – 12.000,00
2. Kır Menekşesinin Kozmetik Uygulamaları, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri – Araştırmacı – (2013 - 2013) – 5.000,00

Eğitimler ve Kurslar

1. Kozmetik Kimyası Uygulamalı Yaz Okulu I, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi ve Kimyagerler Derneği, 11-15 Temmuz 2012 (5 gün), Proje Koordinatörü: Prof. Dr. Nazan DEMİR.
2. Kozmetik İçeriklerinin Güvenlik Değerlendirmesi Çalıştayı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi ve Kimyagerler Derneği, 13 Temmuz 2012, Proje Koordinatörü: Prof. Dr. Nazan DEMİR.

Sertifikalar

1. ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi Eğitim Sertifikası, TSC Yönetim Sistemleri Eğitim Akademisi, Eğitimci: Serbay CEYLAN, 01.12.2012, Muğla, Türkiye.
2. ISO 14001:2004 Çevre Yönetim Sistemi Eğitim Sertifikası, TSC Yönetim Sistemleri Eğitim Akademisi, Eğitimci: Serbay CEYLAN, 02.12.2012, Muğla, Türkiye.
3. OHSAS 18001:2007 İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi Eğitim Sertifikası, TSC Yönetim Sistemleri Eğitim Akademisi, Eğitimci: Serbay CEYLAN, 01.12.2012, Muğla, Türkiye.
4. GMP (Good Manufacturing Practices) İyi Üretim Uygulamaları Sertifikası, Kimyagerler Derneği, Eğitimci: Yrd. Doç. Dr. Memduh Sami TANER, 16-17 Mayıs 2009, Muğla, Türkiye.
5. Bilgisayar İşletmenliği Sertifikası, Halk Eğitim Müdürlüğü, 2008, Denizli, Türkiye.

İlgi Alanları

1. Kozmetik kimyası ve doğal kozmetik ürünler,
2. Doğal ürünlerden enzim saflaştırmaları (Proteaz, Karbonik anhidraz, Peroksidaz),
3. SDS-PAGE Elektroforezi,
4. Jel filtrasyon kromatografisi,
5. İyon değişim kolon kromatografisi,

Hobiler

1. Resim çizmek
2. Fotoğraf çekmek