

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *Scorzonera* TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL
İÇERİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yavuz ERDEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Sevda KIRBAĞ

ELAZIĞ – 2011

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *Scorzonera* TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL İÇERİKLERİNİN
BELİRLENMESİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yavuz ERDEN

(091110101)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 13 Haziran 2011

Tezin Savunulduğu Tarih : 29 Haziran 2011

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sevda KIRBAĞ (F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ (F.Ü)

Doç. Dr. Mustafa KARATEPE (F.Ü)

HAZİRAN-2011

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak bana destek olan ve tez çalışmamı yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Sevda KIRBAĞ'a, arazi çalışmaları ve sistematik tanımlama sırasında yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Şemsettin CİVELEK'e, çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Ökkeş YILMAZ ile diğer Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine, tez çalışmalarım sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Büşra AKSOY ve Burak BİRCAN'a, yüksek lisans çalışmamın 2061 no'lu proje ile mali desteğini sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne (FÜBAP) ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Yavuz ERDEN
ELAZIĞ – 2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar LİSTESİ	X
KISALTMALAR	XI
1. GİRİŞ	1
1.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller	4
1.2. Serbest Radikal Oluşumu	5
1.2.1. Süperoksit Radikali.....	5
1.2.2. Hidrojen Peroksit	6
1.2.3. Hidroksil Radikali.....	6
1.3. Antioksidan Defans Sistemi	8
1.4. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri	9
1.4.1. Proteinler.....	9
1.4.2. Nükleik Asitler ve DNA	10
1.4.3. Membran Lipidleri.....	10
1.4.4. Sitozolik Moleküller	11
1.5. Polifenoller ve İnsan Diyeti	12
1.6. Polifenoller ve İnsan Sağlığı.....	13
2. MATERYAL ve METOD	15
2.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler	15
2.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar	15
2.3. Bitki Materyali.....	15
2.4. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	16
2.5. Resveratrol ve Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi	16
2.6. Şeker Analizi	16
2.7. Fitosterollerin ve ADEK Vitaminlerinin Ekstraksiyonu ve Analizi.....	17

2.8.	Serbest Radikal (DPPH) Giderme Aktivitesi	17
2.9.	<i>In vitro</i> Ortamda Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi.....	17
2.9.1.	<i>In vitro</i> Ortamda Lipid Peroksidasyon (LPO) Ölçümü	18
2.9.2.	<i>In vitro</i> Ortamda Yağ Asidi Miktarının Belirlenmesi.....	19
2.10.	Anaerobik Kültür Ortamında Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi.....	20
2.10.1.	Maya Hücresinde Glutasyon Miktarının Ölçülmesi	20
2.10.2.	Glutasyon Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması	21
2.10.3.	Maya Hücresinde Total Protein Miktarının Ölçülmesi	22
2.10.4.	Protein Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması.....	23
2.10.5.	Maya Kültürü Lipid peroksidasyon Miktarının Ölçülmesi	23
2.11.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	24
2.12.	Maya Kültürü Lipidlerin Ekstraksiyonu	26
2.12.1.	Maya Kültürü Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması.....	27
2.12.2.	Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz kromatografik Analizi.....	27
2.13.	Antimikrobiyal Aktivite.....	28
2.13.1.	Ekstraktların Hazırlanması	28
2.13.2.	Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması ve Aşılama	28
2.13.3.	Oyuk Agar Metodu	28
2.14.	İstatistiksel Analiz	28
3.	BULGULAR.....	30
3.1.	Bitki Örneklerinin Flavonoid ve Resveratrol İçerikleri.....	30
3.2.	Bitki Örneklerinin Fitosterol ve Vitamin İçerikleri	31
3.3.	Bitki Örneklerinin Şeker İçerikleri	32
3.4.	Bitki Ekstraktlarının DPPH Radikali Temizleme Etkisi	33
3.5.	Bitki Ekstraktlarının <i>In vitro</i> Ortamda Antioksidan Etkileri	34
3.6.	Bitki Ekstraktlarının <i>In vitro</i> Ortamda Yağ Asidi Metil Esterleri Üzerine Etkileri.....	35
3.7.	Bitki Ekstraktlarının <i>Debaryomyces hansenii</i> Üzerine Antioksidan Etkisi	36

3.8.	Bitki Ekstraktlarının <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin Yağ Asidi İçeriği Üzerine Etkisi	37
3.9.	Bitki Ekstraktlarının <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin Glutasyon Miktarı Üzerine Etkisi	38
3.10.	Bitki Ekstraktlarının <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi	39
3.11.	Bitki Ekstraktlarının <i>Kluveromyces lactis</i> Üzerine Antioksidan Etkisi	41
3.12.	Bitki Ekstraktlarının <i>Kluveromyces lactis</i> 'nin Yağ Asidi Profili Üzerine Etkisi	42
3.13.	Bitki Ekstraktlarının <i>Kluveromyces lactis</i> 'in Glutasyon Miktarı Üzerine Etkisi	43
3.14.	Bitki Ekstraktlarının <i>Kluveromyces lactis</i> 'in Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi	44
3.15.	Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi	46
4.	TARTIŞMA	48
5.	KAYNAKÇA	58
	ÖZGEÇMİŞ	74

ÖZET

Bu çalışmada, Elazığ ilinde toplanan *Scorzonera suberosa* C. KOCH, *Scorzonera latifolia* Fisch. & Mey. ve *Scorzonera laciniata* L. ekstraktlarının *in vitro* antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, *Debaryomyces hansenii* ile *Kluyveromyces lactis* bulunan kültür ortamında ise sadece antioksidan etkileri araştırıldı. Çalışmada DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi, flavonoid, resveratrol ve şeker içerikleri, lipid peroksidasyon, yağ asidi düzeyi, vitamin değerleri, protein ve glutatyon miktarları ölçüldü. *In vitro* lipid peroksidasyon sonuçlarına göre; ekstrakt gruplarının lipid peroksidasyon seviyesini azalttığı ve oleik ve linoleik asit miktarlarını koruduğu belirlendi. Bitki ekstraktı eklenen gruplarda lipid peroksidasyon miktarının *Debaryomyces hansenii*'de azaldığı, buna karşın *Kluyveromyces lactis*'te ise arttığı saptandı. Bitki örneklerinin toprak üstü kısımları doza bağımlı olarak artan DPPH radikal temizleme etkisi gösterdi. Bitki ekstraktları *Escherichia coli* ve *Bacillus megaterium* üzerinde en yüksek antimikrobiyal etki gösterdi. Çalışma sonucunda *Scorzonera* türlerinin fitokimyasal bileşiklerine bağlı olarak antioksidan özellik gösterdiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Scorzonera*, Lipid Peroksidasyonu, Maya, Antioksidan, Protein

SUMMARY

The Research Of Antioxidant Activities And Determination Of Phytochemical Contains Of The Some *Scorzonera* Species

In this study, the effects of *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of extracts *Scorzonera suberosa* C. KOCH, *Scorzonera latifolia* Fisch. & Mey. and *Scorzonera laciniata* L. which were collected in Elazığ and only antioxidant effects of *Debaryomyces hansenii* and *Kluyveromyces lactis* in cultural medium are researched. In the study, the free radical scavenging activity, flavonoid, resveratrol and sugar contents, lipid peroxidation, levels of fatty acid, vitamin values, protein and glutathione amounts were measured. According to the results of *in vitro* lipid peroxidation; the determined that extract groups to reduce the level of lipid peroxidation and the amount of oleic and linoleic acid were protected. The amount of lipid peroxidation in *Debaryomyces hansenii* of plant extract added to the groups decreased, whereas the lipid peroxidation of *Kluyveromyces lactis* were increased. Aerial parts of plant samples in a dose dependent effect of increasing showed DPPH radical scavenging. Plant extract showed the highest antimicrobial effect on *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*. Depending on the species of *Scorzonera* phytochemical compounds as a result of the study concluded that the antioxidant properties shown.

Key Words: *Scorzonera*, Lipid Peroxidation, Yeast, Antioxidant, Protein

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Başlıca reaktif oksijen türleri, bunların potansiyel kökenleri ve detoksifikasyon yolları [34].....	4
Şekil 2. Reaktif oksijen türleri ve aktif oksijen hasarına karşı savunma mekanizmalarının oluşturulması [66].....	9
Şekil 3. Linoleik asitin hidroksil radikali ile reaksiyonu ve sekonder ürünlerden aldehit gruplarının oluşması.	11
Şekil 4. Çeşitli antioksidan kaynakları ile ilgili son 30 yıldaki yayınların artışı [83].	13
Şekil 5. DPPH serbest radikalinin kimyasal yapısı.	17
Şekil 6. MDA kalibrasyon eğrisi.	19
Şekil 7. Glutatyon kalibrasyon eğrisi.	22
Şekil 8. Protein kalibrasyon eğrisi.....	23
Şekil 9. Standart flavonoid kromatogramı $\lambda= 254$ nm.	31
Şekil 10. Vitamin ve fitosterol standart kromatogramı $\lambda= 202$ nm, $\lambda= 328$ nm.	32
Şekil 11. Bitki örneklerinin örnek şeker analizi kromatogramı.	33
Şekil 12. Bitki gruplarının DPPH serbest radikal temizleme etkisi.	34
Şekil 13. Bitki ekstraktlarının <i>in vitro</i> lipid peroksidasyonu üzerine antioksidan etkisi (nmol/ml).....	35
Şekil 14. Bitki ekstraktlarının <i>in vitro</i> ortamda metil esterleri üzerine etkisi ($\mu\text{mol/ml}$).	36
Şekil 15. <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin lipid peroksidasyon düzeyi (nmol/ml).....	37
Şekil 16. Bitki ekstraktlarının <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin glutatyon miktarı üzerine etkisi (mg/g).	39
Şekil 17. Bitki ekstraktlarının <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin total protein miktarı üzerine etkisi (mg/g).	40
Şekil 18. <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin SDS-PAGE görüntüsü (a).	40
Şekil 19. <i>Debaryomyces hansenii</i> 'nin SDS-PAGE görüntüsü (b).	41
Şekil 20. <i>Kluveromyces lactis</i> 'nin lipid peroksidasyon düzeyi (nmol/ml).....	42
Şekil 21. Bitki ekstraktlarının <i>Kluveromyces lactis</i> 'in glutatyon miktarı üzerine etkisi (mg/g).	44

Şekil 22. Bitki ekstraktlarının <i>Kluveromyces lactis</i> 'in total protein miktarı üzerine etkisi (mg/g).....	45
Şekil 23. <i>Kluveromyces lactis</i> 'in SDS-PAGE görüntüsü (a).....	45
Şekil 24. <i>Kluveromyces lactis</i> 'in SDS-PAGE görüntüsü (b).....	46
Şekil 25. Δ^9 yağ asidi desaturaz enziminin redoks bileşenleri.....	55

TABLULAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. SDS-PAGE Ayırma jelinin hazırlanması.	26
Tablo 2. SDS-PAGE Yükleme jelinin hazırlanması.	26
Tablo 3. SDS-PAGE Örnek solüsyonu hazırlanması.	26
Tablo 4. <i>Scorzonera</i> bitki ekstraktlarının flavonoid ve resveratrol içeriği ($\mu\text{g}/1 \text{ g}$).	30
Tablo 5. <i>Scorzonera</i> bitki ekstraktlarının vitamin ve fitosterol içeriği ($\mu\text{g}/1 \text{ g}$).	32
Tablo 6. Bitki gruplarının şeker içerikleri ($\mu\text{g}/\text{g}$).	33
Tablo 7. Bitki gruplarının <i>Debaryomyces hansenii</i> hücresinin yağ asidi profili üzerine etkisi (mg/g).	38
Tablo 8. Bitki gruplarının <i>Kluveromyces lactis</i> hücresinin yağ asidi profili üzerine etkisi (mg/g).	43
Tablo 9. Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi (mm zon).	47

KISALTMALAR

µmol	: Mikromol
APS	: Amonyum persülfat çözeltisi
BHT	: Butilhidroksitoluen
CAT	: Katalaz
DMSO	: Dimetil sülfoksid
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'ditiyobis 2-nitrobenzoik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FR	: FeCl ₂ +H ₂ O ₂
g	: Gram
GSH	: Glutasyon
LA	: Linoleik asit
LAC	: <i>Scorzonera laciniata</i>
LAT	: <i>Scorzonera latifolia</i>
LNA	: Linolenik asit
LPO	: Lipid Peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
MEB	: Malt ekstrakt buyyon
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MPA	: Metafosforik asit
nmol	: Nanomol
pH	: Hidrojenin Gücü (Power of Hydrogen)
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi
SOD	: Süperoksit dismütaz
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SSK	: <i>Scorzonera suberosa</i> kök

SSY	: <i>Scorzonera suberosa</i> yaprak
TBA	: 2- thiobarbiturik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TEA	: Tris-EDTA-Asetikasit tamponu
TEMED	: N, N, N', N-tetrametil-ethylendiamin
TEP	: 1,1,3,3-Tetraethoxypropane

1. GİRİŞ

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif strese bağlı hastalık risklerini en az düzeye indirir. Hücrenel veya moleküler seviyede reaktif oksijen türlerini inaktive eder veya konsantrasyonunu düşürür. Lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu durdurur ya da oksidatif süreci geciktirir [1,2]. Bitki, meyve ve baharat türleri içerisinde bulunan fitokimyasal bileşikler, oksidatif bozulmaya karşı antioksidan özellik gösterdiği gibi insan sağlığına olumlu etkileri nedeniyle de büyük ilgi çekmektedir [3].

Epidemiyolojik ve hayvan çalışmaları; meyve, sebze ve tahılların düzenli tüketimi sonucu oksidatif hasarın neden olduğu hastalık risklerinin azaldığını gösterir [4,5]. Karotenoidler, tokoferoller, askorbatlar, lipoik asit ve polifenoller güçlü serbest radikal süpürücü etki gösteren doğal antioksidanlardır. Biyolojik sistemlerde serbest radikallere ve etkilerine karşı; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi endojen antioksidan enzimlerin yanında, A, C ve E vitaminleri ile fitokimyasal bileşikler gibi ekzojen antioksidanlar da yer alır [6].

Flavonoidler, bitkilerin sekonder metabolitleri arasında yer alır ve geniş bir grubu kapsar. Bunlar; antiinflamatuvar, antiülser, antitümör ve antikanser etmenlere neden olan metal şelatörleri ve serbest radikalleri etkisiz hale getiren bileşiklerdir. Flavonoidler, serbest radikallerin sebep olduğu zincir reaksiyonları yavaşlatır ve hatta durdurur. Ayrıca C vitamini emilimini de artırır [7,8].

E vitamini, yaklaşık 50 yıldır kimya ve biyoloji bilim dallarının çalışma konuları arasında yer almaktadır [9] ve bu çalışmalar E vitaminin reaktif moleküllerin yıkıcı etkilerini ortadan kaldırdığını kesin olarak ortaya koymaktadır [10]. Yapılan bir çalışmada, yüksek yağlı aterojenik diyetle beslenen tavşanlarda yapılan analizler sonucu, plazma TBARS değerlerinin ve aort plak oluşumunun, E vitamini verilmeyen gruba kıyasla E vitamini verilen gruplarda düşük düzeyde bulunduğu belirlenmiştir [11].

D vitamininin; başta osteoporoz, diş ve diş eti hastalıkları olmak üzere [12-16], kanser, diyabet, tüberküloz ve oksidatif stres üzerine etkileri araştırılmıştır [17-22]. Ayrıca D vitamini beyin gelişimini de etkiler [23-26]. D vitamininin beyin içerisindeki reseptör gelişimini teşvik ettiği belirlenmiştir. Bu sonuç D vitamininin proteinler üzerine etkisini göstermektedir [27].

Sıkça tükettiğimiz sebze ve meyvelerde bulunan fitokimyasallar, vitaminler ve mineraller reaktif oksidan türlerinin yakalanmasının yanı sıra detoksifiye edici enzimlerin aktivasyonu, immün sistemin uyarılması, hücre çoğalması ve apoptozuna ilişkin gen ekspresyonunu, hormon metabolizması ve antibakteriyal ve antiviral etkileri düzenleyerek de etkili olur [28,29].

Scorzonera cinsi (Asteraceae) esas olarak Asya ve Avrupa'nın kurak bölgelerinde yayılış gösterir. Bazı *Scorzonera* türleri baharat olarak kullanıldığı gibi Asya ve Avrupa'da sebze olarak da tüketilmektedir [30]. Özellikle *Scorzonera austriaca* Willd. Tibet'in geleneksel halk tedavi yöntemlerinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu bitki; halk arasında ateş, kan çıbanı, yangı ve meme iltihabı gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [31].

Asteraceae familyası üyelerinin karakteristik bileşiği olarak seskiterpen lakton bilinmektedir. Bu bileşiğin antimikrobiyal, antitümöral, sitotoksik ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu ve ayrıca merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler hastalıklar üzerine de etkileri bilinmektedir [32,33].

Scorzonera tomentosa'nın toprak üstü kısımlarından triterpen yapısında lupeol, lupeol asetat ve α -amirin izole edilmiştir [34]. Ayrıca *S. columnae* L. bitkisinden de lupeol elde edilmiştir [35].

Scorzonera hispanica doku kültüründen bir seskiterpen glikozit izole edilip yapısı 6, 9 – dihidroksi – 4, 10, 14, 15 – tetradihidrogayan - 6, 12 - olit 9 – 10 – β – D-lukopiranozit (skorzonerozit) olarak açıklanmıştır [36].

S. hispanica'dan skorzonerozit, bisabolan türevi puligluton, skorzonerozitin 11,13 dehidro türevi olan ikserizozit D ve 3-O-anjeloil-11 β , 13-dihidrodessasil siyanaropikrin-8- β -D-glukozit izole edilmiştir [37].

Havada kurutulan ve toprak üstü parçaları ekstrakte edilen *Scorzonera veratrifolia*'dan scorzoveratrin ve scorzoveratrozit adı verilen iki yeni 3-benzil ftalat izole edilmiştir [38].

S. latifolia'nın kök kısmı metanolde ekstrakte edilip, analjezik aktivitelerini deney hayvanları üzerinde test edilmiştir. Bu amaçla hayvanlara asetik asitle indüklenen kıvrınma ve kuyruk kaldırma testleri uygulanmış, çalışma sonucunda *S. latifolia*'nın iyi bir analjezik olduğu tespit edilmiştir [39].

Scorzonera undulata'nın uçucu yağ bileşenleri analiz edilerek, antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin gelişmelerini farklı oranlarda engellediği belirlenmiştir [40].

Türkiye için endemik olan *Scorzonera sandrasica*'ın kimyasal kompozisyonunu ve multirezistan *Stenotrophomonas maltophilia* üzerine antimikrobiyal etkisi farklı çözümler kullanılarak araştırılmıştır. Etanol ve kloroform ekstraktlarının yüksek düzeyde etkili olduğunu bulunmuştur [41].

Scorzonera radiata'nın toprak üstü kısımlarını ekstrakte ederek kromatografik analizler sonucu beş yeni dihidrostilben bileşiği izole edilmiştir. Bu bileşiklerin antioksidan kapasitesi DPPH serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir [42].

Scorzonera divaricata ve *Scorzonera pseudodivaricata*'ın toprak üstü kısımlarının kromatografik metotlar ile incelenmesinde iki yeni kuinik asit türevi olan feruloylpodospermic asit A ve B'yi elde edilmiştir. Bu bileşiklerin antioksidan kapasitesi DPPH analizi ile belirlenmiş ve sonuç olarak yüksek antioksidan özellik gösterdikleri saptanmıştır [43].

Scorzonera mollis aseton, etil asetat, kloroform, etanol, metanol, dimetilsülfoksit ve TWEEN+su karışımı ile ekstrakte edilip antimikrobiyal aktivitesi çalışılmıştır. Ekstraktların kullanılan bakterilere karşı belirgin antimikrobiyal aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [44].

Yapılan bir çalışmada 46 farklı familyaya ait 127 bitki toplanmış ve bu bitkilerin; serbest radikal temizleme aktivitesi (DPPH), hipoklorik asit ile indüklenen oksihemoglobin ölçümü (OxyHb), fare beyin dokusu üzerinde lipid peroksidasyon analizi (MDA) ve hidrojen peroksit ile indüklenen DNA hasarı (COMET) analizleri ile antioksidan düzeyleri belirlenmiştir. *Scorzonera cretica* DPPH ve OxyHb analizlerinde orta düzey, MDA analizinde yüksek düzey etki gösterirken COMET analizinde ise etki belirlenmediği rapor edilmiştir [45].

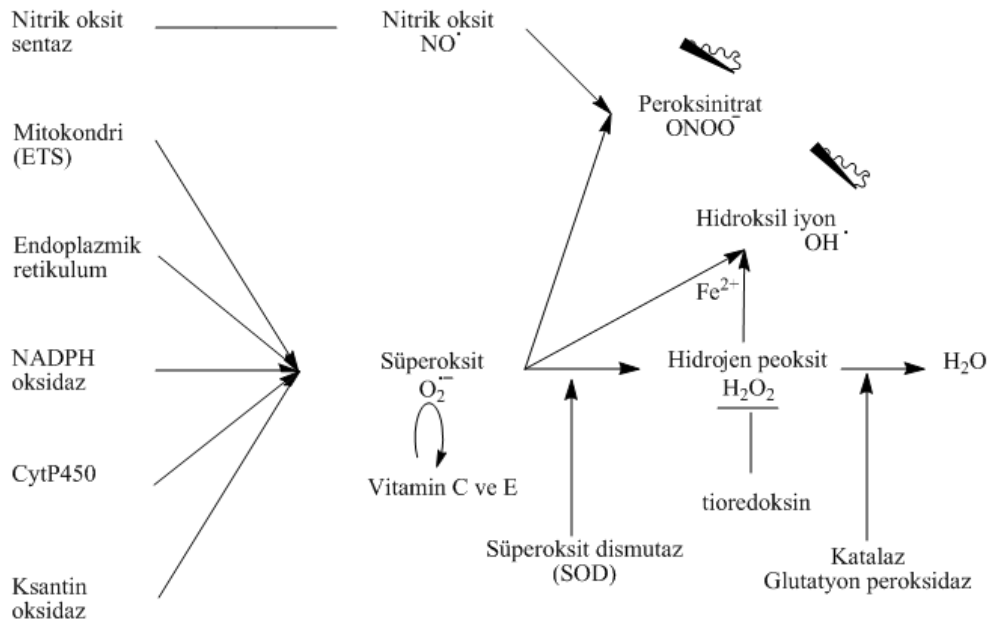
Çalışmamızda, *Scorzonera* cinsine ait *S. latifolia*, *S. suberosa*, *S. laciniata*'nın fitokimyasal içeriği ile vitamin değerleri analiz edildi. Bu türlerin antiradikal, prooksidan ve antioksidan kapasiteleri yapılan *in vitro* deneyler ile gösterildi. Ayrıca bu türlerin patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkileri belirlendi. Bulunan sonuçlar doğrultusunda bu türlerin besin değerlerinin ortaya konulması amaçlandı. Çünkü son yıllardaki bilimsel çalışmalar, diyet yolu ile alınan bitkisel kaynaklı antioksidanların serbest radikallerin neden olduğu hastalık etmenlerini ortadan kaldırdığını göstermektedir.

Bu doğrultuda, bitkilerin sekonder metabolit bileşenlerinin belirlenmesiyle bitkilerin tıbbi özelliklerinin ortaya çıkartılması insan sağlığı açısından önemlidir.

1.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller

Terim olarak ‘Reaktif Oksijen Türleri’ (ROS), serbest radikaller ve radikal olmayan O_2 türevleri olarak bilinmektedir [46,47]. ROS organizmada; hipertansiyon, ateroskleroz, diyabet, kalp hipertrofisi, kalp yetersizliği, iskemi-reperfüzyon hasarı ve inme gibi oldukça önemli hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynamaktadır [47].

Serbest radikaller, dış orbitalinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya molekül olarak tanımlanır ve oldukça reaktif moleküllerdir. Yarı ömürleri çok kısadır. Serbest radikaller normal metabolik olaylar sırasında oluşabilecekleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler (Şekil 1). Serbest radikallerin en önemlileri oksijen ve azot kaynaklı olanlarıdır [46,48-50].



Şekil 1. Başlıca reaktif oksijen türleri, bunların potansiyel kökenleri ve detoksifikasyon yolları [46].

Biyolojik sistemlerde serbest radikallerin en fazla meydana geldiği yer mitokondrilerdir [46,51].

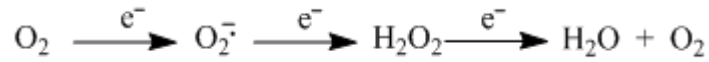
Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabildikleri gibi, organik veya inorganik molekül şeklinde de olabilirler. İki serbest radikalin birbiri ile reaksiyona girmesi sonucu radikal olmayan bir bileşik ortaya çıkar ve

her iki serbest radikal ortadan kalkar. Bir serbest radikal, radikal olmayan bir yapıyla reaksiyona girince başka bir serbest radikal oluşturur. Bu özellik serbest radikallerin zincir reaksiyonları oluşturabilmelerini sağlar [49].

1.2. Serbest Radikal Oluşumu

Canlı sistemde oluşan radikallerin en önemli türleri oksijen kaynaklı radikallerdir [52]. Moleküler oksijenin (O_2) son yörüngesinde iki çiftleşmemiş elektronu bulunur ve kendisinde bir radikaldir. Her iki atom denge halinde olduğundan bu oksijen molekülünün reaktif bir özelliği yoktur. Bu özelliğinden dolayı oksijen, diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Mitokondriyal elektron transport zinciri tarafından gerçekleştirilen bu süreçte, %1-2 oranında moleküler oksijen kaçağı meydana gelir. Bu oksijenin redüksiyonu ile süperoksit radikali ($\bullet O_2^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^\bullet) gibi reaktif ürünler açığa çıkar. Bu radikal türleri oksijenin toksik etkisinin gerçek nedenini oluşturur [50,53].

Moleküler oksijenin elektron kaybetmesiyle oluşan diğer bileşik ve radikal yapıları aşağıda belirtildiği gibidir.

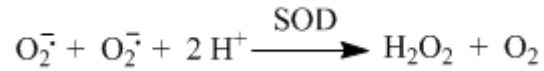


1.2.1. Süperoksit Radikali

Fizyolojik şartlarda aerobik hücrelerde oluşan en önemli serbest radikal süperoksit radikali [51,54]. Solunum zincir reaksiyonlarında enzimlerin elektron transferi süresince moleküler oksijene bir elektronun kaçması süperoksit radikalini oluşturur ve bu radikalın büyük kısmı mitokondri kaynaklıdır [55]. Bu oluşum diyabet gibi yükseltilmiş glikoz ve hiperoksinin bulunduğu şartlar altında yükselir. Normal şartlarda, kullanılan oksijenin %2'si mitokondride suya kadar indirgenemez ve süperoksit radikali oluşur. Ayrıca süperoksit radikali, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) oksidaz, sitokrom P450 ve ksantin oksidaz gibi enzimler aracılığıyla da oluşur [46,56].

Süperoksit radikali, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınışına neden olabilir. Örneğin; süperoksit anyon radikali ferritinden demiri serbest bırakır, Fe⁺³'ü Fe⁺²'ye indirger ve Fenton reaksiyonunu hızlandırır [57,58].

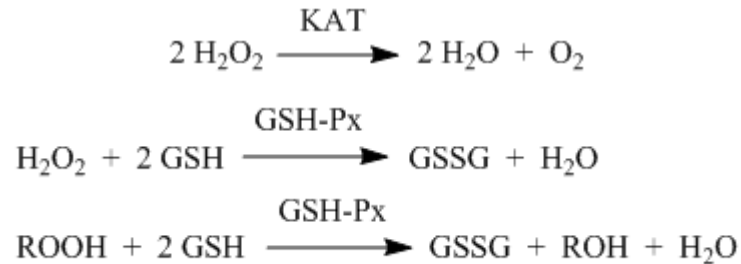
Biyolojik sistemlerde süperoksit radikali kısa süreli bulunur. Bu radikal süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen perokside dönüştürülür (Şekil 2). Süperoksit dismutazın memelilerde 3 izoformu vardır; Cu-Zn SOD (SOD1), mitokondrial SOD (Mn SOD, SOD2) ve ekstraselüler SOD (ecSOD, SOD3) [47]. Süperoksit radikaline göre hidrojen peroksit daha kararlı yapıdadır ve biyolojik sistemde detoksifikasyonu daha azdır [46,47].



1.2.2. Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi meydana getirir. Hidrojen peroksit biyolojik membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır [47,49].

Hidrojen peroksit, bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Hidrojen peroksit geçiş metalleri (ör: Fe ve Cu), ozon ve UV-ışınları ile aktive olabilir ve sonuç olarak daha zararlı olan hidroksil radikaline dönüşebilir [59,60]. Hidrojen peroksit katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) tarafında su ve moleküler oksijene dönüştürülür [46,60].

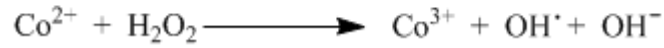
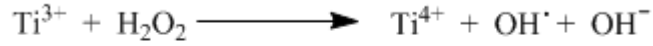
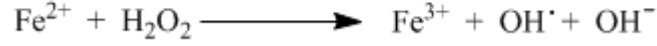
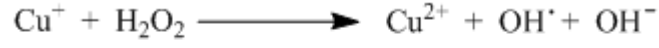


1.2.3. Hidroksil Radikali

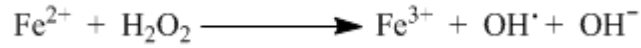
Reaktif oksijen türleri içerisinde en reaktif ve en toksik etkili olanı hidroksil radikaldır. Hidroksil radikalının *in vivo* yarılanma ömrü 10⁻⁹ s'dir. Bu radikal yakın

çevresindeki herhangi bir biyomolekül ile tepkimeye girerek önemli hasarlar ortaya çıkartır [61,62].

Hidroksil radikali çeşitli tepkimeler sonucu meydana gelebilir. Bunlardan en önemli tepkime grubu, hidrojen peroksidin geçiş metal iyonlarının indirgenmiş formları ile tepkimesi sonucu oluşur [58].



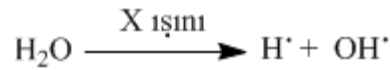
Hidrojen peroksit ile Fe^{+2} iyonunun tepkimesi sonrasında hidroksil radikalinin oluşturduğunu ilk defa 1894 yılında Fenton gözlemlemiştir ve bu tepkime Fenton Reaksiyonu olarak bilinmektedir [58].



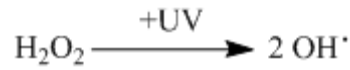
Hidroksil radikali, hidrojen peroksidin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucu meydana gelir ve bu tepkimeye Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir [58].



Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur [58].



Ayrıca hidrojen peroksidin UV ışığına maruz kalması nedeniyle, hidrojen peroksitteki O-O bağının homolitik ayrılması sonucu Hidroksil radikali oluşur [58].



Hidroksil radikalinin meydana gelebilmesi için süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gereklidir. Bu radikaller süperoksit dismutaz, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz sistemiyle uzaklaştırılır. Bu antioksidan moleküllerin aktivitesi sonucu fizyolojik şartlarda fazla miktarlarda hidroksil radikali oluşamaz [63-65]. Hidroksil radikali, nükleer ve mitokondriyal DNA, membran lipitleri ve karbonhidratları gibi, hücrenin makro molekülleri üzerine yıkıcı etki yapmamaktadır [49].

1.3. Antioksidan Defans Sistemi

Aerobik solunum ve çevresel faktörlerin etkileri sonucu meydana gelen reaktif oksijen türleri hücre içi sentezlenen veya dışarıdan alınan enzimatik veya non-enzimatik moleküllerce etkisiz hale getirilir (Şekil 2) [66].

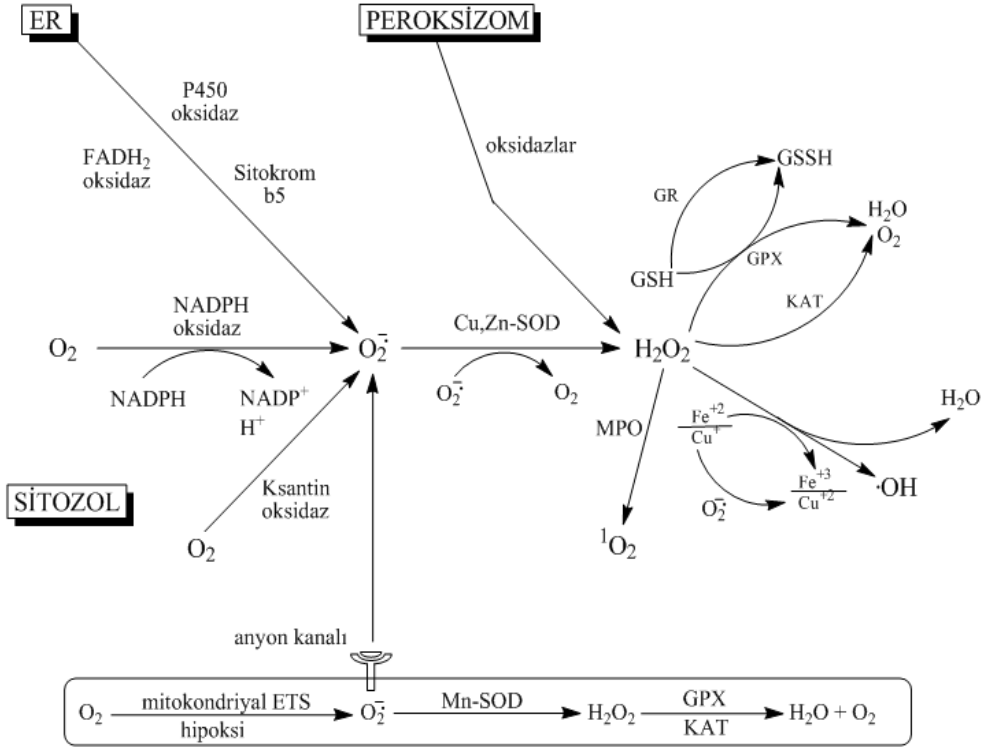
Küçük miktarlarda olsa dahi hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri sürekli olarak aerobik organizmalarda iç ve dış uyarılara tepki olarak meydana gelir [66].

Düşük düzeyde reaktif oksijen türleri; hücre içi haberleşme başta olmak üzere, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, apoptozis, immün yanıt ve mikroorganizmalara direnç gibi birçok biyokimyasal süreci etkilemektedir [67,68]. Bunun aksine yüksek düzeydeki reaktif oksijen türleri oksidatif strese neden olur ve organizmadaki makro moleküller üzerinde ciddi hasarlar meydana getirir [69,70].

Doğal antioksidanlar, düşük dansiteli lipoproteinler (LDLs) ve plazma hücrelerini oksidasyona karşı korur. Aerobik organizmalarda lipid peroksidasyonunun önlenmesi önemli bir süreçtir. Lipid peroksidasyon ürünleri DNA hasarına yol açabileceği gibi, Na^+/K^+ ATPaz ve glutamat transport proteinlerini de inhibe edebilir [71]. Lipid peroksidasyon artışı ve antioksidan defans sisteminin yetersizliği sonucu, hücrede ki DNA, RNA ve proteinler gibi nükleofilik merkezlerde bulunan kovalent bağlar zarar görür [72]. Söz konusu böyle bir epoksit tepki sonrası; sitotoksosite, alerji, mutajenite veya kanserojen sonuçlar ortaya çıkar [66].

Lipid peroksidasyonu tiyobarbitürik asit (TBA) reaktif maddeler yöntemi tarafından değerlendirilir. Bu yöntem lipid oksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) miktarını belirlemede kullanılır [66,73].

Enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, askorbik asit (Vitamin C), α -Tokoferol (Vitamin E), glutatyon (GSH), β -karoten ve vitamin A olmak üzere birçok biyomolekül tarafından gerçekleştirilir [74-77]. Organizmanın sağlığı ve hücre içi faaliyetlerin sürekliliği açısından bu antioksidanlar arasında hücre içi bir denge söz konusudur [78-81].



Şekil 2. Reaktif oksijen türleri ve aktif oksijen hasarına karşı savunma mekanizmalarının oluşturulması [66].

1.4. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri

1.4.1. Proteinler

Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Glutatyon redüktaz ve gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz gibi reaktiviteleri için bu aminoasitlere bağımlı olan enzimler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenecek şekilde inhibe edilirler [82].

Proteinlerin serbest radikal hasarından ne derece etkileneceği aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Proteinin hücresel lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne göre protein hasarının boyutları değişebilir [82].

1.4.2. Nükleik Asitler ve DNA

Radyasyonla hücre içinde enerji depolanması sonucu iyonlar, serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksiste, büyük oranda, ya nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine ya da DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Normal metabolizma sırasında, hiperoksia ve çevresel faktörler örneğin fotokimyasal hava kirliliği etkisiyle açığa çıkmış olan serbest radikallerin yol açtığı hücre ölümüne ve mutasyonlara DNA'nın katıldığı da ileri sürülmektedir [82].

1.4.3. Membran Lipidleri

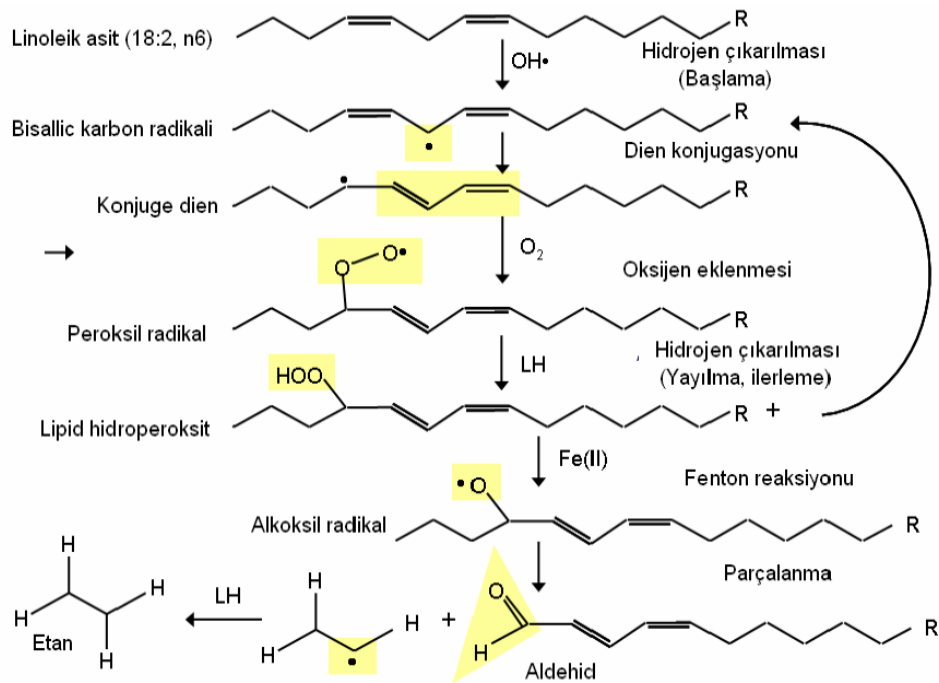
Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalın membran yapısında bulunan poliansature yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir H atomu uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit radikali ile hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Süperoksit radikali de hidroksil radikaline dönüşerek etkili olmaktadır. Benzer şekilde hidrojen peroksidin de hidroksil radikaline dönüştüğü bilinmektedir. Bu nedenle lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikalın hidroksil radikali olduğu görüşü benimsenmektedir [82].

Serbest radikal etkisiyle yağ asidi zincirinden bir H atomunun uzaklaştırılması sonucu, zincir radikal niteliğini kazanmaktadır. Böylece oluşan lipid radikali (L') dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılmasıyla dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir. Bu lipid peroksit radikalleri, zar yapısındaki diğer poliansature yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine (LOOH) dönüşmektedir. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek yürümektedir [82].

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehid ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri olan manolindialdehit miktarı tiobarbütirik asit reaksiyonlarıyla ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin

saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, oluşan ara bileşiklerinden dien konjugatlarıyla lipid hidroperoksitlerinin ve son ürünlerden etan ve pentan gibi gazların ölçümü de son yıllarda lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir [82].

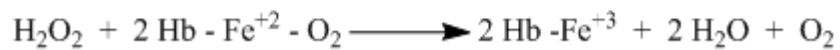
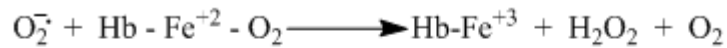
Lipid peroksidasyonunun, membranın lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile membran işlevinin bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre elemanlarının hasarına neden olduğu düşünülmektedir [82].



Şekil 3. Linoleik asitin hidroksil radikali ile reaksiyonu ve sekonder ürünlerden aldehit gruplarının oluşması.

1.4.4. Sitolik Moleküller

Sitozol proteinleri, sitoplazmik serbest radikallerden etkilenerek değişime uğrarlar. Hemoproteinler, örneğin oksihemoglobin, süperoksit radikallerinin ya da hidrojen peroksidin demirle reaksiyonu sonucu methemoglobine dönüşür [82].



Hemoproteinlerin geniş bir spektrumu oksijen türevi serbest radikaller tarafından tahrip edilebilir [82].

1.5. Polifenoller ve İnsan Diyeti

Polifenoller diyetle alınan en büyük antioksidan gruptur. Polifenoller 1g/gün miktarı ile fitokimyasallar içerisinde bilinen diğer gruplardan daha yüksek konsantrasyonda alınır. Bu miktar C vitamini alınımının ~10 katı, E vitamini ve karotenoid alımından 100 kat daha fazladır [83-85]. Meyve ve meyve suları, çay, kahve ve kırmızı şarap gibi bitkisel ürünler polifenol konsantrasyonu açısından zengindir. Ayrıca sebze, hububat, çikolata ve kuru baklagiller polifenol alınımında katkıda bulunan besin gruplarıdır [83,86]. Örneğin elma; flavanol monomerler veya oligomerler, klorojenik asit ve diğer hidroksisüsinamik asitler, çeşitli quercetin glikozitleri, 2 glikozit floretin ve antosiyaninler gibi oldukça geniş polifenol gruplarını içeren nadir gıdalara bir örnektir [87,88].

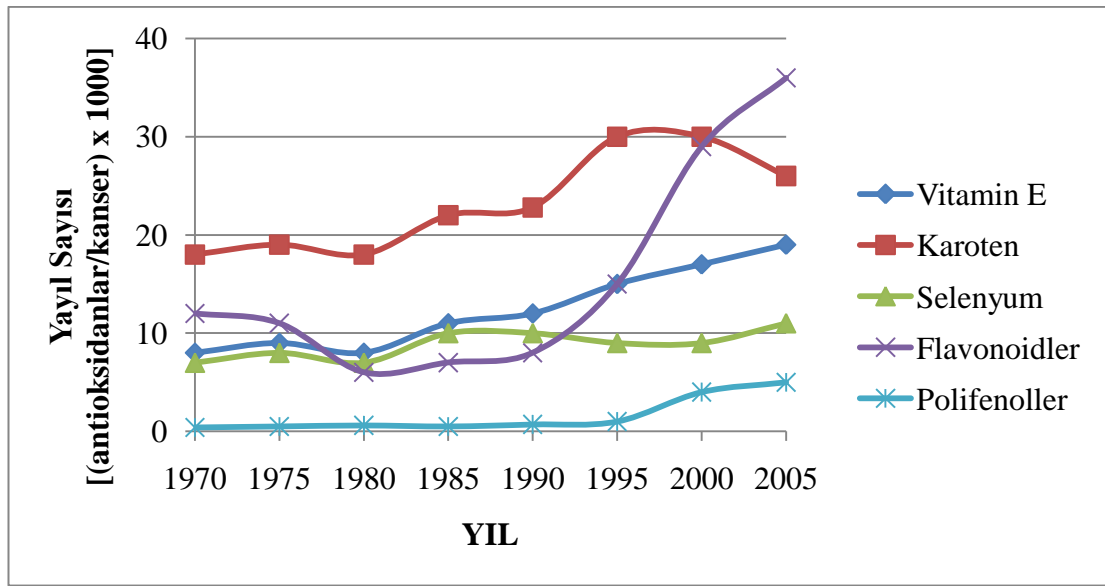
Diğer yandan birçok bitkinin polifenol konsantrasyonu çok az bilinmektedir. Ayrıca bitkilerin polifenol içeriğini; hasat, çevresel faktörler ve depolama şekli gibi pek çok faktör doğrudan veya dolaylı olarak etkiler [86].

İklim (güneş ışığı, yağış) gibi çevresel faktörler veya agromik (farklı kültür türü, ağaç başına meyve verimi v.b) faktörler polifenol içeriğinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Özellikle, ışığa maruz kalma flavonoidler üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ürünlerin olgunluk derecesi polifenollerin çeşitliliğini ve konsantrasyonunu etkiler. Genellikle olgunlaşma sürecinde antosiyaninlerin miktarında artış görülürken fenolik asit konsantrasyonunda azalma görülür [86,89].

Gıdaların polifenol içeriği yemek hazırlama yöntemlerinden de etkilenir. Bu maddeler meyve ve sebzelerin genelde dış kabuklarında konsantre olmuşlardır ve kabuk kısımlarının soyularak atılması diyet yoluyla alınan polifenol miktarını etkilemektedir. Pişirme polifenol konsantrasyonunu etkileyen diğer bir süreçtir. Örneğin soğan ve domatesin kuarsetin içeriğinde; 15 dakika kaynatıldıktan sonra %75, kızartıldıktan sonra %65 ve mikrodalga fırında pişirildikten sonra %30 azalma görülür. Patates yaklaşık 190 mg/kg oranında klorojenik asit içerebilir [90]. Fakat bu oran kızartma sürecinde diğer fenolik içerikler gibi eser miktarlara düşer [91].

1.6. Polifenoller ve İnsan Sağlığı

Bitkilerin geniş yayılış alanlarına karşın diyet polifenollerinin insan sağlığı üzerine etkileri yakın tarihe kadar bilinmiyordu. 1990'ların ortalarına kadar en çok çalışılan antioksidanlar vitaminler, karotenoidler ve minerallerdi. Flavonoidler ve polifenollerin antioksidan yapıları ve sağlık üzerine etkileri konulu araştırmalar 1995 yılından sonra başladı (Şekil 4). Bu gecikmenin başlıca nedeni polifenollerin karmaşık kimyasal yapıları ve önemli derecede çeşitlilik göstermesidir [83].



Şekil 4. Çeşitli antioksidan kaynakları ile ilgili son 30 yıldaki yayınların artışı [83].

Polifenoller içerisindeki fenolik gruplar, serbest radikallere bir elektron vererek nispeten istikrarlı fenoksil radikal gruplarını oluşturur. Böylece oksidasyon sürecini yavaşlatır ve hatta durdurur [91,92].

Epidemiyolojik çalışmalar; polifenollerce zengin gıda tüketiminin, kronik hastalık oluşma riskini düşürdüğünü gösterir. Polifenoller başta kardiyovasküler hastalıklar [93-95] olmak üzere kanser [96,97] ve osteoporozun önlenmesinde, nörodejeneratif hastalıklar [98-101] ile diyabetin engellenmesinde [102-105] önemli rol oynar.

Polifenoller açısından zengin gıdaların tüketilmesi, plazma antioksidan düzeyini önemli ölçüde arttırabilir. Antioksidan seviyesinin artışı lenfosit DNA'sı üzerine oluşan oksidatif hasarı azaltır. Antioksidan olarak polifenoller, oksidatif hasara karşı hücre

bileşenlerini korur ve oksidatif stres ile ilişki dejeneratif hastalıkların riskini sınırlamada rol oynar [92].

2. MATERYAL ve METOD

2.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler

Oleik asit (18:1, n 9), linoleik asit (18:2, n 6), linolenik asit (18:3, n 3), TWEEN 20, Tris-Base ve hidroklorik, kuarsetin, mirisetin, resveratrol, kateşin, naringin, naringenin, kamferol, metanol, asetonitril, n-hekzan, n-heptan, izopropanol, aseton, demir klorürü (FeCl_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , butilhidroksitoluen (BHT), n-Butanol, malt ekstrakt buyyon (MEB), potasyum klorür, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, (DPPH), dimetil sülfoksit (DMSO), 2-thiobarbiturik asit (TBA), etil alkol, sodyum klorür, potasyum bikarbonat, yağ asidi metil esteri (doymuş ve doymamış türleri), kolesterol, α -tokoferol, α -tokoferol asetat, vitamin standartları, fitosterol standartları, sülfürik asit, hidroklorik asit, fosfat tamponu, EDTA, glutatyon (GSH), sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), şeker analizi standartları, Tris-EDTA-Asetikasit tamponu (TEA), Tris-EDTA tamponu, trikloroasetik asit (TCA), 5,5'ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB), fosfohungustik asit (PHA), sodyum sitrat, bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sodyum potasyum tartarat, sodyum hidroksil, sodyum karbonat, folin, albumin, metafosforik asit (MPA).

2.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Döner buharlaştırıcı (rotavapor), homojenizatör, gaz kromatogafi, HPLC cihazı, etüv, UV spektrofotometre, vorteks, hassas terazi, otomatik pipetler, santrifüj, sonikasyon, derin dondurucu.

2.3. Bitki Materyali

Çalışmada kullanılan bitki örnekleri 2010 yaz aylarında Elazığ ilinden toplandı. Bitki türlerinden *Scorzonera latifolia* Baskil ilçesinde, *Scorzonera laciniata* Harput-Buzluk Mağarası mevkiinde, *Scorzonera suberosa* ise Fırat Üniversitesi Kampüs yerleşkesinde toplandı. Bitki örnekleri steril poşetler içine konularak analizleri yapılmaya kadar derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.4. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmada *Scorzonera latifolia* ve *Scorzonera laciniata*'nın yaprak kısımları ile *Scorzonera suberosa*'nın hem yaprak hem de yumru kök kısmı kullanıldı. Bitki örnekleri için 1/5 (g/ml) oranında metanol ekstraktı hazırlandı. Ekstraktlar, bitki gruplarının çözücü içerisinde parçalanmasıyla elde edildi. Blenderde parçalama işleminden sonra bütün gruplar santrifüj edildi (5000 rpm, +4 °C). Santrifüj sonunda elde edilen supernatantdan rotovapor kullanılarak çözücü ortamdan uzaklaştırıldı. Kalan bitki ekstraktı 50 ml DMSO ile çözülerek stok çözeltiler elde edildi. Kullanılmaya hazır hale getirilen ekstraktlar -20 °C de muhafaza edildi.

2.5. Resveratrol ve Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Flavonoidlerin kromatografik analizi için 5 µm iç çapında PREVAIL C18 (15x4.6 mm) ters-faz kolon kullanıldı. Mobil faz olarak %1 asetik asit içeren metanol/su/asetonitril (46/46/8, v/v/v) karışımı kullanıldı [106]. Bu mobil faz 0,45 µm membran filtresi içinden geçirilerek süzüldü ve daha sonra kullanılmadan önce ultrasonikasyon cihazında havası alındı. Kateşin ve naringin için 280 nm, rutin, mirisetin, morin ve kuarsetin için 254 nm, resveratrol için 306 nm ve kamferol için 265 nm dalga boyu kullanılarak RHPLC ayırımı takiben DAD tarafından bu flavonoidlerin ölçümü yapıldı. Akış hızı 1 ml/dk ve enjeksiyon değeri 10 µl olarak ayarlandı. Analizlerin kromatografik pikleri reaksiyon sürelerinin karşılaştırılması ve standart referanslarının UV spektrumları ile doğrulandı. Miktar ölçümü standart metot kullanımıyla pikin birleştirme yoluyla gerçekleştirildi. Tüm kromatografik işlemler 25 °C'de yapıldı.

2.6. Şeker Analizi

Toplanan bitki örnekleri 1:1 (g/ml) oranında blender içine alınarak distile su ile homojenize edildi. Daha sonra süzgeç kâğıdı ile süzülerek pellet ile sıvı kısım ayrıldı. Bu işleminden sonra, toplam filtratın hacmi belirlenerek RI dedektörünün bağlı olduğu HPLC cihazı ile analiz edildi. Analizde mobil faz olarak asetonitril+su (%75/%25; v/v) karışımı kullanıldı. Analiz için Shim-Pack HRC NH2 (150X4.6 mm, 5 µ.) kolon kullanıldı.

2.7. Fitosterollerin ve ADEK Vitaminlerinin Ekstraksiyonu ve Analizi

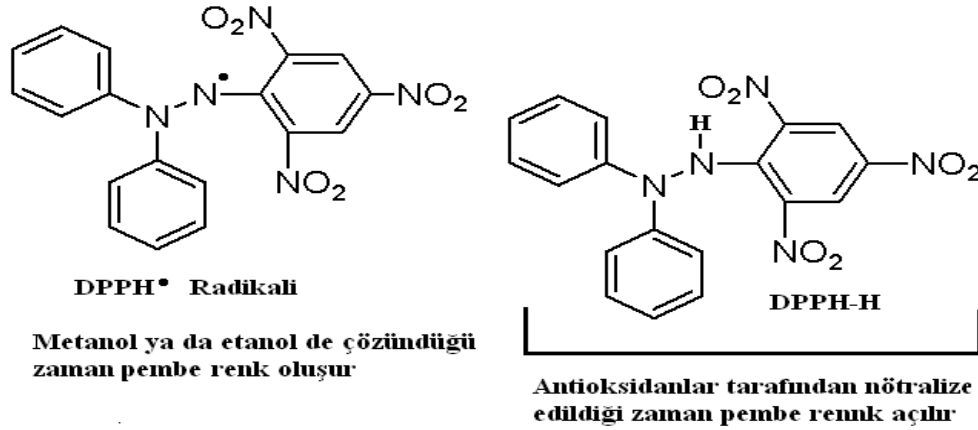
Bitkisel örnekler tartılıp 3/2 (v/v) oranında hekzan/izopropil alkol karışımı ile homojenize edildi ve %5'lik KOH ile 85 °C'de hidrolizden sonra, fitosterollerin ekstraksiyonu n-heptan ile yapıldı. Fitosterol içeriği UV dedektör kullanılarak HPLC cihazı ile analiz edildi.

2.8. Serbest Radikal (DPPH) Giderme Aktivitesi

DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi, Brand-Williams ve ark. [107] tarafından belirtilen metoda göre yapıldı. Serbest radikal olarak 25 mg/l DPPH metanolde hazırlandı. Deney tüplerine sırasıyla 10, 25, 50, 100 µg/µl bitki ekstraktları ve DPPH çözeltisinden 3,9 ml ilave edildi. Karışımlar, oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda absorbansları 517 nm'de blanka karşı spektrofotometrede okundu [108].

Azalan absorbans, geriye kalan DPPH miktarı serbest radikal giderme aktivitesi olarak belirlendi. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% = [(Kontrol_{ABS} - Örnek_{ABS}) / Kontrol_{ABS}] \times 100$$



Şekil 5. DPPH serbest radikalinin kimyasal yapısı.

2.9. In vitro Ortamda Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri Ronald'nın [109] belirttiği literatüre göre bazı modifikasyonlar yapılarak belirlendi. Bu amaçla; pH'sı 7.4 olan 0.05 M TRIS-HCl/0.15 M KCl ve %0.2 TWEEN 20 içeren tampon (TH) çözeltisi ile 1 mM FeCl₂ ve 3

μM H_2O_2 günlük olarak hazırlandı. Ayrıca yağ asidi olarak linoleik asit karışımından (%60-74 18:2; n-6 + %18-32 18:1; n-9) 8 ml alınarak 20 ml DMSO'da çözüldü ve aşağıdaki deney grupları hazırlandı.

Kontrol grubu: 5 ml TH, 0.3 ml yağ asidi karışımı,

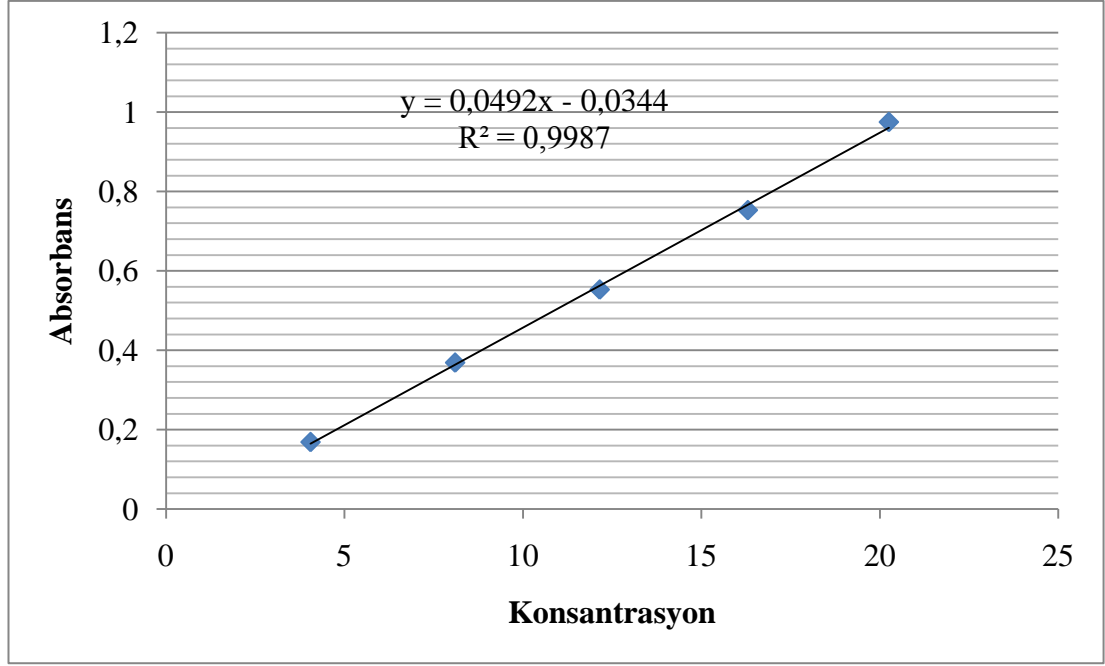
FR grubu: 5 ml TH, 1 ml FeCl_2 , 1 ml H_2O_2 , 0.3 ml yağ asidi karışımı,

Bitki grupları: 5 ml TH, 1 ml FeCl_2 , 1 ml H_2O_2 , 0.3 ml yağ asidi karışımı, 1 ml bitki ekstraktı (*Scorzonera latifolia*; LAT, *Scorzonera laciniata*; LAC *Scorzonera suberosa* yaprak; SSY, *Scorzonera suberosa* kök; SSK) ilave edildi.

Bu gruplar hazırladıktan sonra, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda etüvden çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve gruplardaki örnekler % 4'lük BHT ilave edilerek daha ileri oksidasyonun olması engellendi. Daha sonra örnek karışımlardan 1 ml alınarak lipid peroksidasyon düzeyi ölçüldü.

2.9.1. *In vitro* Ortamda Lipid Peroksidasyon (LPO) Ölçümü

LPO ölçümü için; 1 ml örneklerden alındıktan sonra üzerine % 0,6'lık 1 ml TBA çözültisi, %20'lik 1 ml TCA çözültisi, 1 ml %4'lük HCl ile 1 ml distile su ilave edildi ve vortekslendi. Daha sonra 95 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldı ve reaksiyon sonucu oluşan pembe renk 3 ml n-bütanol ile ekstrakte edildi. Örnekler santrifüj edildi ve santrifüj sonunda elde edilen supernatant kısmın yoğunluğu blanka karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometre okundu. Standart olarak 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (TEP) kullanıldı ve okunan değerler kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı (Şekil 6). Sonuçlar nmol/ μl olarak verildi.



Şekil 6. MDA kalibrasyon eğrisi.

2.9.2. *In vitro* Ortamda Yağ Asidi Miktarının Belirlenmesi

LPO miktarının ölçümü dışında kalan reaksiyon karışımı üzerine % 2'lik metanolik H_2SO_4 (v/v) konularak vortekslendi ve 16 saat 55 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, soğutulduktan sonra üzerine 5 ml %5'lik NaCl ilave edildi. Reaksiyon ortamında oluşan yağ asidi metil esterleri 5 ml n-hekzan ilave edildi [110]. Yağ asidi metil esteri karışımı %2'lik $KHCO_3$ ile muamele edildikten sonra çözücüsü uçuruldu. Yağ asidi metil esteri karışımları heptanda çözünerek gaz kromatografisi cihazında analizi yapıldı.

Yağ asidi metil esterleri gaz kromatografisi (SHIMADZU GC 17) ile analiz edildi. Bu analiz için 25 m uzunluğunda, 0,25 μm iç çapında ve Pernabontd 25 mikron film kalınlığına sahip Machery-Nagel (Almanya) kapiller kolon kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 120-220 °C, enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve dedektör sıcaklığı 280 °C olarak tutuldu ve kolon sıcaklık programı 120 °C'den 220 °C'ye kadar ayarlandı. Sıcaklık artışı 200 °C'ye kadar +5 °C/dk ve 220 °C'den 280 °C'ye kadar +4 °C/dk olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında, standart yağ asidi metil esterleri enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Daha sonra örneklere ait yağ asidi metil esterlerinin analizi yapıldı. Yağ asitlerinin miktarı Class GC 10 paket programı kullanılarak belirlendi. Sonuçlar $\mu g/ml$ olarak ifade edildi.

2.10. Anaerobik Kültür Ortamında Antioksidan ve Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi

Bu amaçla; öncelikle deneyde kullanılacak olan *Debaryomyces hansenii*, *Kluveromyces lactis* COWAN 1'nin gelişimi ve çoğalması için Malt Ekstrakt Buyyon (MEB) (17g/l) hazırlandı. Besiyeri ortamı hazırlandıktan sonra aşağıdaki gruplar oluşturuldu.

Kontrol 1 (Kontrol) : Sadece MEB besiyeri ortamı ve ekimi yapılan maya ilave edildi.

Kontrol 2 (P) : MEB besiyeri, ekimi yapılan maya ve bitki ekstraktı ilave edildi.

FR: MEB besiyeri ortamı, ekimi yapılan maya ve inkübasyonun 24. saatinde $FeCl_2+H_2O_2$ ilave edildi.

Bitki ekstraktı ile FR: MEB besiyeri ortamı, ekimi yapılan maya ve bitki ekstraktı ilave edilerek inkübasyona bırakıldı. Ayrıca inkübasyonun 24. saatinde bu gruba $FeCl_2+H_2O_2$ çözelti karışımı eklendi.

72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, gruplardaki örneklere %4'lük BHT ilave edilerek daha ileri oksidasyon olması engellendi ve örnekler santrifüj edilerek hücre pelletinden ayrıldı. Elde edilen pellet fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra kalan pellete 3 ml TEA (0.03 M Tris, 114 µl Asetik asit, 0.5 M EDTA) tamponu ilave edildi ve 40 saniye sonikasyon yapıldı. Sonikasyon işleminden sonra +4 °C'de 9000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen örneklerin supernatant kısımları glutatyon, protein ve lipid peroksidasyonu miktarlarının belirlenmesi amacıyla tüplere alındı. Geriye kalan pellet kısmına ise hekzan/izopropanol eklenerek ortamdaki yağ asidi miktarları belirlendi. Deney sonunda, antioksidan defans enzimlerinin belirlenmesi ve oksidasyon sonucundaki değişimlerinin de gözlemlenmesi amacıyla elektroforez işlemi de gerçekleştirildi.

2.10.1. Maya Hücresinde Glutatyon Miktarının Ölçülmesi

Bu amaçla elde edilen supernatanta 1 ml %10'luk TCA ilave edildi. Bu şekilde proteinlerin çöktürülmesi sağlandı. Karışım bu şekilde yaklaşık 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve bu sürenin sonunda 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek proteinlerin

çöktürülmesi sağlandı. Proteinler çöktürüldükten sonra üst supernatant kısım başka bir deney tüpüne alındı ve GSH miktarını ölçmek için aşağıdaki işlemler yapıldı.

Supernatant kısım üzerine 0.3 M Na₂HPO₄ çözeltisinden 2 ml ilave edildi ve 1 ml 150 µM DTNB çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı 5-10 sn sonra oluşan sarı renk oda sıcaklığında iyice stabil hale geldikten sonra 412 nm’de blanka karşı okundu [111].

2.10.2. Glutasyon Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Örneklerdeki GSH miktarı tayini, saf GSH standardından (Merck) hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı. Bunun için; saf glutatyondan 10 ml için 0.002 g olacak şekilde hazırlandıktan sonra aşağıdaki şekilde gruplar oluşturuldu:

S1→ 20 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

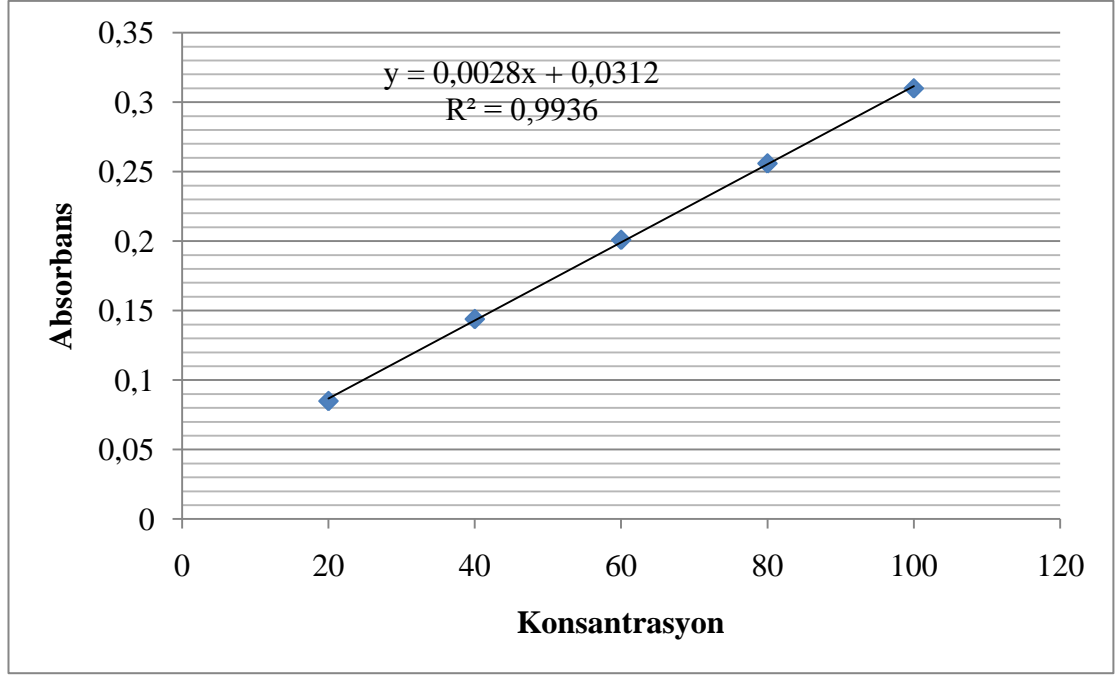
S2→ 40 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

S3→ 60 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

S4→ 80 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

S5→ 100 µl GSH + 2 ml Na₂HPO₄ + 1 ml DTNB

Gruplar stabil hale geldikten sonra 412 nm’de blanka karşı okundu ve okunan değerlere göre kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 7). GSH miktarı mg/g (GSH/pellet) olarak belirlendi.



Şekil 7. Glutatyon kalibrasyon eğrisi.

2.10.3. Maya Hücresinde Total Protein Miktarının Ölçülmesi

Maya hücresinde proteinler % 10'luk TCA ile çöktürüldükten sonra elde edilen pellete 1ml distile su ilave edilip vortekslendi. Örnekler santrifüj edildi ve oluşan supernatant alınarak total protein ölçümünde kullanıldı.

Örneklerin total protein miktarlarının ölçümü Lowry yöntemine göre yapıldı [112].

Bu amaçla aşağıdaki çözeltiler hazırlandı:

A= %1 (w/v) Bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi

B= %2 (w/v) Sodyum potasyum tartarat

C= 0.2 M Sodyum hidroksit

D= %4 (w/v) Sodyum karbonat

Hazırlanan solüsyonlardan 49 ml C reaktifi üzerine 49 ml D reaktifi ilave edildikten sonra 1'er ml A ve B reaktifinden eklendi. Bu çözeltilerin karışımından hazırlanan reaktife E solüsyonu adı verildi. Daha sonra protein çözeltisinden deney tüpüne alındı ve örnek üzerine 4 ml E reaktifinden ilave edilip, karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme süresi sonunda 500 µl Folin (10 ml Folin-Ciocalteu reaktifi + 10 ml saf su) karışımında eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve sonra 750 nm'de balnka karşı spektrofotometrede okundu.

2.10.4. Protein Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Bu amaçla saf haldeki albuminden 10 ml için 0.003 g olacak şekilde hazırlandıktan sonra standart grupları aşağıdaki şekilde hazırlandı:

S1→ 100 µl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

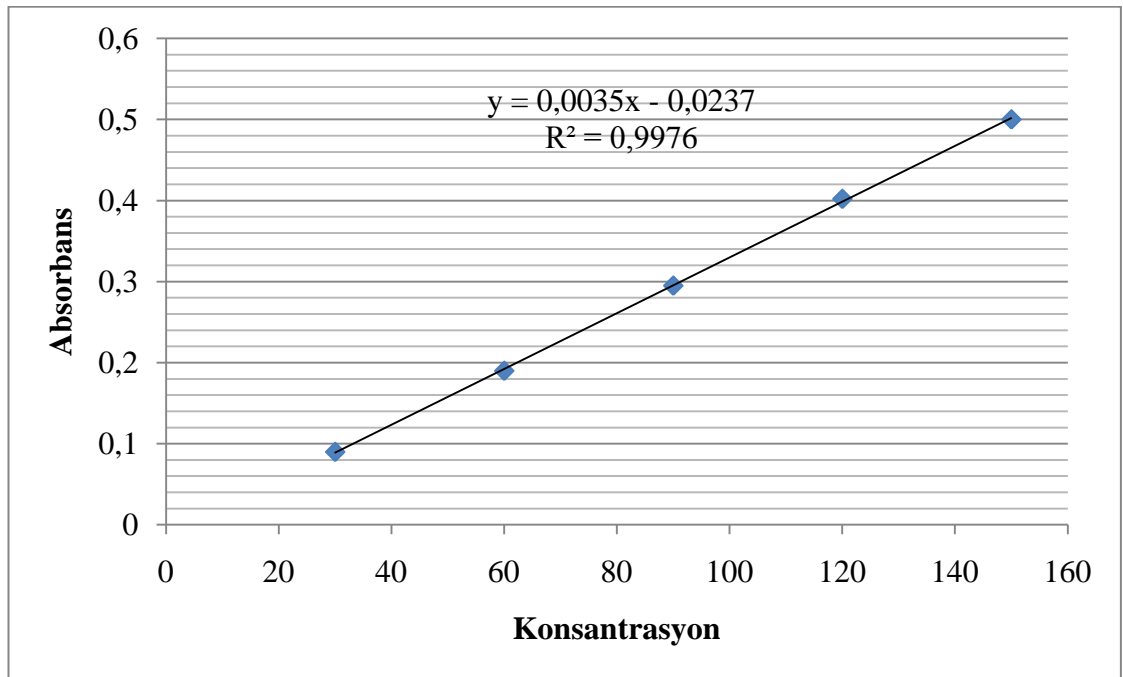
S2→ 200 µl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

S3→ 300 µl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

S4→ 400 µl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

S5→ 500 µl albumin + 4 ml E çözeltisi + 0.5 ml Folin

Gruplar 750 nm’de blanka karşı okundu ve okunan değerlere göre kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 8). Örneklerin protein miktarları elde edilen bu kalibrasyon eğrisindeki denklem vasıtasıyla hesaplandı.



Şekil 8. Protein kalibrasyon eğrisi.

2.10.5. Maya Kültürü Lipid peroksidasyon Miktarının Ölçülmesi

İnkübasyon sonrasında TEA tamponu ile sonikasyon edilen hücre peletleri +4 °C’de 9000 rpm 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen supernatantlardan 1 ml alındıktan sonra lipid peroksidasyon miktarı *in vitro* ortamda lipid peroksidasyon ölçüm basamakları aynen uygulanarak spektrofotometrede ölçüldü [109].

2.11. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Serbest ve serbest olmayan protein örnekleri Laemmli tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi [113].

Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml'lik ayırma jel solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solüsyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar (~1 cm) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi.

Tarak dişlerinin ara dolgu maddesi olarak ifade edilen yükleme jeli 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solüsyonu iyice karıştırılıp, pipet yardımıyla jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Yükleme jeli çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25-30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jelde meydana gelen ve örneklerin bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektrofrez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solüsyonu; 0.125 M Tris (pH 6.8), %2'lik SDS, %0.002 oranında Bromofenol mavisi, %20'lik gliserol, %10'luk merkaptoethanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 µl olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solüsyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dişinin genişliğine bağlı olarak, hazırladığımız karışımdan 10–20 µl kadar transfer edildi. Tank içerisine yeterli miktarda tank solüsyonu ilave edildi.

Güç kaynağından önce düşük voltajla (150 V) akım elektrofrez verildi. 5–10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180–200 V). Çıplak gözle izlenebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektrofrez cihazı kapatıldı.

Elektrofrez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel %1.25'lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en çok bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solusyonundan alınan jel boyayı giderici solüsyon (destain solution) ortamına alındı. Ara sıra çalkalayarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solüsyonda 5'er dakika bekletildi ve solüsyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2–3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş oldu.

Kullanılan Çözeltiler

- 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)
- 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)
- %10 Sodyum dodesilsülfat çözeltisi (SDS)
- %30 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi
- %10 Amonyum persülfat çözeltisi (APS)
- N, N, N', N-tetrametil-etilendiamin (TEMED)
- Gliserin
- 2-β-merkaptoethanol
- %0.05 Bromofenol blue çözeltisi
- Boyama çözeltisi (Stain solusyon/100 ml):
 - %0.1 Coomassie blue R-250
 - %45 Metanol
 - %10 Glasiyal asetik asit
 - %45 Distile su
- Boya çıkarma çözeltisi (Destain solusyon/100 ml):
 - %5 Metanol
 - %7 Glasiyal asetik asit
 - %88 Distile su
- Tank solüsyonu (Running buffer, pH 8.3)
 - Tris base 9.0 g
 - Glisin 43.0 g
 - Distile su 600 ml

Tablo 1. SDS-PAGE Ayırma jelinin hazırlanması.

Ayırma jelinin hazırlanması (%12)	Miktar
Distile su	3.35 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
% 10 SDS	100 µl
Akrilamid-Bis (%30)	4.0 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	5 µl
Toplam	10.0 ml

Tablo 2. SDS-PAGE Yükleme jelinin hazırlanması.

Yükleme jelinin hazırlanması (%4)	Miktar
Distile su	6.1 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml
SDS (%10)	100 µl
Akrilamid-Bis (%30)	1.3 ml
Amonyum persülfat (%10)	50 µl
TEMED	10 µl
Toplam	10.0 ml

Tablo 3. SDS-PAGE Örnek solüsyonu hazırlanması.

Örnek solüsyonu hazırlanması	Miktar	Son konsantrasyon
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml	0.125 M
% 10 SDS	1.6 ml	%4
%0.05 bromofenol blue	0.2 ml	%0.002
Gliserol	0.8 ml	%20
2-β-merkaptotanol	0.4 ml	%10
Distile su	3.75 ml	-
Toplam	8.0 ml	-

2.12. Maya Kültürü Lipidlerin Ekstraksiyonu

Maya örneklerinden lipidlerin ekstraksiyonu 3:2 (v/v) hekzan/izopropanol karışımının kullanıldığı Hara ve Radin metoduyla yapıldı [114]. Sonikasyon işleminden sonra kalan pellet üzerine 10 ml hekzan-izopropanol ilave edilip, her örnek 5 dakika süre ile vortekslendi. Daha sonra 4500 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilen örneklerin supernatant kısmı alınarak kapaklı deney tüplerine konuldu.

2.12.1. Maya Kültürü Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Metil esteri hazırlamak için hekzan/izopropanol fazı içindeki lipid ekstraktı 30 ml'lik sızdırma yapmayan deney tüplerine alındı. Üzerine %2'lik metanolik sülfürik asitten 5 ml ilave edilip, vortekslendi. Bu karışım 55 °C'lik etüvde 16 saat süre ile metilleşmeye bırakıldı. Metilleşme süresi sonrası tüpler etüvden çıkarılıp oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra üzerine 5 ml %5'lik sodyum klorür ilave edilerek iyice karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri 5 ml hekzan ile ekstre edilip, oluşan hekzan fazı alındı. Bu faz üzerine 5 ml %2'lik KHCO₃ ilave edildi ve tekrardan faz ayırımına bırakıldı. Daha sonra metil esterlerini içeren karışım, 45 °C'de ve azot akımı altında çözücüsü uçuruldu. Deney tüpleri içerisinde kalan lipid fazı 1 ml heptan ile çözülerek ağzı kapaklı otosampler viallere alındı ve gaz kromatografisinde analiz edildi [110].

2.12.2. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz kromatografik Analizi

Lipid ekstraktı içindeki yağ asitleri metil esterlerine dönüştürüldükten sonra SHIMADZU GC 17 cihazı ile analiz edildi. Bu analiz için 25 m uzunluğunda, 0,25 µm iç çapında ve PERMABOND 25 mikron film kalınlığına sahip Machery-Nagel (Alman) kapiller kolon kullanıldı.

Analiz sırasında kolon sıcaklığı 120–220 °C, enjeksiyon sıcaklığı 240 C° ve dedektör sıcaklığı 280 °C olarak tutuldu. Kolon sıcaklık programı 120 °C'den 220 °C'ye kadar ayarlandı. Sıcaklık artışı 200 °C'ye kadar 5 °C/dk ve 200 °C'den 220 °C'ye kadar 4 °C/dk olarak belirlendi. 220 °C'de 8 dakika tutulup, toplam süre 35 dakika olarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında örnekler ait yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemde sonra gerekli programlama yapılarak örnekler ait yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapıldı [115].

2.13. Antimikrobiyal Aktivite

2.13.1. Ekstraktların Hazırlanması

Bitki grupları 1/10 (g/ml) oranında metanol ile ekstrakte edildi [116]. Bitki ekstraktları deneysel çalışmalar süresince +4 °C’de muhafaza edildi.

2.13.2. Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması ve Aşılama

Bakteri suşları (*Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Escherichia coli* ATCC 25922) Nutrient Buyyon’a (35±1 °C’de 24 saat) maya (*Candida albicans* FMC 17) ise Yeast Malt Ekstrakt Buyyon’a (25±1 °C’de 48 saat) aşılansarak inkübasyona bırakıldı. Besiyerlerin de gelişen kültürler, Mc Farland (0.5) standardına göre yoğunluk ayarı yapıldıktan sonra buyyon tüplerine aktarıldı.

Erlenmayerde steril edilen ve 45-50 °C’ye kadar soğutulan Mueller Hinton Agar ve Yeast Malt Ekstrakt Agar yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan bakteri ve mayanın buyyondaki kültürü ile %1 oranında aşılandı (10⁶ bakteri/ml, 10⁴ maya/ml). İyice çalkalandıktan sonra 9 cm çapındaki steril petri kutularına 15’er ml döküldü ve besiyerinin homojen bir şekilde dağılması sağlandı.

2.13.3. Oyuk Agar Metodu

Katılaştıran agar üzerine 6mm çapında oyuklar açıldı. Açılan oyuklara bir damla besiyerinden sonra 10 µl bitki ekstraktı aktarıldı. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları +4 °C’de 2 saat bekletildikten sonra bakteri aşılanan plaklar 37±1 °C’de 24 saat, maya ve dermatofit aşılanan plaklar ise 25±1 °C’de 3 gün süre ile inkübasyona bırakıldı (n=3). Sonuçlar ortalama değer olarak inhibisyon zonu (mm) şeklinde değerlendirildi [117, 118].

2.14. İstatistiksel Analiz

İstatistik analizi için, SPSS 15.0 for Windows paket programı kullanıldı. Kontrol grubu ile deneysel gruplar arasındaki karşılaştırma One Way ANOVA ve LSD testleri

kullanılarak yapıldı. Sonuçlar mean±SEM olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıklarda $p>0.05$, $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ ve $p<0.0001$ değerleri kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Bitki Örneklerinin Flavonoid ve Resveratrol İçerikleri

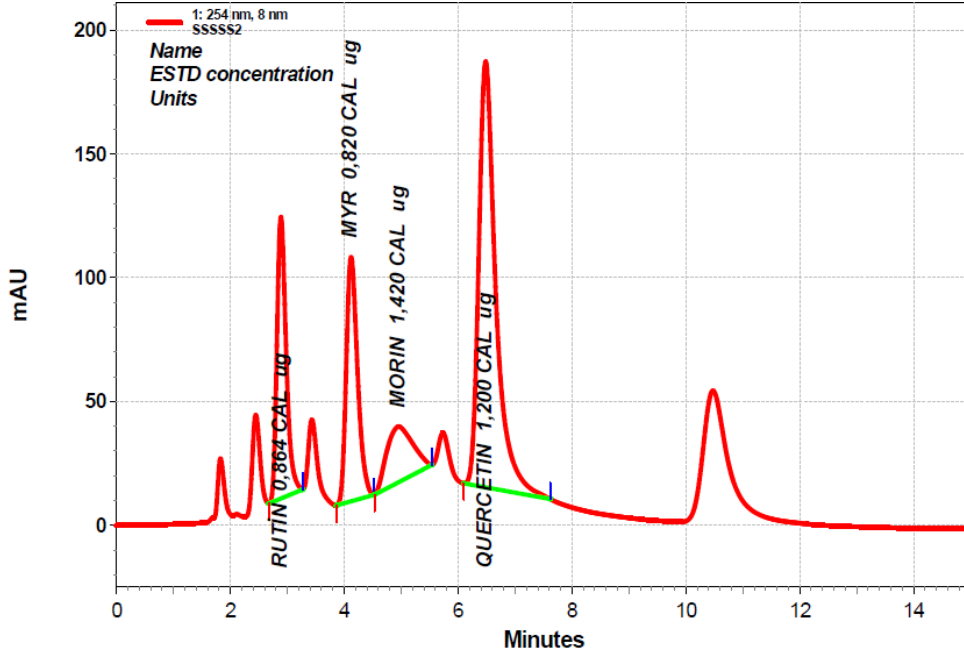
Flavonoid analizi sonuçlarına göre; her üç *Scorzonera* türünde de kuarsetin bulunduğu belirlendi. Kuarsetin içeriği gruplar arasında karşılaştırıldığında, en fazla içeriğe sahip bitki grubunun SSY olduğu belirlenirken ($p<0.0001$), en düşük içeriğin ise LAC bitkisinde olduğu görüldü. Mirisetin miktarı gruplar arasında karşılaştırıldığında, LAT bitkisinde diğer bitkilere oranla bu flavonoid yüksek oranda bulundu ($p<0.0001$). Rutin içeriği sadece SSY grubunda belirlendi (Tablo 4).

Resveratrol analizi sonucunda çalışmada kullanılan her üç *Scorzonera* türünde de resveratrol belirlenmedi. Toplam flavonoid ve resveratrol içeriği bakımından bitki örnekleri kendi aralarında kıyaslandığında ise SSY grubunun diğer gruplara kıyasla daha yüksek düzeyde bu bileşikleri bulundurduğu tespit edildi ($p<0.0001$) (Tablo 4).

Tablo 4. *Scorzonera* bitki ekstraktlarının flavonoid ve resveratrol içeriği ($\mu\text{g}/1 \text{ g}$).

Flavonoidler	SSK	SSY	LAC	LAT
Rutin	-	15.38±3.27^{cd}	-	-
Mirisetin	0.35±0.3	3.12±1.02	-	16.16±0.92^{cd}
Morin	0.35±0.3	0.91±0.83^{cd}	0.17±0.01	-
Kuarsetin	0.36±0.03	6.54±1.16^{cd}	0.17±0.01	0.65±0.15
Kamferol	0.17±0.01	-	3.55±0.78^{cd}	0.62±0.11
Naringenin	0.66±0.15^{cd}	-	-	-
Resveratrol	-	-	-	-
Toplam	1.89±0.79	25.95±5.28^{cd}	3.89±0.8	17.43±1.18

cd; $p<0.0001$



Şekil 9. Standart flavonoid kromatogramı $\lambda=254$ nm.

3.2. Bitki Örneklerinin Fitosterol ve Vitamin İçerikleri

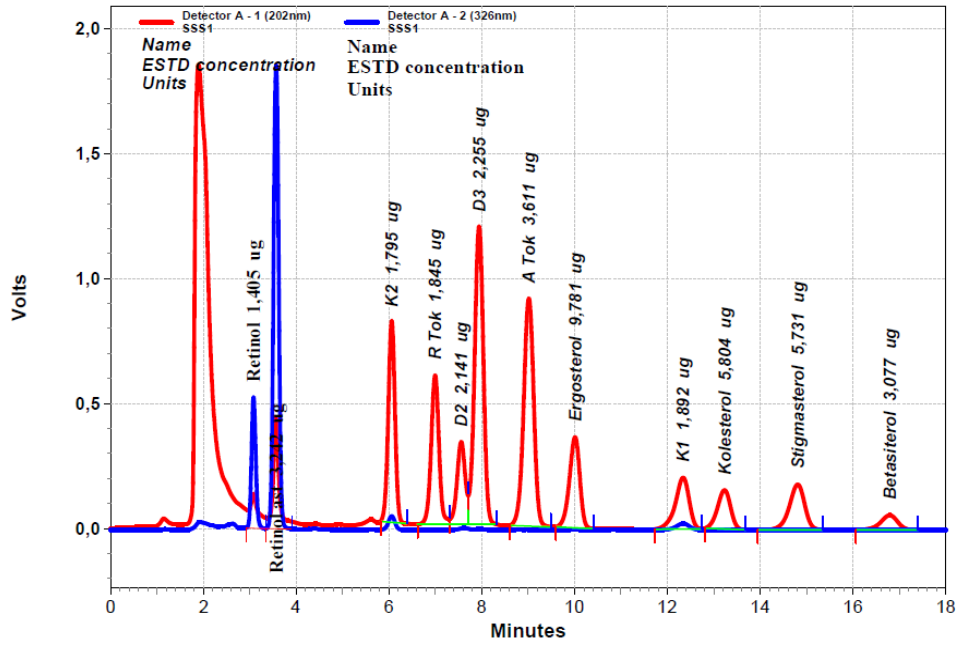
Vitamin analizi sonuçlarına göre kullanılan *Scorzonera* türlerinde; K, D, retinol ve α -Tokoferol belirlendi (Tablo 5). Sonuçlar değerlendirildiğinde; grupların D vitamini içeriği diğer vitaminlere oranla daha yüksek düzeyde bulundu. D vitamini ve retinol bakımından gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde, SSY grubunun diğer gruplara kıyasal bu vitamini daha yüksek düzeyde bulundurduğu görüldü ($p<0.0001$). α -Tokoferol ve K vitamini miktarı bakımından gruplar kendi aralarında incelendiğinde, en fazla içeriğin LAT grubunda olduğu saptandı ($p<0.0001$) (Tablo 5).

Fitosterol analiz sonuçlarına göre; tüm gruplarda ergosterol, stigmasterol ve β -sitosterol saptandı. Fitosteroller içerisinde β -sitosterol'ün en fazla bulunan fitosterol olduğu tespit edildi. β -sitosterol içeriğine en fazla sahip olan grubun SSY olduğu belirlendi ($p<0.0001$). Stigmasterol içeriği diğer gruplara oranla LAT grubunda oldukça yüksek düzeyde görüldü ($p<0.0001$). Gruplar ergosterol içeriği bakımından kendi aralarında kıyaslandığında ise SSK grubunda diğer gruplara oranla bu bileşiğe daha yüksek miktarda rastlandı ($p<0.0001$) (Tablo 5).

Tablo 5. *Scorzonera* bitki ekstraktlarının vitamin ve fitosterol içeriği (µg/1 g).

Lipofilik Vitaminler & Fitosteroller	SSK	SSY	LAC	LAT
Vitamin K	1.38±0.03	1.01±0.03	0.65±0.07	1.59±0.05^{cd}
Retinol	-	0.25±0.06^{cd}	0.02±0.01	0.12±0.02
Vitamin D	0.73±0.09	3.77±0.09^{cd}	1.19±0.17	3.41±0.04
α-Tokoferol	0.2±0.03	0.43±0.06	0.08±0.01	0.6±0.06^{cd}
Ergosterol	1.2±0.03^{cd}	3.06±0.41	2.44±0.11	3.22±0.09
Stigmasterol	25.18±3.21	10.80±0.54	21.67±1.1	30.76±1.19^{cd}
β-Sitosterol	3.27±0.24	50.75±3.15^{cd}	4.26±0.34	35.55±1.71

cd; p<0.0001



Şekil 10. Vitamin ve fitosterol standart kromatogramı $\lambda=202$ nm, $\lambda=326$ nm.

3.3. Bitki Örneklerinin Şeker İçerikleri

Bitkilerin şeker analizi sonuçlarına göre; bütün *Scorzonera* türlerinde fruktoz, glukoz ve sakkaroz şekerleri ortak olarak bulundu. Gruplar arası toplam şeker miktarı karşılaştırıldığında en yüksek şeker miktarı LAT'da belirlendi (p<0.0001) (Tablo 6).

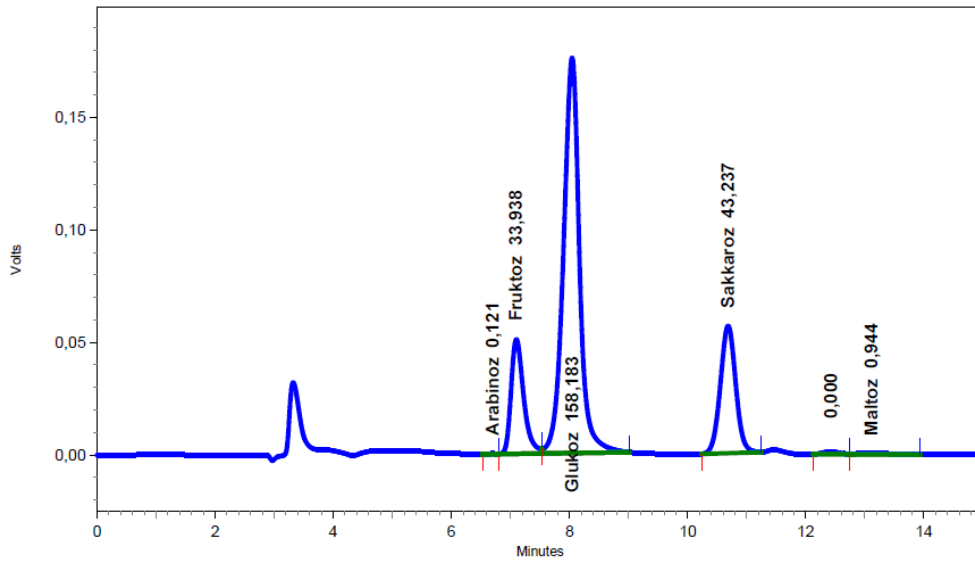
Glukoz ve fruktoz miktarları gruplar arasında karşılaştırıldığında en yüksek düzeyin SSY grubunda olduğu görüldü (p<0.0001). Sakkaroz miktarları gruplar arasında

kıyaslandığında ise en yüksek miktarın LAT grubunda olduğu tespit edildi ($p<0.0001$) (Tablo 6).

Tablo 6. Bitki gruplarının şeker içerikleri ($\mu\text{g/g}$).

Şekerler	SSK	SSY	LAC	LAT
Arabinoz	250,31±4,13 ^{cd}	35,06±4,33	-	-
Fruktoz	231,02±3,10	729,33±4,17 ^{cd}	418,08±5,38	519,37±4,03
Glukoz	348,53±2,85	826,97±7,23 ^{cd}	567,28±3,55	730,26±7,78
Sakkaroz	228,22±6,60	535,33±5,08	521,33±5,16	1158,84±3,60 ^{cd}
Maltoz	-	14,53±1,13 ^{cd}	10,26±1,96	-
Toplam	1058,08±16,68	2106,16±21,94	1516,95±16,05	2408,47±15,41 ^{cd}

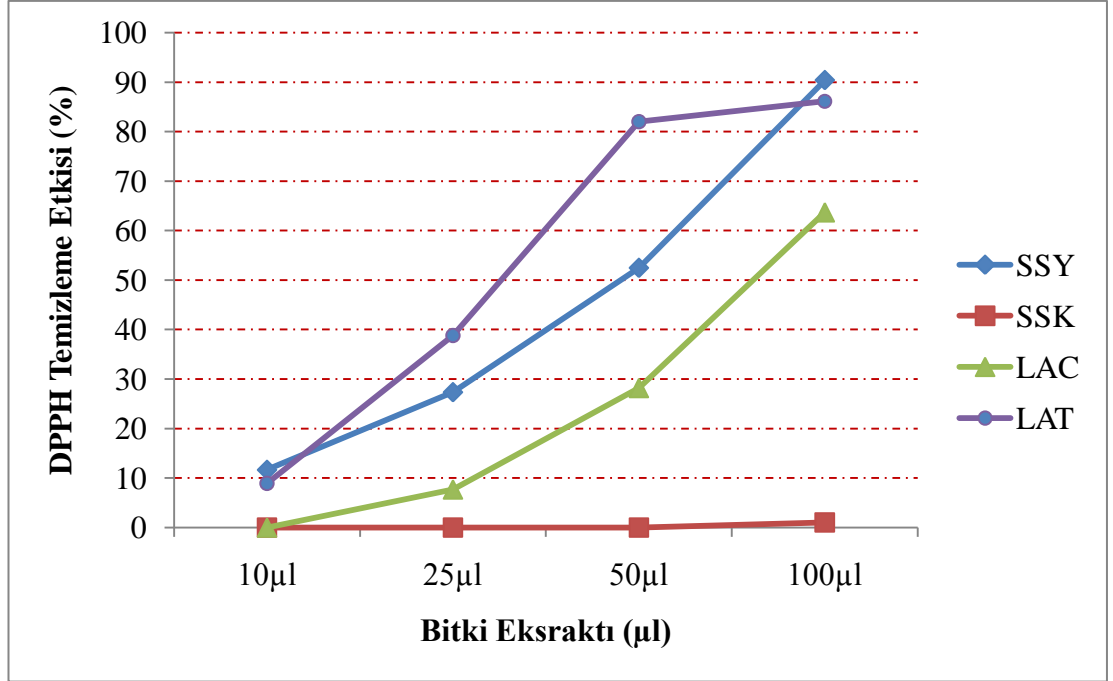
cd; $p<0.0001$



Şekil 11. Bitki örneklerinin örnek şeker analizi kromatogramı.

3.4. Bitki Ekstraktlarının DPPH Radikali Temizleme Etkisi

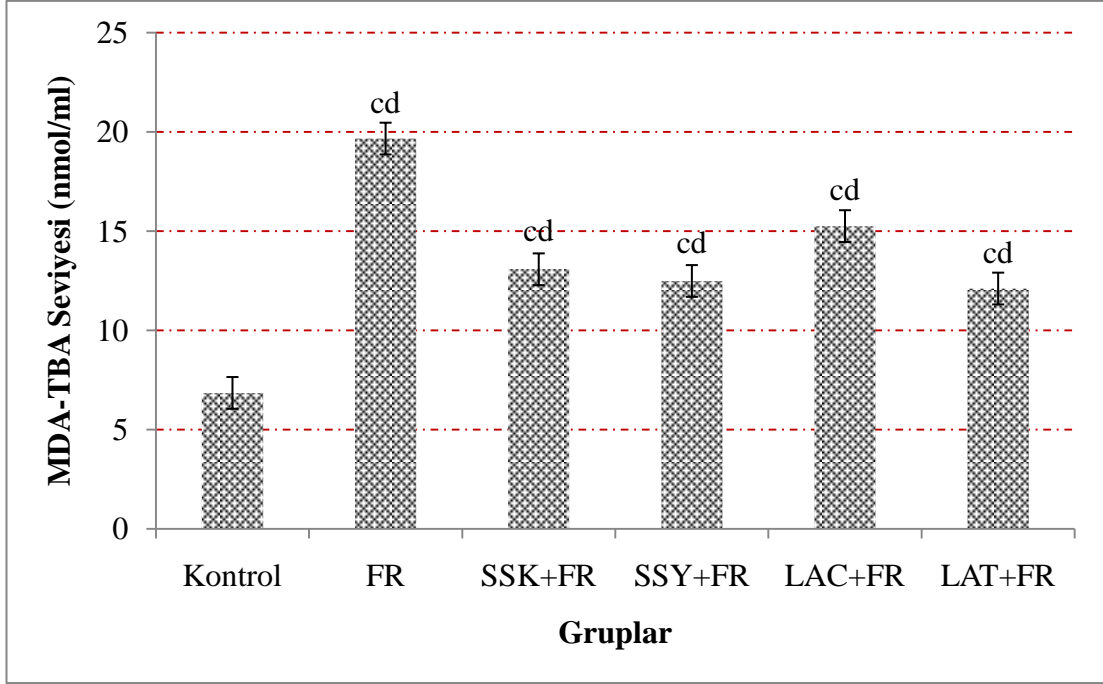
Bitki gruplarının konsantrasyona bağlı % DPPH temizleme etkisi Şekil 12’de gösterildi. Bitki gruplarının DPPH serbest radikalini temizleme sonuçlarına göre; *Scorzonera* türlerinin yapraklarından elde edilen ekstrakt grupları 10 μl konsantrasyondan itibaren artan konsantrasyonlara paralel olarak DPPH serbest radikali temizleme aktivitesi artış gösterdi. *S. suberosa*’nın yaprak kısımlarına kıyasla kök kısmından elde edilen metanolik ekstraktın oldukça zayıf etki gösterdiği belirlendi (Şekil 12). 100 μl konsantrasyonda en etkili bitki grubu SSY olarak saptandı.



Şekil 12. Bitki gruplarının DPPH serbest radikal temizleme etkisi.

3.5. Bitki Ekstraktlarının *In vitro* Ortamda Antioksidan Etkileri

In vitro lipid peroksidasyon sonuçlarına göre; kontrol grubuna kıyasla FR verilen bütün gruplarda MDA-TBA seviyesinde artış görüldü ($p < 0.0001$) (Şekil 13). FR grubu ile bitki ekstraktı verilen gruplar kıyaslandığında, bitki gruplarında önemli düzeyde lipid peroksidasyon seviyesinin azaldığı belirlendi ($p < 0.0001$). Bitki grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise SSY+FR grubu ile LAT+FR grubu arasında istatistiksel bir fark gözlemlenmedi ($p > 0.05$). SSK+FR ve SSY+FR grupları arasında kısmi bir fark görülürken ($p < 0.05$), LAC+FR grubunda diğer bitki gruplarına kıyasla oldukça yüksek düzeyde lipid peroksidasyon miktarı belirlendi ($p < 0.0001$).



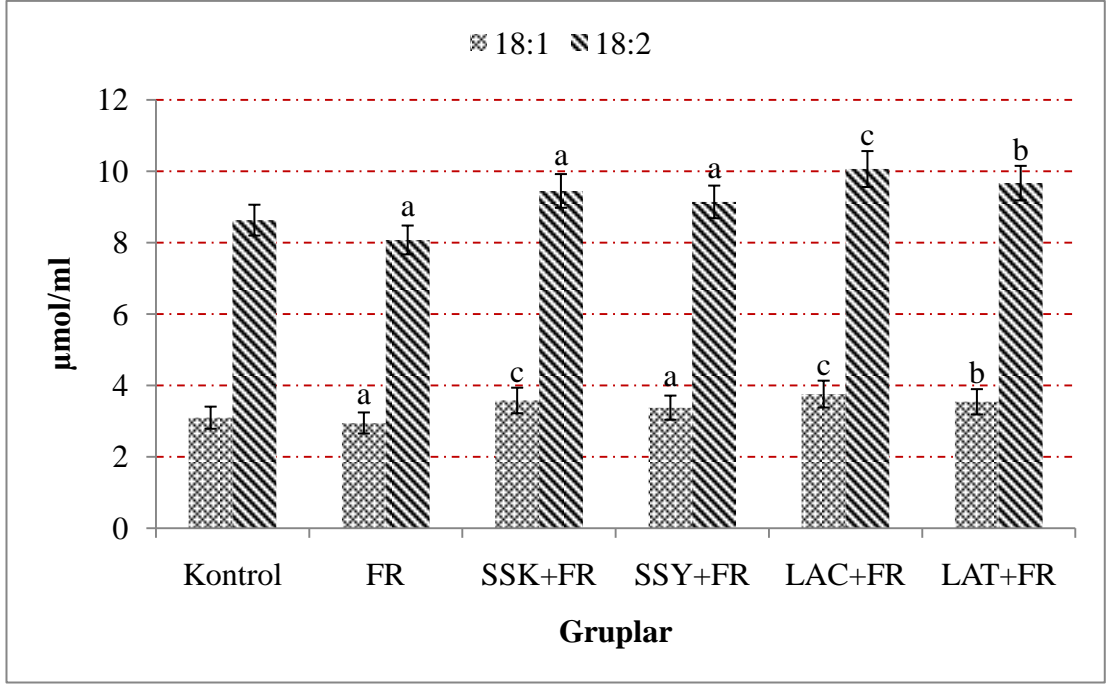
Şekil 13. Bitki ekstraktlarının *in vitro* lipid peroksidasyonu üzerine antioksidan etkisi (nmol/ml).
cd; p<0.0001

3.6. Bitki Ekstraktlarının *In vitro* Ortamda Yağ Asidi Metil Esterleri Üzerine Etkileri

In vitro metil esterleri analiz sonuçlarına göre; bütün bitki gruplarında oleik (18:1) ve linoleik (18:2) asit düzeyleri kontrol grubuna kıyasla artış gösterdi ($p>0.05$, $p<0.05$, $p<0.01$) (Şekil 14). Ayrıca bu yağ asit seviyeleri kontrol grubuna kıyasla FR grubunda kısmi azalma göstermesine rağmen istatistiksel açıdan bu azalma anlamlı görülmedi ($p>0.05$) (Şekil 14).

Oleik asit miktar bitki grupları arasında incelendiğinde ise LAC+FR, SSK+FR ve LAT+FR grupları arasında istatistiksel bir fark saptanmazken ($p>0.05$), bu gruplara kıyasla oleik asit miktarı SSY+FR grubunda kısmi azalma görüldü ($p<0.05$).

Linoleik asit düzeyi bakımından bitki grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise gruplar arasında bir fark belirlenmedi ($p>0.05$).

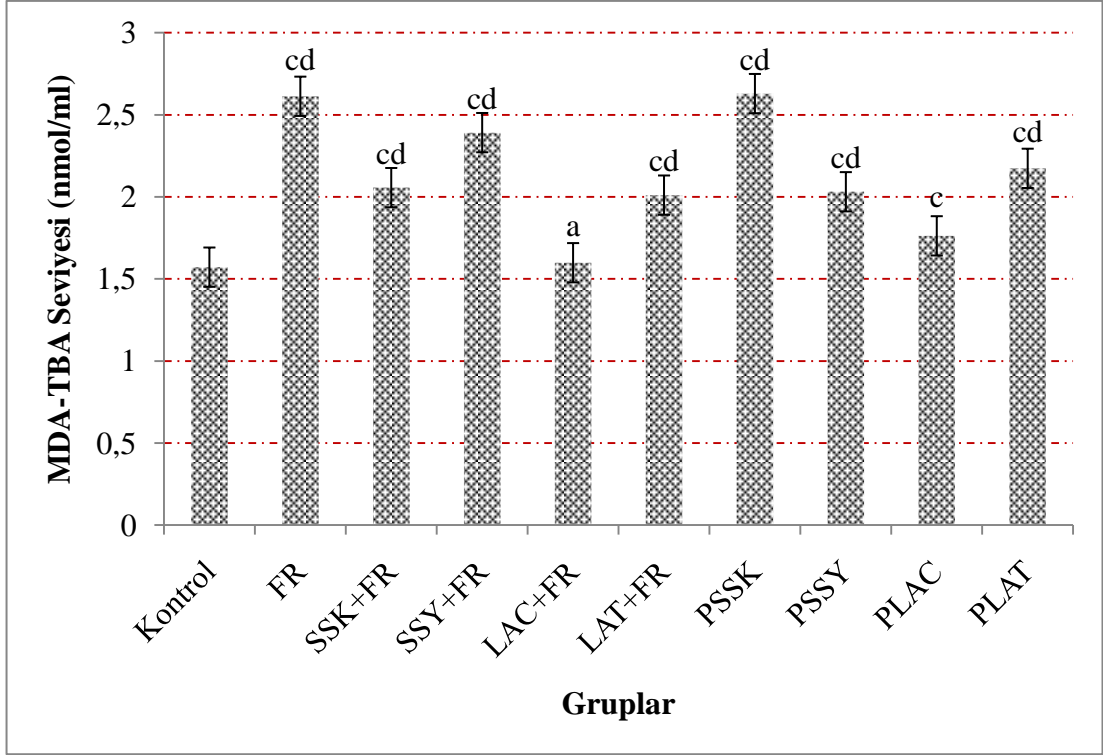


Şekil 14. Bitki ekstraktlarının *in vitro* ortamda metil esterleri üzerine etkisi (µmol/ml).

a; $p>0.05$, b; $p<0.05$, c; $p<0.01$

3.7. Bitki Ekstraktlarının *Debaryomyces hansenii* Üzerine Antioksidan Etkisi

Kültür ortamı lipid peroksidasyon analiz sonuçları Şekil 15’de gösterilmiştir. Lipid peroksidasyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla FR grubunda önemli düzeyde artış gösterdi ($p<0.0001$). Kontrol grubu ile bitki ekstraktları kıyaslandığında LAC+FR ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark bulunmazken ($p>0.05$) diğer bitki gruplarında önemli düzeyde lipid peroksidasyon seviyesinin arttığı saptandı ($p<0.01$, $p<0.0001$) (Şekil 15). MDA-TBA seviyesi FR grubuna kıyasla PSSK grubunda istatistiksel bir farklılık göstermezken ($p>0.05$), diğer bitki gruplarında ise önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.0001$). Bitki grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise SSK+FR, LAT+FR, PSSY ve PLAT grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlılık gözlemlenmedi ($p>0.05$).



Şekil 15. *Debaryomyces hansenii*'nin lipid peroksidasyon düzeyi (nmol/ml).

a; $p>0.05$, c; $p<0.01$, cd; $p<0.0001$

3.8. Bitki Ekstraktlarının *Debaryomyces hansenii*'nin Yağ Asidi İçeriği Üzerine Etkisi

Maya hücrelerinin yağ asidi profili yapılan analizler sonucu incelendiğinde, palmitik asit (16:0) miktarı kontrol grubuna kıyasla PSSY, PLAC ve LAC+FR bitki gruplarında önemli düzeyde yüksek bulunurken ($p<0.0001$), diğer bitki grupları ve FR grubunda ise önemli düzeyde azalma görüldü ($p<0.01$, $p<0.0001$).

Palmitoleik asit (16:1) miktarında kontrol grubu ve PLAT grubu arasında istatistiksel olarak farklılık görülmezken ($p>0.05$), LAC+FR, PSSY ve PLAC gruplarında bu yağ asidinin miktarı önemli düzeyde yüksek bulundu ($p<0.0001$).

Stearik asit (18:0) miktarı kontrol grubuna göre FR, PSSY, PLAC gruplarında yüksek miktarda bulundu (Tablo 7). Oleik asit (18:1) miktarında hem FR hem de bitki ekstraktı gruplarında anlamlı derecede azalma belirlendi ($p<0.0001$). Linoleik asit (18:2) miktarında kontrole kıyasla SSK+FR, LAC+FR, PSSY ve PLAC gruplarında anlamlı düzeyde artış görülürken ($p<0.05$, $p<0.0001$), diğer gruplarda ise bu yağ asidi miktarında azalma gözlemlendi ($p<0.0001$).

Linolenik asit (18:3) miktarında kontrol grubuna kıyasla SSK+FR ve SSY+FR gruplarında istatistiksel bir fark saptanmadı ($p>0.05$). FR ve PSSK grupları kontrole kıyasla 18:3 miktarı anlamlı düzeyde az bulundu ($p<0.0001$), fakat diğer ekstrakt gruplarında ise önemli düzeyde artış belirlendi ($p<0.0001$).

Tablo 7. Bitki gruplarının *Debaryomyces hansenii* hücrelerinin yağ asidi profili üzerine etkisi (mg/g).

Yağ Asitleri	Kontrol	FR	SSK+FR	SSY+FR	LAC+FR	LAT+FR
16:0	0.69±0.01	0.63±0.02	0.08±0.02	0.13±0.02	1.07±0.01^{cd}	0.31±0.02
16:1	0.45±0.02	0.23±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.68±0.01	0.15±0.03
18:0	0.37±0.01	0.47±0.02	0.03±0.01	0.04±0.01	0.34±0.07 ^b	0.11±0.05
18:1	0.31±0.01	0.16±0.01	0.02±0.02^{cd}	0.02±0.01	0.16±0.04	0.07±0.01
18:2	0.2±0.006	0.09±0.06	0.22±0.01 ^b	0.03±0.01^{cd}	0.23±0.02	0.05±0.01
18:3	0.24±0.01	0.16±0.06	0.25±0.01 ^a	0.25±0.01 ^a	1.96±0.2^{cd}	0.41±0.01
Diğerleri	0.48±0.01	0.30±0.01	0.02±0.01	0.02±0.06	0.55±0.04	0.11±0.01
Toplam	2.74±0.07	2.04±0.12	0.69±0.28	0.55±0.16	4.99±0.23^{cd}	1.21±0.04

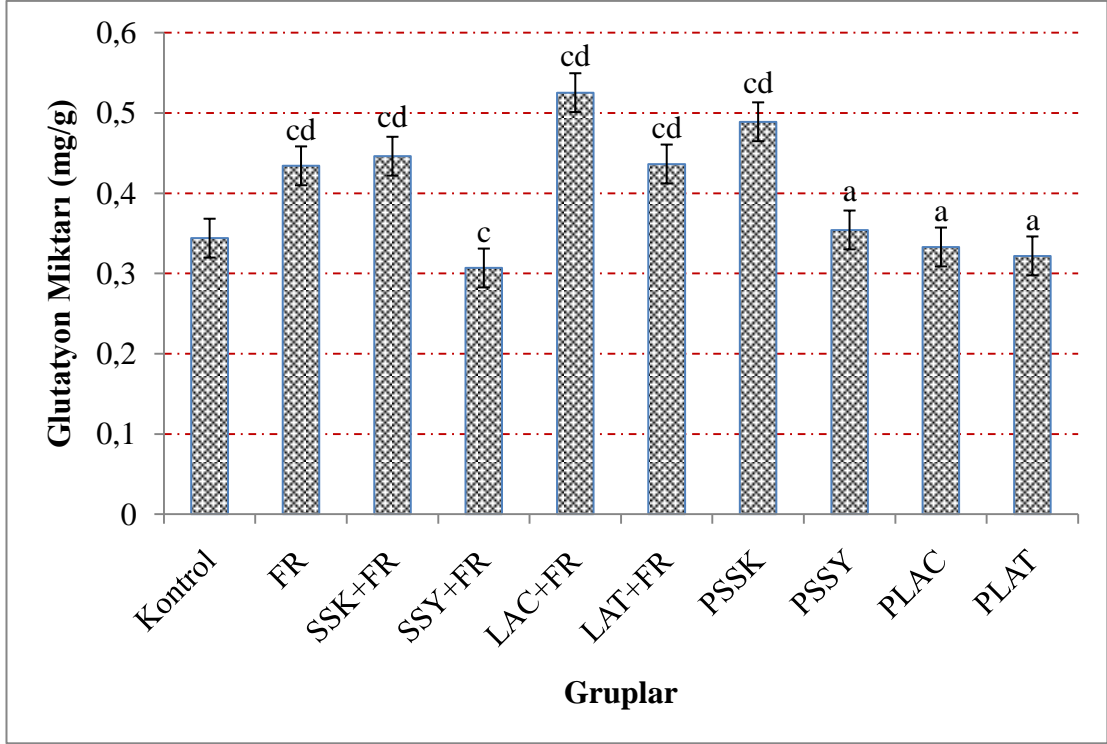
Tablo 7'nin devamı

Yağ Asitleri	PSSK	PSSY	PLAC	PLAT
16:0	0.30±0.001	1.27±0.005^{cd}	0.91±0.004	0.65±0.005 ^c
16:1	0.11±0.01	0.82±0.003^{cd}	0.55±0.002	0.46±0.004 ^a
18:0	0.26±0.007	0.54±0.001	0.41±0.002	0.33±0.01
18:1	0.10±0.001	0.25±0.001	0.14±0.004	0.15±0.002
18:2	0.11±0.002	0.32±0.003^{cd}	0.25±0.005	0.08±0.001
18:3	0.16±0.01	2.18±0.008^{cd}	1.91±0.02	0.91±0.001
Diğerleri	0.18±0.004	0.94±0.008	1.07±0.2	0.38±0.005
Toplam	1.22±0.02	6.32±0.03^{cd}	5.24±0.23	2.96±0.02

a; $p>0.05$, b; $p<0.05$, c; $p<0.01$, cd; $p<0.0001$

3.9. Bitki Ekstraktlarının *Debaryomyces hansenii*'nin Glutasyon Miktarı Üzerine Etkisi

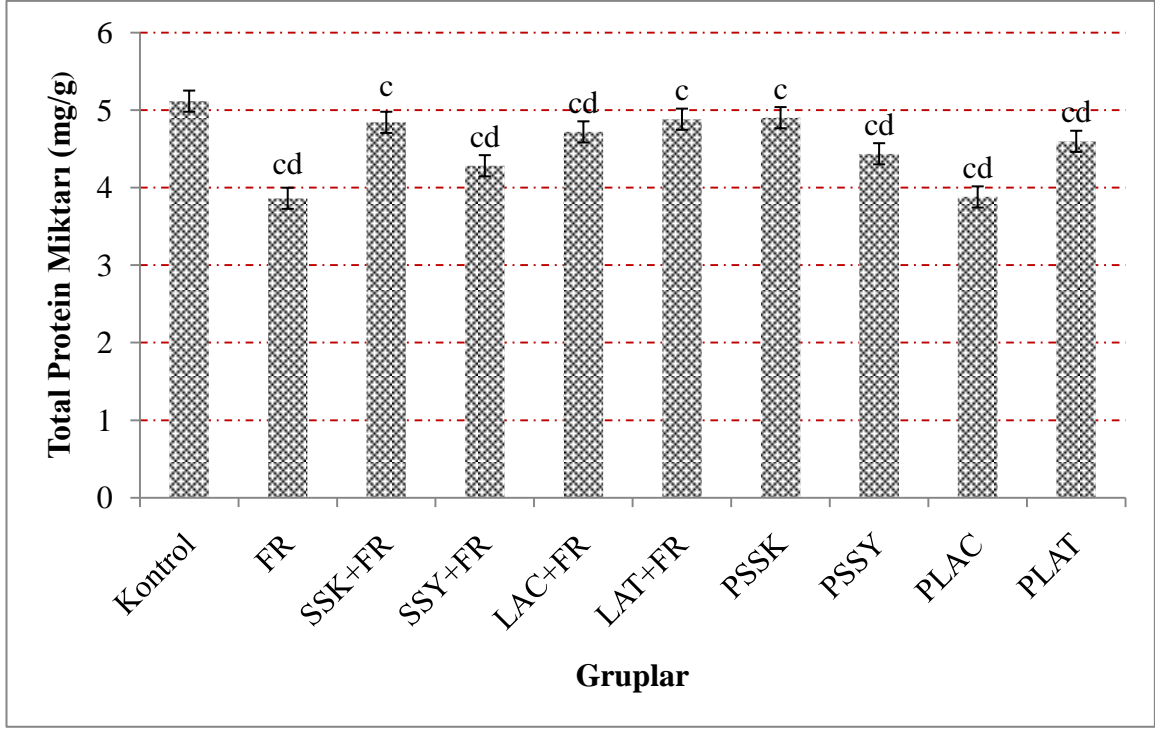
Bitki ekstraktlarının maya hücreesindeki glutasyon miktarı üzerindeki etkisi Şekil 16'da gösterilmiştir. Glutasyon miktarı kontrol grubuna kıyasla PSSY, PLAT ve PLAC gruplarında herhangi bir farklılık göstermezken ($p>0.05$), SSY+FR grubunda önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.01$). Kontrol grubu ile diğer ekstrakt grupları karşılaştırıldığında ise ekstrakt gruplarında glutasyon miktarının oldukça yüksek bulunduğu belirlendi ($p<0.0001$).



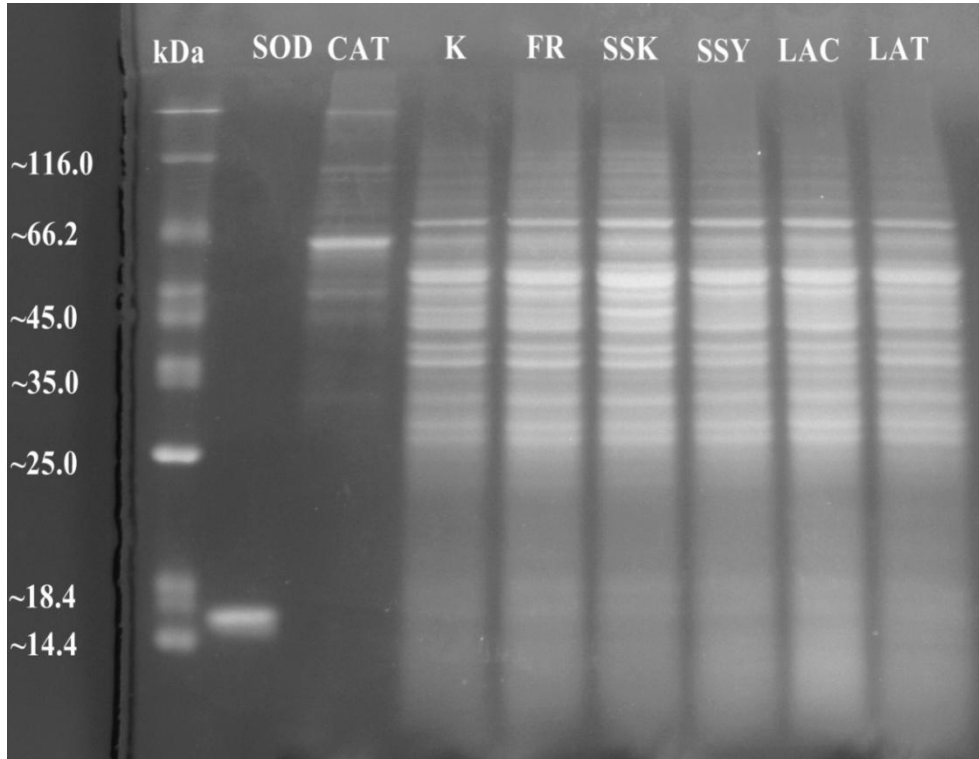
Şekil 16. Bitki ekstraktlarının *Debaryomyces hansenii*'nin glutasyon miktarı üzerine etkisi (mg/g).
a; $p>0.05$, c; $p<0.01$, cd; $p<0.0001$

3.10. Bitki Ekstraktlarının *Debaryomyces hansenii*'nin Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi

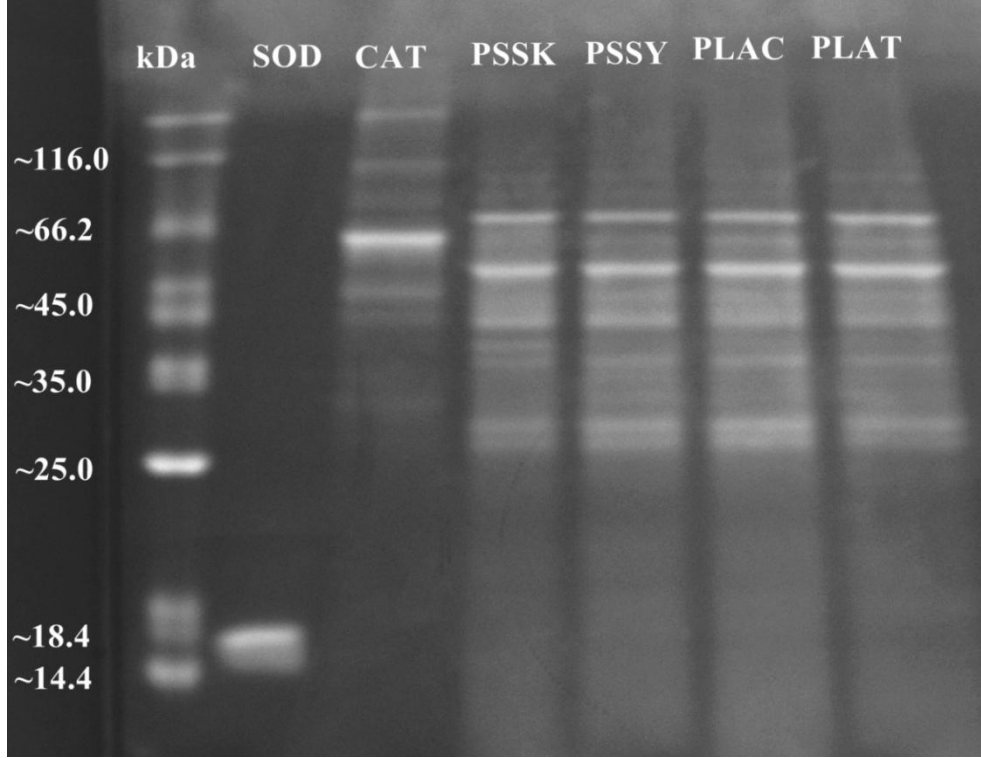
Bitki ekstraktlarının *Debaryomyces hansenii* hücreesindeki total protein miktarı üzerine etkisi kontrol grubuna göre kıyaslandığında bütün gruplarda miktarın önemli seviyede azaldığı gözlemlendi ($p<0.01$, $p<0.0001$) (Şekil 17). Bitki grupları FR grubu ile kıyaslandığında; PLAC grubunun FR grubuyla istatistiksel bir farklılığının olmadığı ($p>0.05$), fakat diğer bitki gruplarında ise protein miktarının önemli düzeyde yüksek olduğu bulundu ($p<0.0001$).



Şekil 17. Bitki ekstraktlarının *Debaryomyces hansenii*'nin total protein miktarı üzerine etkisi (mg/g).
c; $p < 0.01$, cd; $p < 0.0001$



Şekil 18. *Debaryomyces hansenii*'nin SDS-PAGE görüntüsü (a).

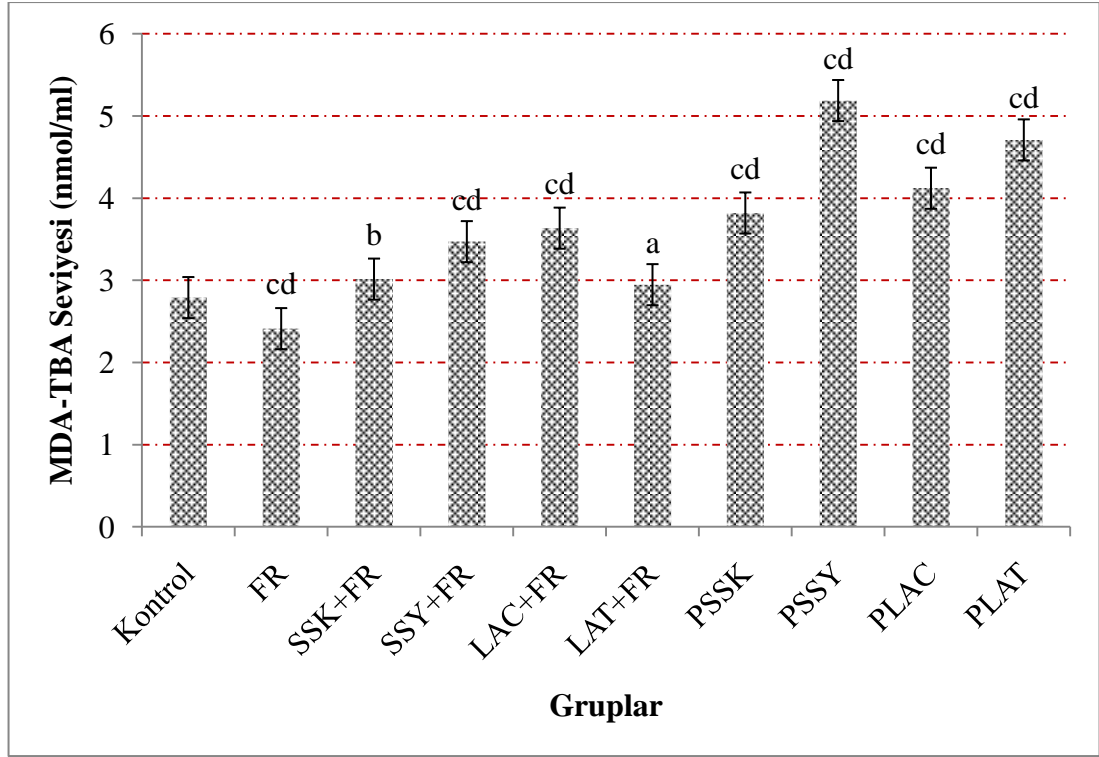


Şekil 19. *Debaryomyces hansenii*'nin SDS-PAGE görüntüsü (b).

Şekil 18, 19'daki jel görüntüleri değerlendirilirse; Jelde 1 numaralı bant standart protein markırı, 2 ve 3 nolu bantlar enzim standartlarını içermektedir. Kontrole göre SOD miktarı gruplar arasında değerlendirilecek olursa, bütün grupların oldukça zayıf ekspresyon düzeyine sahip olduğu anlaşılmaktadır. CAT bandı kontrole kıyasla; FR ve SSK gruplarında yüksek düzeyde, diğer ekstrakt gruplarında ise kontrolün üzerinde bir bantlaşma görülmektedir. Bantların belirginlik düzeyi protein ekspresyon miktarı ile paralellik gösterir.

3.11. Bitki Ekstraktlarının *Kluveromyces lactis* Üzerine Antioksidan Etkisi

Bitki ekstraktlarının maya hücresi lipid peroksidasyon analiz sonuçları Şekil 20'de verilmiştir. Lipid peroksidasyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla FR grubunda önemli düzeyde azalma gösterdi ($p < 0.0001$). Bitki grupları lipid peroksidasyon miktarı bakımından kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, SSK+FR grubunda kısmı artış görülürken ($p < 0.05$), LAT+FR grubunda istatistiksel bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$). Diğer bitki gruplarında ise lipid peroksidasyon seviyesi kontrol grubunun oldukça üzerinde bulundu ($p < 0.0001$).



Şekil 20. *Kluyveromyces lactis*'nin lipid peroksidasyon düzeyi (nmol/ml).

a; $p>0.05$, b; $p<0.05$, cd; $p<0.0001$

3.12. Bitki Ekstraktlarının *Kluyveromyces lactis*'nin Yağ Asidi Profili Üzerine Etkisi

Maya hücrelerinin yağ asidi profili yapılan analizler sonucu incelendiğinde, Palmitik asit (16:0) miktarı kontrol grubuna kıyasla SSY+FR grubunda önemli düzeyde azalma gösterdi ($p<0.0001$). Diğer gruplarda ise kontrol grubunun üzerinde 16:0 miktarı belirlendi (Tablo 8).

Palmitoleik asit (16:1) miktarında kontrol grubu, SSK+FR ve SSY+FR grupları arasında istatistiksel olarak farklılık görülmezken ($p>0.05$), diğer gruplarda bu yağ asidinin miktarı önemli düzeyde yüksek bulundu ($p<0.0001$).

Oleik asit miktarı kontrol grubuna kıyasla SSY+FR ve PSSY gruplarında anlamlı bir farklılık göstermemesine rağmen hem FR hem de diğer bitki gruplarında anlamlı derecede artış belirlendi ($p<0.01$, $p<0.0001$). Linoleik ve linolenik asit miktarları kontrole kıyasla bütün gruplarda önemli derecede yüksek bulundu ($p<0.0001$). Grupların toplam lipid içerdiği kıyaslandığında ise, PLAC grubunun yüksek düzeyde lipid içeriğine sahip olduğu gözlemlendi ($p<0.0001$) (Tablo 8).

Tablo 8. Bitki gruplarının *Kluveromyces lactis* hücresinin yağ asidi profili üzerine etkisi (mg/g).

Yağ Asitleri	Kontrol	FR	SSK+FR	SSY+FR	LAC+FR	LAT+FR
16:0	0.36±0.003	0.91±0.002	0.64±0.003	0.31±0.001^{cd}	1.13±0.001	0.77±0.003
16:1	0.11±0.006	0.17±0.005	0.11±0.01 ^a	0.11±0.004 ^a	0.42±0.01	0.33±0.005
18:0	0.51±0.007	0.64±0.005	0.31±0.005	0.12±0.002	0.30±0.004	0.11±0.005
18:1	0.07±0.001	0.33±0.002	0.23±0.05	0.10±0.02 ^a	0.48±0.07^{cd}	0.14±0.002
18:2	0.12±0.01	0.33±0.01	0.32±0.02	0.15±0.001	0.61±0.005	0.20±0.001
18:3	0.04±0.01	0.16±0.006	0.25±0.01	0.25±0.01	1.96±0.2^{cd}	0.41±0.01
Diğerleri	0.07±0.001	0.58±0.005	0.20±0.001	0.13±0.002	0.62±0.01	0.34±0.003
Toplam	1.28±0.03	3.12±0.03	2.06±0.09	1.17±0.04	5.52±0.23^{cd}	2.3±0.02

Tablo 8'in devamı

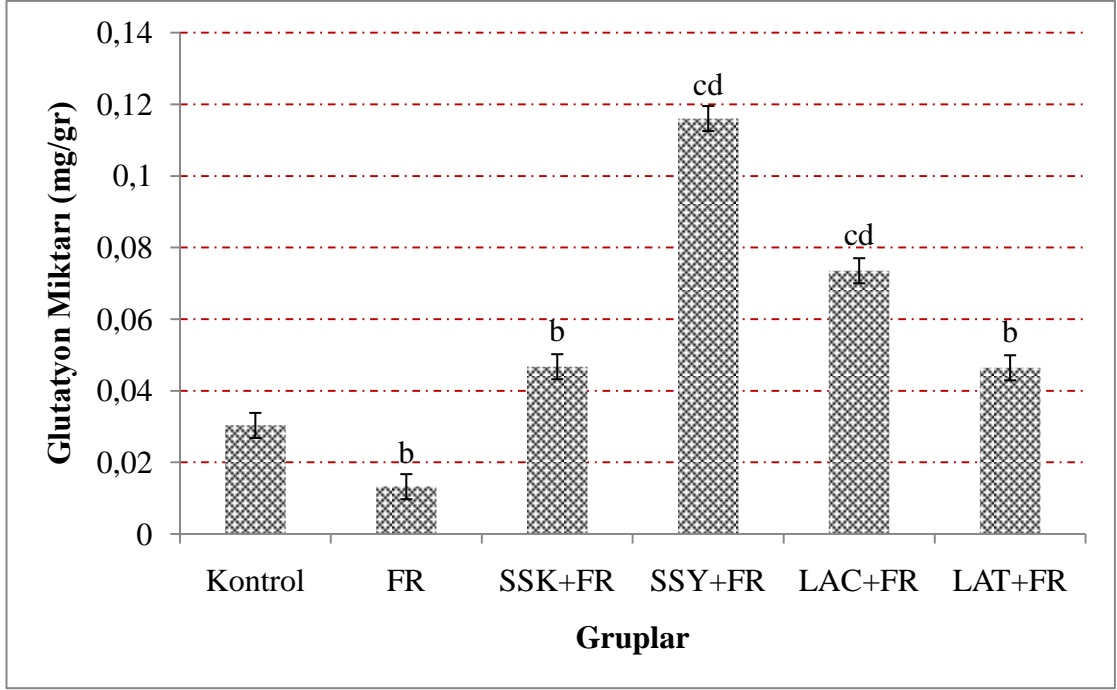
Yağ Asitleri	PSSK	PSSY	PLAC	PLAT
16:0	0.43±0.002	0.58±0.006	1.68±0.002^{cd}	1.07±0.004
16:1	0.14±0.004	0.39±0.004	1.22±0.002	0.55±0.004
18:0	0.36±0.002	0.37±0.003	0.89±0.001	0.53±0.001
18:1	0.12±0.001 ^c	0.11±0.004 ^a	0.25±0.006	0.36±0.002
18:2	0.34±0.001	0.24±0.001	0.75±0.001	0.76±0.001^{cd}
18:3	0.77±0.04	1.22±0.003	4.36±0.02^{cd}	1.76±0.001
Diğerleri	0.57±0.001	0.58±0.004	1.12±0.02	0.79±0.006
Toplam	2.73±0.05	3.49±0.02	10.27±0.05^{cd}	5.82±0.02

a; p>0.05, c; p<0.01, cd; p<0.0001

3.13. Bitki Ekstraktlarının *Kluveromyces lactis*' in Glutasyon Miktarı Üzerine Etkisi

Maya kültürü glutasyon miktarı sonuçlarına göre, kontrol grubuna kıyasla FR grubunda glutasyon miktarının kısmi azaldığı belirlendi (p<0.05). Kontrol grubu ile ekstrakt grupları karşılaştırıldığında, ekstrakt gruplarında kontrol grubunun üzerinde glutasyon miktarı saptandı (p<0.05, p<0.0001) (Şekil 21)

Yapılan spektrofotometrik analizler sonucu FR eklenmeyip sadece bitki ekstraktı eklenen *Kluveromyces lactis* kültürlerinde glutasyon miktarı ölçülemedi.

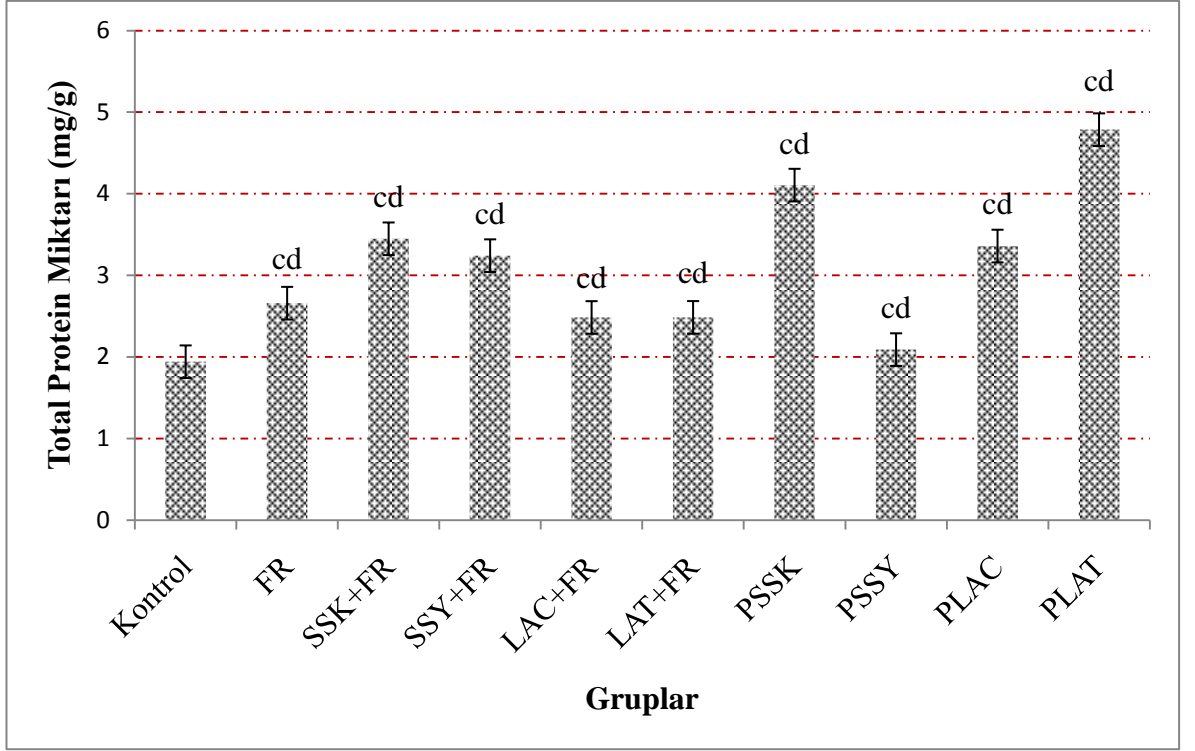


Şekil 21. Bitki ekstraktlarının *Kluveromyces lactis*'in glutasyon miktarı üzerine etkisi (mg/g).

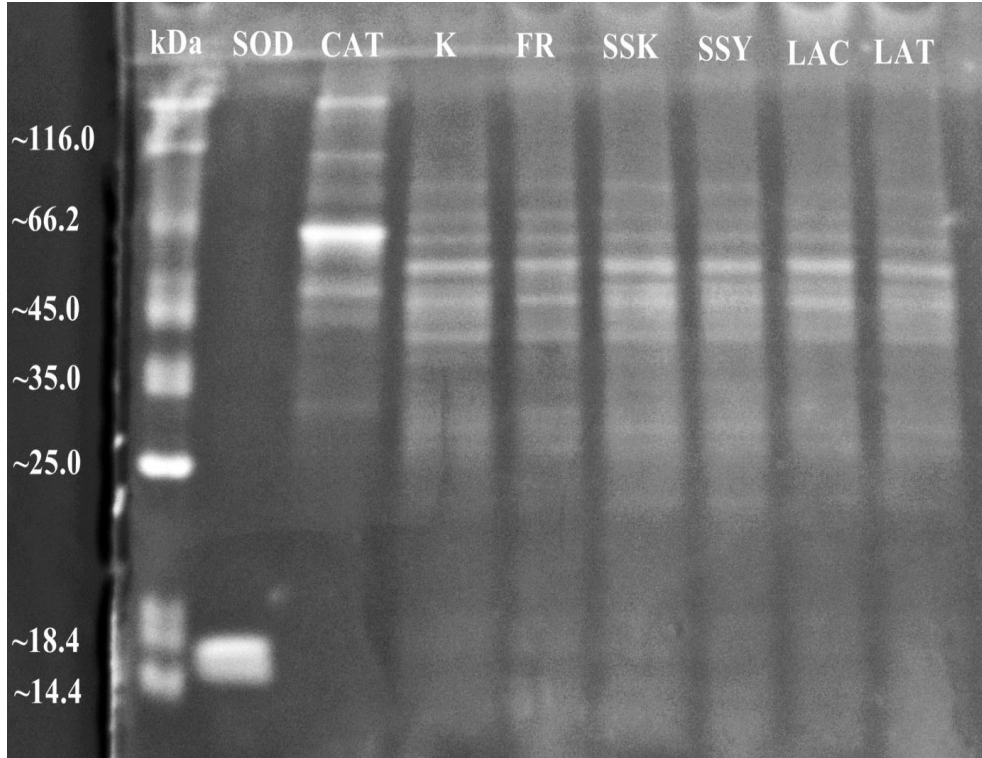
b; p<0.05, cd; p<0.0001

3.14. Bitki Ekstraktlarının *Kluveromyces lactis*' in Total Protein Miktarı Üzerine Etkisi

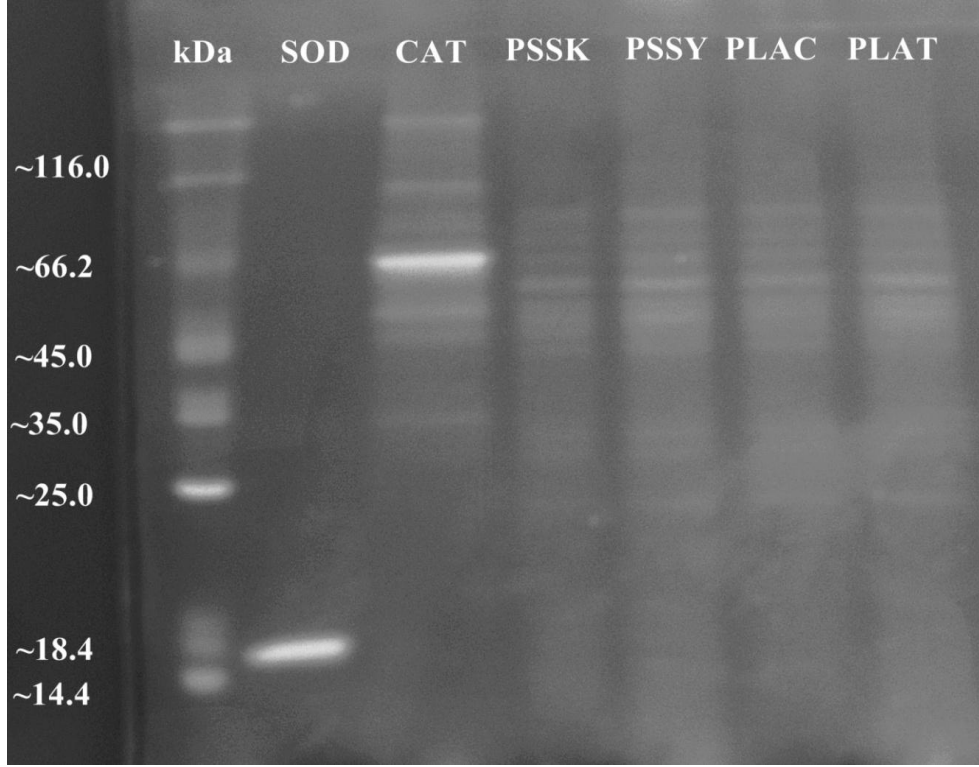
Maya hücrelerindeki total protein miktarı sonuçlarına göre, kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda önemli düzeyde yüksek protein bulundu ($p<0.0001$) (Şekil 22). FR grubu ile ekstrakt grupları karşılaştırıldığında, LAC+FR, LAT+FR ve PSSY gruplarında düşük düzeyde protein belirlenirken ($p<0.0001$), diğer ekstrakt gruplarında ise oldukça yüksek miktarda protein ölçüldü ($p<0.0001$). Ekstrakt grupları total protein miktarı açısından kendi aralarında kıyaslandığında, PLAT grubunun diğer gruplardan daha yüksek protein içeriğine sahip olduğu görüldü (Şekil 22).



Şekil 22. Bitki ekstraktlarının *Kluveromyces lactis*'in total protein miktarı üzerine etkisi (mg/g).
cd; $p < 0.0001$



Şekil 23. *Kluveromyces lactis*'in SDS-PAGE görüntüsü (a).



Şekil 24. *Kluveromyces lactis*'in SDS-PAGE görüntüsü (b).

Şekil 23, 24'deki jel görüntüleri değerlendirilirse; Jelde 1 numaralı bant standart protein markırı, 2 ve 3 nolu bantlar enzim standartlarını içermektedir. Kontrole göre SOD miktarı gruplar arasında değerlendirilecek olursa, bütün grupların oldukça zayıf ekspresyon düzeyine sahip olduğu anlaşılmaktadır. CAT bandı kontrole kıyasla; FR, SSK, SSY, LAC ve LAT gruplarında kısmi belirginlik gösterirken, diğer ekstrakt gruplarında ise oldukça zayıf bir bantlaşma görülmektedir. Bantların belirginlik düzeyi protein ekspresyon miktarı ile paralellik gösterir.

3.15. Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktivitesi

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi ortalama inhibisyon zonu (mm) olarak değerlendirildi (Tablo 9). Bütün bitki grupları *Escherichia coli* ve *Bacillus megaterium* üzerinde farklı zonlarda antimikrobiyal etki gösterirken, *Klebsiella pneumoniae* üzerine hiçbir bitki ekstraktı etki göstermedi. *Staphylococcus aureus* mikroorganizmasında SSK ve LAT bitki grupları etkili olurken SSY ve LAC gruplarında ise inhibisyon zonu oluşmadı.

Candida albicans patojen mayası üzerine bitki gruplarından sadece SSY'nin antimikrobiyal aktivitesi gözlemlendi.

Tablo 9. Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi (mm zon).

	SSK	SSY	LAC	LAT
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	0	0	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus megaterium</i>	9	8	14	11
<i>Escherichia coli</i>	11	16	17	20
<i>Candida albicans</i>	0	11	0	0

4. TARTIŞMA

Dünyada 170'den fazla türü bilinen *Scorzonera* cinsi (Asteraceae) Orta Asya ve Orta Avrupa'ya yayılmış durumdadır [43]. Bu cinsin bazı türleri sebze olarak kullanılır. Birkaç *Scorzonera* türü infertilite, akciğer ödemi, ishal, zehirli ülserin tedavisinde kullanılmakla beraber antihelmint, antiromatizmal, analjezik ve diüretik olarak halk arasında kullanılmaktadır [43,119,120]. Avrupa'da sebze olarak kültürü yapılan, ülkemizde de halk arasında gerek sebze gerekse tıbbi amaçla kullanılan *Scorzonera* türleri üzerine yapılan bilimsel çalışmaların azlığı dikkat çekmektedir. Mevcut çalışmalar bu türün sistematik yerinin belirlenmesi ve analjezik etkisinin gösterilmesi yönündedir.

***In vitro* Ortamda Bitki Ekstraktlarının Etkisi**

Çalışma sonucunda *Scorzonera* türlerinin fitokimyasal bileşikleri ortaya konuldu. Flavonoid analizi sonuçlarına göre örneklerde; rutin, mirisetin, morin, kuarsetin, kamferol ve naringenin farklı miktarlarda belirlendi. Fakat hiçbir bitki türünde resveratrole rastlanmadı. Toplam flavonoid miktarı *S. suberosa*' da diğer bitkilere göre oldukça yüksek bulundu.

Scorzonera türlerinin fitokimyasal içeriğini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda; flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar, bibenzil türevleri, kava laktonlar, triterpenler, seskiterpen, seskiterpen laktonlar ve steroller gibi geniş bir bileşik grubuna rastlanmıştır [34-36,43,121-133].

S. columnae' den flavonoid yapısında ki apigenin, luteolin, karsetol ve karsetol-3-(6''kafeil)-galaktozit bileşiklerini izole edilmiştir [35].

S. divaricata ve *S. pseudivaricata* bitkilerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakdan apigenin, izoviteksin-4'-*O*-glukozit, izoviteksin-2'-*O*-ksilozit, kemferol-3-*O*-rutozit; *S. pseudivaricata*'dan ise izoviteksin-2''-*O*-ksilozit, luteolin, luteolin-7-lukozit, luteolin-5-glukozit izole edilmiştir [43].

S. austriaca'dan flavonoid yapısındaki luteolin-3'-(6-*E-p*-kumaroil- β -Dglukopiranozit) bileşiği belirlenmiştir [122].

Scorzonera cinsine ait dokuz taksonda (*S. austriaca* Willd. var. *angustifolia*; *S. crispatula* Boiss. ; *S. graminifolia* L.; *S. hirsuta* L.; *S. hispanica* L.; *S. laciniata* L.; *S. mollis* M.Bieb.; *S. pseudolanata* Grossb.; *S. pusilla* Pall.) flavonoid olarak; apigenin,

luteolin, kamferol ve kuarsetin belirlenmiştir. Kuarsetin ve kamferol kompozisyonlarının bütün taksonlarda yüksek miktarda saptanmıştır [133].

Yaptığımız çalışmada elde edilen bulgular literatürle paralellik göstermektedir. Mevcut çalışmalarda *Scorzonera* türlerine ait örneklerde resveratrol içeriği rapor edilmemiştir. Ayrıca bitki örneklerimizde kuarsetin ve kamferol miktarları diğer flavonoidlere kıyasla daha fazla bulunmuş ve bu sonuç mevcut çalışmalarda da belirtilmiştir.

Son yıllarda özellikle epidemiyolojik çalışmalar flavonoid içeriği bakımından zengin bir beslenmenin, koroner kalp hastalıkları ve kanser riskini azalttığını göstermektedir [134,135]. Flavonoid içeriği bitkiden bitkiye göre hatta aynı bitkinin farklı kısımlarında bile değişiklik gösterir [136]. Flavonoid içeriği bakımından zengin bir beslenmenin A ve C vitaminlerinden bile daha güçlü antioksidan etkiye sahip olduğu düşünülmektedir [137].

Scorzonera türleri üzerine yapılan fitosterol içeriği belirlemeye yönelik çalışmalar oldukça azdır. *Scorzonera columnae*'da β -sitosterol izole edilmiştir [35]. Aynı fitosterol bileşiği *S. hispanica*'da da tespit edilmiştir [37]. *S. tomentosa*'dan β -sitosterol ile stigmasterol-3-O- β -glikozit bileşikleri saptanmıştır [34].

Scorzonera undulata ssp. *deliciosa*'in gölgede kurutulan kök kısımlarının ekstraktında β -Amirin asetat, metil oleat, metil ursolat, stigmasterol, β -Sitosterol, kumarin-O- β -glikozit ve asteosid izole edilmiştir [138].

Yaptığımız analizler sonucu literatürler de belirtilen fitosterol türevlerine ek olarak ergosterol de belirlenmiştir. Mevcut çalışmalarda *Scorzonera* türleri içerisinde ergosterol tespit edilmemiştir.

Günde 2g diyet yoluyla alınan bitki sterollerinin plazma LDL kolesterol düzeyi ve apolipoprotein B (ApoB) seviyelerinde önemli azalmalar gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada LDL oksidasyon seviyesinin de azaldığı rapor edilmiştir [139].

Diğer bir araştırmada ise diyetle alınan fitosterollerin serbest radikallerin neden olduğu plazma lipid peroksidasyon seviyesini düşürdüğü belirtilmiştir [140].

On gönüllü adaydan alınan kan örneklerinin plazma kısımları bakır ile indüklenip LDL lipid oksidasyonu oluşturulmuş, bu oksidasyon üzerine stigmasterol, β -sitosterol ve kampesterolün antioksidan etkisi araştırılmıştır. Ayrıca sterollerin DPPH radikal temizleme aktivitesi de belirlenmiştir. Sonuç olarak fitosterollerin LDL lipid oksidasyonunu azalttığı, fakat DPPH radikal temizleme aktivitelerinin olmadığı rapor edilmiştir [141].

Oksidatif strese karşı fitosterollerin koruyucu etkisi hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla desteklenmiştir [142,143].

Bitki örneklerimizde lipofilik vitamin analizi sonucu K, D, retinol ve α -Tokoferol belirlendi. Her üç türde D vitamini diğer vitaminlere oranla daha yüksek düzeyde bulundu. Gruplarda ki K vitamini, retinol ve α -Tokoferol miktarlarına kıyasla oldukça yüksek oranda belirlendi. Toplam vitamin miktarı türler arasında kıyaslandığında, *S. suberosa*'nın *S. laciniata* ve *S. latifolia*'ya oranla vitamin içeriğinin fazla olduğu saptandı.

Şimdiye kadar *Scorzonera* türlerine ait vitamin değerlerini belirten literatürler çok az bulunmaktadır. *S. hispanica*'da vitamin B₁, B₂ kompleksleri ile C vitamini bulunduğu vurgulanmaktadır [144]. Vitaminlerin antioksidan ve prooksidan özelliklerini belirten çalışmalar oldukça fazladır. Bu çalışmaların büyük bir kısmı vitamin E ve C üzerine yoğunlaşmıştır. Bitki örneklerimizin vitamin kompozisyonu dikkate alınarak yaptığımız lipid peroksidasyon çalışmalarında bu bileşiklerin antioksidan etkilerinin öne çıktığını düşünmekteyiz.

Likopen, vitamin E, vitamin C ve β -karoten'in DPPH serbest radikal süpürücü etkileri test edilmiş ve bu bileşiklerin yüksek etki gösterdiği belirtilmiştir [145].

Retinol, metil linoleat solüsyonunda ve fosfatidilkolin lipozom modelinde peroksidasyonu önleyerek iyi bir peroksil radikal temizleme özelliği göstermiştir [146].

Streptozotosin verilerek diyabet oluşturulan sıçanların karaciğer dokularındaki süperoksit radikal düzeyinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. E vitamini verilen gruplarda ise karaciğer süperoksit radikal konsantrasyonu doza bağımlı olarak azalma göstermiştir [147].

Bir çalışmada, günde 100 IU vitamin E uygulanan Tıp 1 diyabetik çocukların eritrosit MDA seviyesi kontrole kıyasla düşüş göstermiş ve eritrosit glutasyon seviyesinin ise arttığı saptanmıştır [148].

Bitkilerin yapılan şeker analizi sonucunda arabinoz, fruktoz, glukoz, sakkaraz ve maltoz belirlenmiştir. Asteraceae familyasının üyeleri ağırlıklarının %12-16'sını proteinler ve karbonhidratlar oluşturur [149]. Şuana kadar *Scorzonera* türleri üzerine şeker kompozisyonu çalışılmamıştır.

Tüm bu analizlere ek olarak çalışmamızda *Scorzonera* türlerinin antioksidan kapasitesi DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. *Scorzonera* türlerinin yaprak kısımlarından elde edilen ekstraktların artan konsantrasyonlara bağlı olarak yüksek

antioksidan etki gösterdiği saptandı. Fakat *S. suberosa*'nın kök kısmından elde edilen ekstraktın oldukça düşük antioksidan etki gösterdiği belirlendi.

Scorzonera divaricata ve *Scorzonera pseudodivaricata*'dan izole edilen feruloilpodospermic asit A ve B'nin DPPH serbest radikal temizleme etkisinin artan konsantrasyonlara paralel olarak arttığı belirtilmiştir [43].

Scorzonera radiata'nın toprak üstü kısımlarından izole edilen beş yeni dihidrostilben (skorzodihidrotilben A-E) bileşiğinin antioksidan özellikleri DPPH kullanılarak belirlenmiş ve bu bileşiklerin yüksek antioksidan özellik gösterdiği rapor edilmiştir [42].

Scorzonera undulata ssp. *deliciosa*'nın köklerinden elde edilen ekstraktın DPPH serbest radikal temizleme aktivitesininin doza bağımlı olarak arttığı tespit edilmiştir [138].

Yapılan diğer çalışmalar doğrultusunda, çalışmamızda kullandığımız türlerinde DPPH serbest radikali üzerine antioksidan etki gösterdiği belirlendi. Bu etkinin ortaya çıkmasında bitkilerin içerdiği flavonoidlerin, fitosterollerin ve vitaminlerin etkili olduğu sonucuna varıldı. Özellikle flavonoid bileşikler kimyasal yapı bakımından güçlü antioksidan özellik gösterirler. Flavonoidlerin kimyasal yapısındaki OH[•] gruplarının fazlalığı ve yerleşim merkezleri bu bileşiklerin antioksidan özelliklerini ön plana çıkarmaktadır. Yapıda bulunan OH[•] grubundaki hidrojen donör olarak görev yapmakta ve başta hidroksil radikali olmak üzere peroksil ve peroksinitrit radikalleri gibi zararlı molekülleri kararlı hale getirmektedir.

Antimikrobiyal Aktivite

Bitki ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi değerlendirildiğinde, bütün bitki gruplarının *Escherichia coli* ve *Bacillus megaterium* üzerinde etkili oldukları gözlemlenirken, *Klebsiella pneumoniae* üzerine hiçbir ekstraktın etkisi belirlenmedi. Antifungal aktivite sadece SSY grubunda tespit edildi.

S. latifolia ve *S. veratrifolia*'nın farklı çözücülerde hazırlanan ekstraktlarının; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* ve *Candida albicans* kültürlerinde ki antimikrobiyal aktivite çalışmasında, her iki türün de *Staphylococcus aureus*'a karşı yüksek etki gösterdiği belirlenmiştir [150].

Scorzonera undulata'nın kök ve toprak üstü kısımlarının farklı çözenlerdeki ekstraktlarının antimikrobiyal etkisinin araştırılmasında kullanılan; *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Citrobacter freundii*

üzerine etkili olduğu fakat, *Escherichia coli*'nin gelişmesini engellemediği saptanmıştır. Ayrıca toprak üstü kısımların kök kısımlarına kıyasla daha yüksek antimikrobiyal ve antifungal etki gösterdiği belirlenmiştir [151].

S. sandrasica'nın farklı çözücülerde hazırlanan ekstraktlarının antibakteriyal etkisi tespit edilmesine rağmen, antifungal aktivitesi belirlenmemiştir [41].

Scorzonera mollis'in farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan ekstraktların; *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris* bakteri kültürlerinin gelişmelerini farklı oranlarda engellemiştir. *Candida albicans*'ın gelişmesini sadece bitkinin yaprak kısımlardan elde edilen ekstraktların engellediği rapor edilmiştir [44].

Yaptığımız çalışmalar sonucunda literatürlerde yer alan sonuçlara paralel bulgular elde ettik. Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite bitki türlerine göre farklılık göstermektedir. Ayrıca antifungal aktivite sadece SSY grubunda gözlenmesi literatürde belirtilen bulgular ile desteklenmektedir.

Anaerobik Kültür Ortamda Bitki Ekstraktlarının Etkisi

Bitki ekstraktlarının probiyotik maya kültürleri üzerine etkileri bazı biyokimyasal analizler yapılarak araştırıldı. Öncelikli olarak oksidatif strese maruz bırakılan maya kültürlerindeki lipid peroksidasyon miktarı ve lipid kompozisyonu incelendi. Sonrasında ise kültürlerin toplam protein miktarları ve glutatyon düzeyleri analiz edildi.

Debaryomyces hansenii kültüründe yapılan analizler sonucu $FeCl_2+H_2O_2$ eklenen gruplarda lipid peroksidasyon miktarı belirgin düzeyde artış gösterdi. *Kluveromyces lactis* kültüründe ise kontrole kıyasla FR grubunda azalma, diğer gruplarda ise yüksek artışlar kaydedildi. Bu farklı bulguların nedeni olarak mikroorganizmaların serbest radikal hasarlarına karşı farklı ölçülerde direnç gösterdiklerini düşünmekteyiz.

Maya kültürü oksidatif stres çalışmaları genellikle *Saccharomyces cerevisiae* üzerine yoğunlaşmıştır. Bu mikroorganizma üzerine yapılan çalışmalar referans olarak kabul edilmektedir. Fakat maya hücrelerinin fizyolojik yapısı farklılıklar göstermektedir. Navarrete ve ark. bir çalışmalarında referans kabul edilen *S. cerevisiae*'ya kıyasla *Debaryomyces hansenii*'nin kadmiyum klorür ve hidrojen peroksit karşı daha duyarlı olduğu sonucuna varmışlardır [152]

Uzun zamandan beri süperoksit anyonunun biyolojik membranlar üzerinde yer alan anyon kanalları aracılığıyla, hidrojen peroksitin ise serbestçe geçtiği düşünülmekteydi

[153]. Fakat daha sonra yapılan araştırmalarda ise bu dūřüncenin yanlış olduğu anlaşıldı. Seaver ve Imlay yaptıkları bir çalışmayla H₂O₂'nin *Escherichia coli* plazma membranından serbestçe geçemediğini belirlemişlerdir [154]. Jurkat-T hūcrelerinin sitoplazmik ve peroksizomal membranlarından olası H₂O₂ geçirgenliğinin değerlendirilmesinde, biyomembranların radikal geçirgenliğine direnç gōsterdiđi rapor edilmiştir [155].

S. cerevisiae ūzerine yapılan bir çalıřmada H₂O₂'in hūcre permabilitesini etkilediđi ortaya konulmuřtur [156]. Maya hūcreleri kararlı durumda H₂O₂ ile muamele edildiđi zaman iletim sisteminde glukoz oksidaz yerine L-α-amino asit oksidaz kullanır. Sabit fazda hūcrelerin H₂O₂ geçirgenliđi 5 kat daha azdır. Geçirgenliđin miktarı membranların kompozisyonuna bađlı olarak deđerismektedir.

S. cerevisiae hūcrelerinin H₂O₂ konsantrasyonuna bađlı olarak farklı tepkiler verdiđi, dūřük konsantrasyondaki H₂O₂'ye karřı adaptasyon gōstermesine karřın yūksek miktardaki H₂O₂'ye karřı direnç ortaya koyduđu belirlenmiřtir [157]. Būtūn bu bulgular hūcre membranlarının radikallere karřı bir bariyer oluřturduđunu gōstermektedir.

Hidrojen peroksite karřı hūcre membranının potansiyel geçirgenliđi ūzerine FAS1 geni tarafından kodlanan yađ asidi sentezinin rolū incelenmiřtir. Maya hūcresinin H₂O₂'ye karřı yađ asidi sentez aktivitesini arttırdıđı, membran yađ kompozisyonunda ki bu artıřın H₂O₂ geçirgenliđinin azalmasına ve canlılık halinin uzamasına neden olduđu belirtilmiřtir [158]. Mayanın gōsterdiđi bu direnç ūzerine bir diđer hipotez ise *Schizosaccharomyces pombe* ūzerinde yapılan çalıřma ile ileri sūrūlmūřtūr. Bu alıřma ile ergosterol sentez yolundaki bir genin (ERG3 ya da ERG6) delesyonu ile toplam sterol seviyesinin azalmasıyla membran sterol bileřiminin deđeriserek mayanın H₂O₂' ye karřı daha dirençli hale gelebildiđi ileri sūrūlmūřtūr [159].

Literatūrde belirtilen bu bulguların yaptığımız çalışma ile paralellik gōsterdiđini sōyleyebiliriz. Deneysel alışmamızda inkubasyonun 24. saatinde eklenen radikallere karşı maya hūcrelerinin canlılık aktivitesinde herhangi bir değerisim olmadığı gibi radikal hasarlarına karşıda direnç gōsterdiđi sonucuna varıldı.

Bitki ekstraktlarının *Debaryomyces hansenii*'nin yađ asidi profili ūzerine etkileri oldukça farklılık gōstermiřtir. Analizler sonucu 18:1 yađ asidinin kontrole kıyasla būtūn gruplarda azaldıđı belirlenmiřtir. 18:2 yađ asidinin LAC+FR, PLAC ve PSSY gruplarında az miktarlarda arttıđı, diđer gruplarda ise ūnemli dūzeylerde azaldıđı belirlendi. 18:3 yađ asidi miktarının kontrole kıyasla FR ve PSSK gruplarında azaldıđı belirlenirken, diđer gruplarda ise arttıđı tespit edildi.

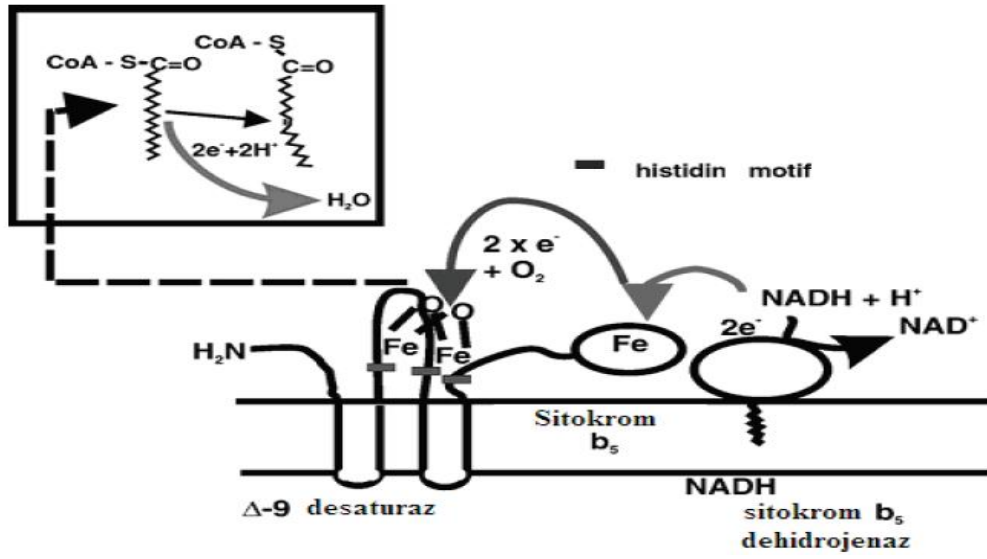
Kluveromyces lactis'in yağ asidi kompozisyonu incelendiğinde palmitik asit miktarının SSY+FR grubunda azaldığı, buna karşın diğer gruplarda yüksek düzeyde arttığı belirlendi. 18:1, 18:2 ve 18:3 yağ asidi miktarlarında ise kontrole kıyasla bütün gruplarda artış görüldü.

Bütün bu sonuçlar göz önüne alındığında, bitki ekstraktlarının içeriği ve radikal moleküllerin maya hücreleri ile etkileşimi farklı biyokimyasal süreçleri ortaya çıkarmaktadır. Farklı tür bitkilerin besin içeriğine bağlı olarak mikroorganizmaların kullandığı karbon kaynaklarında değişkenlik göstermektedir. Besin maddelerindeki karbon kaynaklarının farklılık göstermesi yağ asidi sentezinden sorumlu biyomoleküllerin aktivitelerini doğrudan ve ya dolaylı olarak etkileyebilmektedir. Sonuç olarak bu etkileşim sentezlenen yağ asidi miktarlarında farklılık oluşmasına neden olmaktadır.

Maya hücrelerindeki tekli doymamış yağ asidi sentezinin Δ^9 desaturaz tarafından gerçekleştirildiğini rapor edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'da desaturaz geni OLE1'in farklı karbon kaynağı, metal iyonları ve oksijen miktarına bağlı olarak farklı uyarıların gen ekspresyonunu etkilediği sonucuna varılmıştır [160]. Çünkü membran yağ asidi kompozisyonu doğrudan veya dolaylı olarak çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Ayrıca hücrenin yağ asidi profilinin, gelişme ortamında bulunan karbon kaynağına bağlı olarak da değişim gösterdiği ifade edilmiştir [161,162].

Saccharomyces cerevisiae'nın yağ asidi içeriğini; nitrojen kaynaklarının, gelişme ortamı içeriğinin ve çevresel şartların etkilediği belirtilmiştir [163]. Bu düşüncenin temelinde ise; plazma membranının mayanın içinde bulunduğu çevre ile temas kuran ilk hücre kısmı olmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Bir araştırmada ise sıcaklık, oksijen ve besin sınırlanması gibi çevresel faktörlerden *Saccharomyces cerevisiae*'nın açık bir şekilde etkilendiği görülmüştü. Hücre plazma membranında bazı adaptasyonların oluştuğu belirlenmiş ve bu değişikliklerin lipid bileşimindeki modifikasyonlarla açıklanabileceği ileri sürülmüştür [164].

Maya hücrelerindeki 18:1, 18:2 ve 18:3 yağ asit miktarlarının reaktif eklene gruplarda yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak bu yağ asitlerinin sentezinden sorumlu olan enzimler üzerinde demir iyonunun aktive edici etkisi olabileceğini söyleyebiliriz (Şekil 25). Mayalarda doymamış yağ asitlerinin sentezi üzerine yapılan bir çalışmada bu iyonun özellikle Δ^9 desaturaz üzerine katalizör etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir [160].



Şekil 25. Δ^9 yağ asidi desaturaz enziminin redoks bileşenleri.

Debaryomyces hansenii'nin glutasyon miktarı kontrole göre SSY+FR grubunda düşük bulunurken PSSY, PLAC ve PLAT gruplarında ise bir farklılık belirlenmedi. FR ve FR+ekstrakt gruplarında ise glutasyon seviyesinin arttığı belirlendi. *Kluveromyces lactis*'in glutasyon miktarı analiz sonuçları incelendiğinde kontrole kıyasla FR+ekstrakt gruplarında artış gözlemlenirken, sadece FR verilen grupta kontrolün altında glutasyon belirlendi. Sadece ekstrakt verilen gruplarda glutasyon miktarı spektrofotometrik ölçümler sonucu belirlenemedi. Bu durumun, bitki örneklerinin flavonoid, fitosterol ve vitamin değerleri ile mikroorganizmaların farklı biyokimyasal yapılarından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bitki örneklerinin toplam flavonoid, fitosterol ve vitamin değerliği göz önüne alındığı zaman SSY grubunun diğer gruplara kıyasla bu bileşikleri fazla miktarda bünyesinde bulundurduğu tespit edilmektedir. Flavonoidlerin, kültür ortamına ilave edilen radikalleri erken safhada inhibe ederek oksidatif hasarı en az düzeye indirdiğini düşünmekteyiz.

Saccharomyces cerevisiae kültürüne 1 mM parakuat ilavesi sonrasında antioksidan enzim düzeyleri araştırılmış ve SOD miktarının arttığı rapor edilmiştir [165].

Kadmiyum klorid (KD) ve 1,4-dithiothreitol (DTT) ilavesiyle oluşturulan oksidatif stres sonrasında, *D. hansenii* ve *S. cerevisiae*'nin bazı biyokimyasal parametreleri ile direnç düzeyleri araştırılmıştır. *D. hansenii*'nin gelişme ortamına eklenen KD ve DDT sonrası, hücrenin glutasyon miktarında artış belirlenmiştir. Buna karşın *S. cerevisiae*'nin gelişme ortamına eklenen DTT bu organizmanın glutasyon sentezini arttırırken, KD'nin ise sentez üzerinde bir etki sağlamadığı rapor edilmiştir [152].

Hidrojen peroksit ve parakuat ilavesi ile oluşturulan oksidatif stres sonucu *Kluyveromyces marxianus*'un antioksidan enzim düzeyleri ve farklı hava basınçları altında organizmanın canlılık düzeyleri test edilmiştir. Sonuç olarak 1.2 ve 6 bar basınç altında SOD, CAT ve glutatyon redüktaz miktarlarının kimyasal maddelerin eklenmesinden sonra arttığı belirlenmiştir. Basıncın artması ile enzim düzeylerinde ki değişiminde incelendiği çalışmada, artan basınca paralel olarak enzim miktarlarının arttığı fakat bu miktarın zamana bağlı olarak düşüş gösterdiği tespit edilmiştir [166].

Bütün bu bulgular bize mikroorganizmaların sentezlediği protein düzeyinin farklı çevre koşulları altında değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Buna ek olarak oksidasyonun ilerleyen zamana bağlı olarak mikroorganizma tarafından tolere edildiğini de göstermektedir. Yani akut fazdaki oksidasyonda protein sentez hızı artarken ilerleyen zaman sürecinde ekspresyonun azaldığı belirlenmiştir [166].

Kluyveromyces marxianus'un yüksek doz kimyasal maddelere (50 mM H₂O₂, 1 mM parakuat) ve yüksek basınca (1.2-6 bar) karşı (%68-95) oranla canlılığını belirtmektedir [166]. Bu sonuçlar *Kluyveromyces*' in hem yüksek doz kimyasallara karşı hem de olumsuz çevre koşulları altında yüksek direnç gösterdiğini ispat etmektedir

Bir başka çalışmada ise 40 mM H₂O₂ ilavesinden 1 saat sonra *Schizosaccharomyces pombe* hücrelerinin %10'undan azının hayatta kaldığı tespit edilmiştir [167].

Literatürde belirtildiği üzere farklı mikroorganizmaların değişken radikal ve çevre koşulları altında fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri farklılık göstermektedir. Ayrıca oksidatif stresin ilerleyen zamana bağlı olarak giderildiğini de yapılan çalışmalar sonucu görmekteyiz. Yaptığımız analizler sonucu düşük glutatyon miktarının ölçülmesinde inkübasyon zamanının rolü olabileceğini düşünmekteyiz. Buna ek olarak mikroorganizmaların farklı toksik elemanlara karşı oluşturdukları direncin türe özgü olduğunu kanısına varmaktayız.

Maya kültürlerinin toplam protein miktarı, glutatyon miktarları gibi farklılık göstermektedir. *D. hansenii* kültüründe kontrole kıyasla diğer grupların protein miktarlarında azalmalar tespit edilmiştir. *K. lactis* kültüründe ise kontrole kıyasla FR ve ekstrakt gruplarında protein miktarının arttığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız maya kültürlerinin, glutatyon, total protein ve MDA miktarları dikkate alındığında, *K. lactis*'in *D. hansenii*'ye kıyasla serbest radikal hasarlarına karşı daha dirençli olduğu kanısına varmaktayız. Ayrıca *S. cerevisiae*'ye

kıyasla *D. hansenii*'nin çevresel etkilere ve oluşabilecek stres koşullarına daha az dayanıklı olduğu ilgili literatürde belirtilmektedir [152].

Her iki maya türünün de toplam protein miktarı ile MDA seviyeleri incelendiğinde, FR ve FR+ekstrakt gruplarında bu iki parametrenin ters ilişki içerisinde olduğu görülmektedir. T-2 toksin maddesini kullanarak indüklenen lipid peroksidasyonu sonucu, *Kluyveromyces marxianus*'un MDA ve protein miktarının araştırılmasında; MDA miktarındaki artışa zıt olarak toplam protein miktarındaki azalma dikkati çekmiştir. Standart antioksidan verilen gruplarda da bu bulgu devam etmekte olup, ancak MDA miktarındaki artış ile protein miktarındaki azalış düşük seviyelerde seyretmiştir [168]. Bu bulgular toksik öğelerin protein miktarındaki azalmaya neden olabileceğini göstermektedir.

Yaptığımız çalışma sonrasında belirtilen literatürlere benzer sonuçlar elde edildi. Çalışmamızda kullandığımız maya türlerinin radikal ilavesi ile oluşturulan oksidatif strese karşı farklı direnç ve tepkiler gösterdiklerini analizler sonucu gözlemlendi. Ayrıca bitki ekstraktlarının antioksidan madde miktarına bağlı olarak, gerek *in vitro* gerekse aerobik kültür ortamı lipid peroksidasyon düzeylerine değişken ölçülerde etki ettiği sonucuna varıldı.

5. KAYNAKÇA

- [1] **Halliwell, B. and Whiteman, M.,** 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?, *Br. J. Pharmacol.*, **142**, 231-255.
- [2] **Scalbert, A., Manach, C., Morand, C. and Remesy, C.,** 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **45**, 287-306.
- [3] **Scalbert, A. and Williamson, G.,** 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J. Nutr.*, **130**, 73-85.
- [4] **Kris-etherton, P., Hecker, K., Bonanome, A., Coval, S., Binkoski, A. and Hilpert, K.,** 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *Am. J. Med.*, **113**, 71-78
- [5] **Cieřlik, E., Greda, A. and Adamus, W.,** 2006. Contents of polyphenols in fruits and vegetables, *Food Chem.*, **94**, 135-142.
- [6] **Prakash, D. and Gupta, K.R.,** 2009. The antioxidant phytochemicals of nutraceutical importance, *The Open Nutraceuticals Journal*, **2**, 20-35.
- [7] **Arts, I. and Hollman, P.,** 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 317-325.
- [8] **Amić, D., Davidović-amić, D., Beřlo, D. and Trinajstić, N.,** 2003. Structureradical scavenging activity relationships of flavonoids, *Croat. Chem. Acta.*, **76**, 55-61.
- [9] **Pryor, W.A.,** 2000. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free Rad. Bio. Med.*, **28**, 141-164.
- [10] **Burton, G.W., Joyce, A. and Ingold, K.U.,** 1983. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?, *Arch. Biochem. Biophys.*, **221**, 281-290.
- [11] **Wójcicki, J., Rózewicka, L., Barcew-Wiszniewska, B., Samochovec, L., Juzwiak, S., Kadlubowska, D., Tustanowski, S. and Juzyszyyn, Z.,** 1991. Effect of selenium and vitamin E on the development of experimental atherosclerosis in rabbits, *Atherosclerosis*, **87**, 9-16.

- [12] **Ong, G.**, 1996. Periodontal reasons for tooth loss in an Asian population, *J. Clin. Periodontol*, **23**, 307-309.
- [13] **Phipps, K.R. and Stevens, V.J.**, 1995. Relative contribution of caries and periodontal disease in adult tooth loss for an HMO dental population, *J. Pub. Health Dent.*, **55**, 250-252.
- [14] **Stabholz, A., Babayof, I., Mersel, A. and Mann, J.**, 1997. The reasons for tooth loss in geriatric patients attending two surgical clinics in Jerusalem, Israel, *Gerodontology*, **14**, 83-88.
- [15] **Park, K.S., Nam, J.H. and Choi, J.**, 2006. The short vitamin D receptor is associated with increased risk for generalized aggressive periodontitis, *J. Clin. Periodontol*, **33**, 524-528.
- [16] **Krall, E.A.**, 2006. Osteoporosis and the risk of tooth loss, *Clin. Calcium*, **16**, 287-290.
- [17] **Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H.**, 2004. Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030, *Diabetes Care.*, **27**, 1047-1053.
- [18] **Bourlon, P.M., Billaudel, B. and Faure-Dussert, A.**, 1999. Influence of vitamin D3 deficiency and 1,25 dihydroxyvitamin D3 on de novo insulin biosynthesis in the islets of the rat endocrine pancreas, *J. Endocrinol*, **160**, 87-95.
- [19] **Mohr, S.B., Garland, C.F., Gorham, E.D. and Garland, F.C.**, 2008. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide, *Diabetologia*, **51**, 1391-1398.
- [20] **Mathieu, C. and Badenhop, K.**, 2005. Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art, *Trends Endocrinol Metab.*, **16**, 261-266.
- [21] **Zippitis, C.S. and Akobeng, A.K.**, 2008. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *Arch. Dis. Child*, **93**, 512-517.
- [22] **Peechakara, S.V. and Pittas, A.G.**, 2008. Vitamin D as a potential modifier of diabetes risk, *Nat. Clin. Pract. Engocrinol Metab.*, **4**, 182-183.

- [23] **Brown, J., Bianco, J.I., McGrath, J.J. and Eyles, D.W.**, 2003. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons, *Neurosci. Lett.*, **343**, 139-143.
- [24] **Burkert, R., McGrath, J. and Eyles, D.**, 2003. Vitamin D receptor expression in the embryonic rat brain, *Neurosci. Res. Commun.*, **33**, 63-71.
- [25] **Eyles, D., Brown, J., Mackay-Sim, A., McGrath, J. and Feron, F.**, 2003. Vitamin D3 and brain development, *Neuroscience*, **118**, 641-653.
- [26] **Zhang, R. and Naughton, D.P.**, 2010. Vitamin D in health and disease: current perspectives, *Nutrition J.*, **9**, 65-78.
- [27] **McCann, J.C. and Ames, B.N.**, 2008. Is there convincing biological or behavioral evidence linking vitamin D deficiency to brain dysfunction, *FASEB J.*, **22**, 982-1001.
- [28] **Liu, R.H.**, 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals, *Am. J. Clin. Nutr.*, **78**, 517- 520.
- [29] **Bouic, P.J.**, 2001. The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, **4**, 471-475.
- [30] **Zidorn, C., Ellmerer, E. P., Sturm, S., and Stuppner, H.**, 2003. Tyrollobenzyls E and F from *Scorzonera humilis* and distribution of caffeic acid derivatives, lignans and tyrollobenzyls in European taxa of the subtribe Scorzonerinae (Lactuceae, Asteraceae), *Phytochemistry*, **63**, 61–67.
- [31] **Gao, B. C.**, 1987. The economic flora of Qinghai, pp. 652, Xining: The Qinghai People's Press, China.
- [32] **Fang, F., Sang, S., Chen, K.Y., Gossau, A., Ho, C.T., and Rosen, R.T.**, 2005. Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf (*Laurus nobilis*), *Food Chem.*, **93(3)**, 497–501.
- [33] **Scotti, L., Scotti, M.T., Ishiki, H.M., Ferreira, M.J.P., Emerenciano, V.P., Menezes, C. M., et al.**, 2007. Quantitative elucidation of the structure–bitterness relationship of cynaropicrin and grosheimin derivatives, *Food Chem.*, **105(1)**, 77–83.
- [34] **Öksüz, S., Gören, N. and Ulubelen, A.**, 1990. Terpenoids from *Scorzonera tomentosa*, *Fitoterapia*, **61(1)**, 92-93.

- [35] **Menichini, F. and Statti, G.**, 1994. Flavonoid Glycosides from *Scorzonera columnae*, *Fitoterapia*, **65(6)**, 555-556.
- [36] **Bryanskii, O.V., Tolstikhina, V.V. and Semenov, A.A.**, 1992. Syringaresinol Glycosides from a Tissue Culture of *Scorzonera hispanica*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, **5**, 591-592.
- [37] **Zidorn, C., Ellmerer-Mueller, E.P. and Stuppner, H.**, 2000. Sesquiterpenoids from *Scorzonera hispanica* L., *Pharmazie*, **55**, 550-551.
- [38] **Sari, A.**, 2010. Two new 3-benzylphthalides from *Scorzonera veratrifolia* Fenzl, *Natural Product Research*, **24(1)**, 56-62.
- [39] **Bahadır, Ö., Çitoğlu, G.S., Šmejkal, K., Dall'Acqua, S., Özbek, H., Cvacka, J. and Zemlicka, M.**, 2010. Analgesic compounds from *Scorzonera latifolia* (Fisch. and Mey.) DC., *Journal of Ethnopharmacology*, **131**, 83–87.
- [40] **Boussaada, O., Saidana, D., Chraif, I., Mahjoub, M.A., Mighri, Z., Daami M. and Helal, A.N.**, 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components of *Scorzonera undulata*, *Journal of Essential Oil Research*, **20(4)**, 358-362.
- [41] **Ugur, A., Sarac, N., Ceylan, O., Duru, M.E. and Beyatli, Y.**, 2010. Chemical composition of endemic *Scorzonera sandrasica* and studies on the antimicrobial activity against multiresistant bacteria, *J. Med. Food*, **13(3)**, **635-639**.
- [42] **Wang, Y., Edrada-Ebel, R., Tsevegsuren, N., Sendker, J., Braun, M., Wray, V., Lin, W. and Proksch, P.**, 2009. Dihydrostilbene derivatives from the Mongolian medicinal plant *Scorzonera radiata*, *J. Nat. Prod.*, **72**, 671-675.
- [43] **Tsevegsuren, N., Edrada, R., Lin, W., Ebel, R., Torre, C., Ortlepp, S., Wray, V. and Proksch, P.**, 2007. Biologically active natural products from Mongolian medicinal plants *Scorzonera divaricata* and *Scorzonera pseudodivaricata*, *J. Nat. Prod.*, **70**, 962-967.
- [44] **Ertürk, Ö. ve Demirbağ, Z.**, 2003. *Scorzonare mollis* Bieb (Compositae) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi, *Ekoloji Çevre Dergisi*, **12(47)**, 27-31.
- [45] **The Local Food-Nutraceuticals Consortium**, 2005. Understanding local mediterranean diets: a multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach, *Pharmacological Research*, **52**, 353–366.

- [46] **Burton, G.J. and Jauniaux, E.,** 2010. Oxidative stress, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 1-13.
- [47] **Paravicini, T.M. and Touyz, R.M.,** 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension, *Diabetes Care.*, **31(2)**, 170-180.
- [48] **Barber, D.A. and Harris, S.R.,** 1994. Oxygen Free Radicals and Antioxidants: A review, *Am. Pharmacy.*, **34(9)**, 26-35.
- [49] **ÇİÇEK, E.,** 2005. Nükleer tıp uygulamalarının hastalardaki serbest radikaller üzerine etkileri, *Doktora Tezi*, S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- [50] **Valko, M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin, T.D., Mazur, M. and Telser J.,** 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *IJBCB*, **39**, 44-84.
- [51] **Cadenas, E. and Davies, K.J.A.,** 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 222–230.
- [52] **Miller, D.M., Buettner, G. R., and Aust, S.D.,** 1990. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions, *Free Radic. Biol. Med.*, **8**, 95–108.
- [53] **Bast, A., Haenen, G.R., and Doelman, C.J.,** 1991. Oxidants and antioxidants: State of the art, *Am. J. Med.*, **91**, 3625-3635.
- [54] **Verma, A.R. Vijayakumar, M. Rao, C.V. and Mathela, C.S.,** 2010. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*, *Food and Chem. Toxicol.*, **48**, 704-709.
- [55] **Cadenas, E., and Sies, H.,** 1998. The lag phase, *Free. Radic. Res.*, **28**, 601–609.
- [56] **Pacher, P., Beckman, J.S. and Liaudet, L.,** 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol Rev.*, **87**, 315–424.
- [57] **Desideri, A. and Falconi, M.,** 2003, Prokaryotic Cu, Zn superoxidies dismutases, *Biochemical Society Transactions*, **31**, 1322–1325.
- [58] **Bektaşoğlu, B.,** 2007. Hidroksil radikal süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite ölçümünde yeni bir yöntem geliştirilmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [59] **Neyens, E. and Baeyens, J.,** 2003. A review of classic Fenton’s peroxidation as an advanced oxidation technique, *J. Haz. Mat.*, 33-50.
- [60] **Dröge, W.,** 2001. Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev.*, **82**, 47-95.

- [61] **Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.**, 1999. Free radicals in biology and medicine, Oxford: Oxford Science Publications.
- [62] **Karbownik, M. and Reiter, R.J.**, 2000. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation, *Exp. Bio. Med.*, **225**, 9-22.
- [63] **Smirnoff, N. and Pallanca, J.E.**, 1995. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress, *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 16.
- [64] **Bolanos, J.P. Moro, M.A. Lizasoain, I. and Almeida, A.**, 2009. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications, *Avdan. Drug Deliv. Revi.*, **61**, 1299-1315.
- [65] **Özşahin, A.D.**, 2010. Malatya yöresine ait bazı üzüm ve kayısı çeşitlerinin fitokimyasal içeriklerine bağlı olarak antioksidan aktivitelerinin araştırılması, *Doktora Tezi*, F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- [66] **Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., and Castro, I.N.**, 1999. Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.*, **32**, 595-603.
- [67] **Ghosh, J. and Myers, C.E.**, 1998. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 13182-13187.
- [68] **Bae, Y.S., Kang, S.W, Seo, M.S., et al.**, 1997. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, **272**, 217-221.
- [69] **Chopra, S. and Wallace, H.M.**, 1998. Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species, *Biochem Pharmacol*, **55**, 1119-1123.
- [70] **Wojtaszek, P.**, 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem J.*, **322**, 681-692.
- [71] **Patterson, R.A. and Leake, D.S.**, 1998. Human serum, cysteine and histidine inhibit the oxidation of low density lipoprotein less at acidic pH, *FEBS Lett.*, **434**, 317-321.
- [72] **Rikans, L.E. and Hornbrook, K.R.**, 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging, *Biochim. Biophys Acta.*, **1362**, 116-127.

- [73] **Scott, M.D., Eaton, J.W., Kuypers, F.A., Chiu, D.T. and Lubin, B.H.**, 1989. Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: effects on cellular oxidant defense, *Blood*, **74**, 2542-2549.
- [74] **Beaudeau, J.L., Gardes-Albert, M., Delattre, J., Legrand, A., Rousselet, F. and Peynet, J.**, 1996. Resistance of lipoprotein(a) to lipid peroxidation induced by oxygenated free radicals produced by gamma radiolysis: a comparison with low-density lipoprotein, *Biochem. J.*, **314**, 277-284.
- [75] **Hall, L., Williams, K., Perry, A.C.F., Frayne, J. and Jury, J.A.**, 1998. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract, *Biochem. J.* **333**, 5-9.
- [76] **Jankowska, R., Passowicz-Muszynska, E., Banas, T., Marcinkowska, A. and Medrala, W.**, 1994. The influence of vitamin A on production of oxygen free radicals and activity of granulocyte catalase in patients with chronic bronchitis, *Pneumonol Alergol Pol.*, **62**, 628-633.
- [77] **Stait, S.E. and Leake, D.S.**, 1996. The effects of ascorbate and dehydroascorbate on the oxidation of low-density lipoprotein, *Biochem. J.*, **320**, 373-381.
- [78] **Aleryani, S., Milo, E., Rose, Y. and Kostka, P.**, 1998. Superoxidemediated decomposition of biological S-nitrosothiols, *J. Biol. Chem.* **273**, 6041-6045.
- [79] **Brouwer, M. and Brouwer, T.H.**, 1998. Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **351**, 257-264.
- [80] **Mao, G.D., Thomas, P.D., Lopaschuk, G.D. and Poznansky, M.J.**, 1993. Superoxide dismutase (SOD)-catalase conjugates. Role of hydrogen peroxide and the Fenton reaction in SOD toxicity, *J. Biol. Chem.*, **268**, 416-420.
- [81] **Sohal, R.S., Agarwal, A., Agarwal, S. and Orr, W.C.**, 1995. Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 15671-15674.
- [82] **Erden, M.**, 1992. Serbest radikaller, *T. Klin. Tip Bil.*, **12**, 201-207.
- [83] **Scalbert, A., Johnson, I.T. and Saltmarsh, M.**, 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond, *Am. J. Clin. Nutr.*, **81**, 215-217.

- [84] **Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jimenez L.,** 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**, 727-747.
- [85] **Scalbert, A. and Williamson, G.,** 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J. Nutr.*, **130**, 2073-2085.
- [86] **D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. and Masella, R.,** 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Ann Ist Super Sanità*, **43(4)**, 348-361.
- [87] **Brouillard, R. and George, F.,** 1997. Fougèrouse A. Polyphenols produced during red wine ageing, *Biofactors*, **6**, 403-410.
- [88] **Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D. and Drilleau, J.P.,** 1999. Polyphenol profiles of French cider apple varieties (*Malus domestica sp.*), *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4847-4853.
- [89] **DuPont, M.S., Mondin, Z., Williamson, G. and Price, K.R.,** 2000. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3957-3964.
- [90] **Friedman, M.,** 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1523-1540.
- [91] **Clifford, M.N.,** 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates. Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1033-1043.
- [92] **Pandey, K.B. and Rizvi, S.I.,** 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2(5)**, 270-278.
- [93] **Renaud, S. and de Lorgeril, M.,** 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet*, **339**, 1523-1526.
- [94] **Dubick, M.A. and Omaye, S.T.,** 2001. Evidence for grape, wine and tea polyphenols as modulators of atherosclerosis and ischemic heart disease in humans, *J. Nutraceut Functional & Med. Foods*, **3**, 67-93.
- [95] **Nardini, M., Natella, F. and Scaccini, C.,** 2007. Role of dietary polyphenols in platelet aggregation. A review of the supplementation studies, *Platelets*, **18**, 224-243.

- [96] **Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T. and Newmark, H.L.,** 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Ann. Rev. Nutr.*, **21**, 381-406.
- [97] **Johnson, I.T., Williamson, G. and Musk, S.R.R.,** 1994. Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients?, *Nutr. Res. Rev.*, **7**, 175-204.
- [98] **Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J. and Barberger-Gateau, P.,** 2007. Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period, *Am. J. Epidemiol.*, **165**, 1364-1371.
- [99] **Scarmeas, N., Luchsinger, J.A, Mayeux, R. and Stern, Y.,** 2007. Mediterranean diet and Alzheimer disease mortality, *Neurology*, **69**, 1084-1093.
- [100] **Dai, Q., Borenstein, A.R., Wu, Y., Jackson, J.C. and Larson, E.B.,** 2006. Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project, *Am. J. Med.*, **119**, 751-759.
- [101] **Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V. and Ramassamy, C.,** 2008. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: Bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 4855-4873.
- [102] **Rizvi, S.I. and Zaid, M.A.,** 2001. Intracellular reduced glutathione content in normal and type 2 diabetic erythrocytes: effect of Insulin and (-)epicatechin, *J. Physiol Pharmacol.*, **52**, 483-488.
- [103] **Rizvi, S.I. and Zaid, M.A.,** 2005. Impairment of sodium pump and Na/H exchanger in erythrocytes from non-insulin dependent diabetes mellitus patients: effect of tea catechins, *Clin. Chim. Acta.*, **354**, 59-67.
- [104] **Rizvi, S.I., Zaid, M.A., Anis, R. and Mishra, N.,** 2005. Protective role of tea catechins against oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **32**, 70-75.
- [105] **Rizvi, S.I and Zaid, M.A.,** 2001. Insulin like effect of epicatechin on membrane acetylcholinesterase activity in type 2 diabetes mellitus, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **28**, 776-778

- [106] **Zu, Y., Li, C., Fu, Y. and Zhao, C.**, 2006. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD, *J. of Pharma.and Biomed. Anal.*, **41**, 714-719.
- [107] **Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.**, 1995 Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm Wiss Technol.*, **28(1)**, 25-30.
- [108] **Hsu, B. Coupar, I. M. and Ng, K.**, 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm, *Hyphaene thebaica*, *Food Chem.*, **98**, 317–328.
- [109] **Ronald, B. P.**, 2001. Spectrophotometric measurement of secondary lipid oxidation products, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, D2.4.1–D2.4.8.
- [110] **Christie, W.W.**, 1990. Gas chromatography and lipids. The Oil Pres, Glaskow.
- [111] **Elman, G.I.**, 1959. Tissue Sulphydryl Groups, *Arch. Bioc.*, 70-77.
- [112] **Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.**, 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *The J. of Biochem.*, **193**, 265-277.
- [113] **Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- [114] **Hara, A. and Radin, N.S.**, 1978. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent, *Anal. Biochem.*, **90 (1)**, 420–426.
- [115] **Tvrzicka, E., Vecka, M., Stankova, B. and Zak, A.**, 2002. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography flame ionisation detection quantative aspects, *Anal. Chimica. Acta*, **465**, 337-350.
- [116] **Gupta, C., Garg, A.P., Uniyal, R.C. and Kumari, A.**, 2008. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamonoil and cinnamon extract on somefood-borne microbes, *African Journal of Microbiology Research*, **2(9)**, 247-251.
- [117] **Özçelik, S.**, 1992. Gıda mikrobiyolojisi laboratuar kılavuzu, s. 85, F.Ü. Fen-Edebiyat Fak. Yayın No:1, Elazığ.

- [118] **Collins, C.H. and Lyne, P.M.**, 1987. Mikrobiyological methots, pp. 450, Butter Morths & Co (Publishers) Ltd., London.
- [119] **Baytop, T.**, 1984. Therapy with medicinal plants in Turkey, pp. 263, Sanal Press, Publication No. 3255 of the Istanbul University, İstanbul.
- [120] **Baytop, T.**, 1997. A dictionary of vernucular names of wild plants of Turkey, pp. 52, Turkish History Society Press, Publication No. 578 of the Turkish Language Society, Ankara.
- [121] **Bryanskii, O.V., Tolstikhina, V.V., Zinchenko, S.V., and Semenov, A.A.**, 1992. A sesquiterpene glucoside from cultivated cells, *Khimiya Prirrodnykn Soedinenic*, **28**, 640-645.
- [122] **Jiang, T.F., Wang, Y.H., Lv, Z.H., and Yue, M.E.**, 2007. Determination of kava lactones and flavonoid glycoside in *Scorzonera austriaca* by capillary zone electrophoresis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*, **43**, 854-858.
- [123] **Li, J., Wu, Q.X., Shi, Y.P., and Zhu, Y.**, 2004. A new sesquiterpene lactone from *Scorzonera austriaca*, *Chinese Chemical Letters*, **15**, 1309-1310.
- [124] **Paraschos, S., Magiatis, P., Kalpoutzakis, E., Harvala, C., and Skaltsounis, A.L.**, 2001. Three new dihydroisocoumarins from the Greek endemic species *Scorzonera cretica*, *Journal of Natural Products*, **64**, 1585-1587.
- [125] **Sari, A., Zidorn, C., Ellmerer, E.P., Özgölçe, F., Ongania, K.H., and Stuppner, H.**, 2007. Phenolic compounds from *Scorzonera tomentosa* L., *Helvetica Chimicl Acta.*, **90**, 311-317.
- [126] **Tolstikhina, V.V., Bryanski, O.V., Syrincha, A.I., and Semenov, A.A.**, 1988. Chemical composition of *Scorzonera hispanica* tissue culters, *Khimiya Prirrodnykn Soedinenic*, **24**, 763-764.
- [127] **Tolstikhina, V.V. and Semenov, A.A.**, 1998. Minor metabolites of *Scorzonera hispanica* L. cell culture, *Rastitel' nye Resursy*, **34**, 77-80.
- [128] **Tolstikhina, V.V., Semenov, A.A. and Ushakov, I.A.**, 1999. Minor furofuranoid lignans from cultivated cells of *Scorzonera hispanica* L., *Rastitel' nye Resursy*, **35**, 87-90.

- [129] **Wang, B., Li, G.Q., Qiu, P.J. and Guan, H.S.**, 2007. Two new olean-type triterpene fatty esters from *Scorzonera mongolica*, *Chinese Chemical Letters*, **18**, 708-710.
- [130] **Zidorn, C., Ellmerer-Mueller, E.P. and Stuppner, H.**, 2000. Tyrolobibenzyls – novel secondary metabolites from *Scorzonera humilis*, *Helvetica Chimica Acta*, **83**, 2920-2925.
- [131] **Zidorn, C., Petersen, B.O., Udovicic, V., Larsen, T.O., Duus, J.Q., Rollinger, J.M. and et al.**, 2005. Podospermic acid, 1,3,5-tri-O-(7,8-dihydrocaffeoyl) quinic acid from *Podospermum laciniatum* (Asteraceae), *Tetrahedron Letters*, **46**, 1291-1294.
- [132] **Zidorn, C., Spitaler, R., Ellmerer- Mueller, E.P., Perry, N.B., Gerhauser, C. and Stuppner, H.**, 2002. Structure of tyrolobibenzyl D and biological activity of tyrolobibenzyls from *Scorzonera humilis*, *Zeitschrift Natureforschung. C.*, **57**, 614-619.
- [133] **Rees, S. and Harborne, J.B.**, 1984. Flavonoids and other phenolics of Cichorium and related members of the Lactuceae (Compositae), *Bot. J. Linn. Soc.*, **89**, 313-319.
- [134] **Hung, H.C., Joshipura, K.J., Jiang, R., Hu, F.B., Hunter, D. and Smith-Warner, S.A.**, 2004. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease, *J. of Nati. Cancer Inst.*, **96(21)**, 1577-1584.
- [135] **Tripoli, E., Guardia, M.L., Giammanco, S., Majo, D.D. and Giammanco, M.**, 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review, *Food Chem.*, **104**, 406-479.
- [136] **Justesen, U.**, 2000. Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs, *J. of Chroma. A.*, **902**, 369-379.
- [137] **Sokol-Letawska, A., Oszmianski, J. and Wojdylo, A.**, 2007. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap, *Food Chem.*, **103(3)**, 853-859.
- [138] **Harkati, B., Akkal, S., Bayat, C., Laouer, H. and Dijoux Franca M.G.**, 2010. Secondary metabolites from *Scorzonera undulata* ssp. *deliciosa* (Guss.) maire (Asteraceae) and their antioxidant activities, *Rec. Nat. Prod.*, **4(3)**, 171-175.

- [139] **Homma, Y., Ikeda, I., Ishikawa, T., Tatenno, M., Sugano, M. and Nakamura, H.,** 2003. Decrease in plasma low-density lipoprotein cholesterol, apolipoprotein B, cholesteryl ester transfer protein, and oxidized low-density lipoprotein by plant stanol ester-containing spread: a randomized, placebocontrolled trial, *Nutrition*, **19**, 369-374.
- [140] **Mannarino, E., Pirro, M., Cortese, C., Lupattelli, G., Siepi, D., Mezzetti, A. and et al.,** 2009. Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: a multicenter Italian study, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **19**, 84-90.
- [141] **Ferretti, G., Bacchetti, T., Masciangelo, S. and Bicchiega, V.,** 2010. Effect of phytosterols on copper lipid peroxidation of human low-density lipoproteins, *Nutrition*, **26**, 296–304.
- [142] **Fuhrman, B., Plat, D., Herzog, Y. and Aviram, M.,** 2007. Consumption of a novel dietary formula of plant sterol esters of canola oil fatty acids, in a canola oil matrix containing 1,3-diacylglycerol, reduces oxidative stress in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice, *Agric. Food Chem.*, **55**, 2028-2033.
- [143] **Summanen, J., Yrjönen, T., Christiansen, L., Mervaala, E., Vaskonen, T., Lassila, M. and et al.,** 2003. Effects of microcrystalline plant sterol suspension and a powdered plant sterol supplement on hypercholesterolemia in genetically obese Zucker rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **55**, 1673-1679.
- [144] **Franke, W.,** 1992. *Nutzpflanzenkunde*, 5. Aufl., Thieme Verlag Stuttgart, NewYork.
- [145] **Liu, D., Shi, J., Ibarra, A.C., Kakuda, Y. and Xue, S.J.,** 2008. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical, *Food Science and Technology*, **41**, 1344-1349.
- [146] **Tesoriere, L., Ciaccio, M., Bongiorno, A., Riccio, A., Pintaudi, A.M. and Livrea, M.A.,** 1993. Antioxidant activity of all-trans-retinol in homogeneous solution and in phosphatidylcholine liposomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **307**, 217–223.

- [147] **Rhee, S.J., Jeong, Y.C. and Choi, J.H.**, 2005. Effects of vitamin E on phospholipase A2 activity and oxidative damage to the liver in streptozotocin-induced diabetic rats, *Ann. Nutr. Metab.*, **49**, 392-396.
- [148] **Jain, S.K. and Palmer, M.**, 1997. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins, *Free Radic. Biol. Med.*, **22**, 593-596.
- [149] **Eichhorn, O.**, 1990. Obst und Gemüse, Fachbuchverlag Leipzig.
- [150] **Sari, A., Ozbek, B. and Ozkokce, F.**, 2009. Antimicrobial activities of two *Scorzonera* species growing in Turkey, *Asian Journal of Chemistry*, **21** (6), 4785-4788.
- [151] **Abdelkader, H.B., Salah, K.B.H., Liouane, K., Boussaada, O., Gafsi, K. and et. al.**, 2010. Antimicrobial activity of *Rhaponticum acaule* and *Scorzonera undulata* growing wild in Tunisia, *African Journal of Microbiology Research*, **4(19)**, 1954-1958.
- [152] **Navarrete, C., Siles, A., Martínez, J.L., Calero, F. and Ramos, J.**, 2009. Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*, *FEMS Yeast Res.*, **9**, 582-590.
- [153] **Chance, B., Sies, H. and Boveris, A.**, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.*, **59**, 527-605.
- [154] **Seaver, L.C. and Imlay, J.A.**, 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **183**, 7182-7189.
- [155] **Antunes, F. and Cadenas, E.**, 2000. Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes, *FEBS Lett.*, **475**, 121-126.
- [156] **Sousa-Lopes, A., Antunes, F., Cyrne, L. and Marinho, H.S.**, 2004. Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress, *FEBS Lett.*, **578**, 152-156.
- [157] **Branco, M.R., Marinho, H.S., Cyrne, L. and Antunes, F.**, 2004. Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 6501-6506.

- [158] **Matias, A.C., Pedroso, N., Teodoro, N., Marinho, H.S., Antunes, F., Nogueira, J.M., Herrero, E. and Cyrne, L.,** 2007. Down-regulation of fatty acid synthase increases the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells in to H₂O₂, *Free Rad. Biol. Med.*, **43**, 1458-1465.
- [159] **Tafforeau, L., Le Blastier, S., Bamps, S., Dewez, M., Vandehaute, J. and Hermand, D.,** 2006. Repression of ergosterol level during oxidative stress by fission yeast F-box protein Pof14 independently of SCF, *EMBO J.*, **25**, 4547-4556.
- [160] **Martin, C.E., Oh, C. and Jiang, Y.,** 2006. Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, **1771(3)**, 271-285.
- [161] **Benchekroun, A. and Bonaly, R.,** 1992. Physiological properties and plasma membrane composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown in sequential batch culture and in presence of surfactant, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 673-678.
- [162] **Rosi, I. and Bertuccioli, M.,** 1992. Influences of lipid addition on fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma characteristics of experimental wines, *J. Inst. Brew.*, **98**, 305-31.
- [163] **Toriija, M.J., Beltron, G., Novo, M., Poblet, M., Guillaman, J.M., Mas, A. and Rozes, N.,** 2002. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine, *Inter. J. of Food Microbiol.*, **(85)**, 127-136.
- [164] **Beltran, G., Novo, M., Guillamon, J.M., Mas, A. and Rozes, N.,** 2008. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds, *Inter. J. Food Microbiol.*, **121**, 169-177.
- [165] **Agius, D.R., Bannister, W.H. and Balzan, R.,** 1998. Prokaryotic iron superoxide dismutase replaces cytosolic copper, zinc superoxide dismutase in protecting yeast cells against oxidative stress, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **44**, 41-49.
- [166] **Pinheiro, R., Belo, I. and Mota, M.,** 2002. Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure, *Appl Microbiol Biotechnol*, **58**, 842-847.

- [167] **Lee, J.S., Dawes, I.W. and Roe, J.H.**, 1995. Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione, *Microbiology*, **141**, 3127-3132.
- [168] **Hoehler, D., Marquardt, R.R., McIntosh, A.R. and Madhyastha, S.**, 1998. Free radical-mediated lipid peroxidation induced by T-2 toxin in yeast (*Kluyveromyces marxianus*), *J. Nutr. Biochem.*, **9**, 370–379.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Yavuz ERDEN
Doğum Yeri : Malatya
Doğum Tarihi : 15.04.1987
Yabancı Dil : İngilizce
Adres : Özsan Sanayi Sitesi 2. Blok No:42 PK:44110 / Malatya
e-mail : yavuzerden@hotmail.com, byerden@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : 20 Mayıs Vakfı Turgut Özal Lisesi (2001-2004)
Lisans : Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2005-2009)
Y.Lisans : Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji-Genel Biyoloji A.B.D. (2009-Devam Ediyor)

Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

1. O. Yılmaz, A. D. Ozsahin, B. Bircan, Y. Erden and Z. Karaboga, “Radical scavenging activity of the *Pistacia terebinthus* in Fenton Reagent environment and its protective effects on the unsaturated fatty acids”, ASIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, Volume 22 (2010).

Ulusal Konferans ve Sempozyumlar

1. A. D. ÖZŞAHİN, A. ASLAN, Ö. YILMAZ, Z. BAYDAŞ, H. GENÇOĞLU, Y.ERDEN, M. TUZCU, “HİDROJEN PEROKSİT VE Fe⁺⁺ İYONU VARLIĞINDA BEYİN DOKUSUNDAKİ BAZI BİYOMOLEKÜLLERE KAYISI VE ÜZÜM EKSTRAKTLARININ ETKİSİ”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye (2010)
2. A. D. ÖZSAHİN, Ö. YILMAZ, O. A. KİRECCİ, M. TUZCU and Y. ERDEN, “*Prunus armeniaca* L. CV. HACIHALILOĞLU FRUITS EXTRACTS PREVENT LIPID PEROXIDATION AND PROTECT THE UNSATURATED FATTY ACIDS IN THE FENTON REAGENT ENVIRONMENT”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye (2010)

3. B. BİRCAN, Ö. YILMAZ, Y. ERDEN, A. D. ÖZŞAHİN, Z. KARABOĞA, “*Punica granatum* L. MEYVE EKSTRAKTININ *IN VITRO* ORTAMDA OLUŞTURULAN LİPID PEROKSİDASYONU VE DPPH SERBEST RADİKALİNE KARŞI ANTİOKSİDAN ETKSİNİN ARAŞTIRILMASI”, 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye (2010)*
4. Y. ERDEN, Ö. YILMAZ, B. BİRCAN, A. D. ÖZŞAHİN, M. TUZCU, Z. KARABOĞA, “*Pistacia terebinthus* L. EKSTRAKTLARININ SOYA İLE MISIRÖZÜ YAĞININ BULUNDUĞU *IN VITRO* ORTAMDA LPO OLUŞUMUNA KARŞI ANTİOKSİDAN ETKSİNİN ARAŞTIRILMASI”, 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye (2010)*
5. Ö. YILMAZ, A. N. ÖNGANER, P. ERECEVİT, S. KIRBAĞ, Y. ERDEN, “*Triticum sativum* (BUĞDAY) EKSTRAKTLARININ MİNİMAL BESİYERİ ORTAMINDA GELİŞTİRİLEN *Lactobacillus plantarum* ÜZERİNDEKİ YAĞ ASİDİ VE VİTAMİN BİYOSENTEZİNE ETKİSİ”, 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, Türkiye (2010)*

Katıldığı Bilimsel Etkinlikler & Kurslar

1. T.C. Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu. “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” 2010.
2. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslar Arası Katılımlı)-Denizli. 2010.
3. ISO 17025:2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği Sertifikası 2011
4. ISO 9001, ISO 14001, OHSAS 18001 Entegre Yönetim Sistemi İç Denetçi Sertifikası 2011

Projeler

1. Yavuz ERDEN (Proje Yürütücüsü), Nida ASLAN, Burak BİRCAN, Zeynep KARABOĞA, “*In vitro* Şartlarda Bazı Bitkisel Yağların Varlığında Oluşturulan Lipid Peroksidasyonu Üzerine *Pistacia terebinthus* & *Punica granatum* Ekstraktlarının Antioksidan Etkisinin Araştırılması”, 2009 (TÜBİTAK, 2209-Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı).
2. Sevda KIRBAĞ, Yavuz ERDEN (Proje Elemanı), “Bazı *Scorzonera* Türlerinin Fitokimyasal İçeriklerinin Belirlenmesi ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması”, Devam Ediyor (FÜBAP - 2061 Nolu Proje).