

KIR MENEKŞESİ'NİN (*Viola odorata*) KOZMETİK VE İLAÇ AMAÇLI KULLANIMININ BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

Dilek DÜLGER¹, Naz Nazan DEMİR^{2,*}, Ayşe ÇETİNTAŞ³, Yaşar DEMİR²

¹Karabük Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Karabük
Türkiye

²Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Kozmetik Ürünler Uygulama ve Araştırma Merkezi
Muğla Türkiye

³Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal
İşleme Teknolojileri Bölümü, Muğla Türkiye
*demirn@yahoo.com

Özet

Kozmetik sektörü gelişmeye açık bir alan olup, çok büyük bir tüketici kitlesine hitap etmektedir. Bu tüketici kitlesi gün geçtikçe daha da artmaktadır. Alanın bu kadar hızlı gelişmesi ve tüketici kesimin artması insan sağlığı açısından bazı sorunlara neden olmaktadır. Bu sorunlara karşı önlem almak isteyen tüketicilerin tercihleri hızlı sonuç alınan bitkisel kökenli organik ürünlerin lehine değişmektedir. Buda üreticileri bu doğrultuda üretilen inovatif ürünlere yöneltmektedir. Bu çalışmada Muğla yöresinde doğal olarak yetişen kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden proteaz enzimi saflaştırıldı ve karakterize edildi. (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ve CM-selüloz iyon değişim kromatografisi ile kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-PAGE elektorofezi uygulandı. Saf enzimin optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenerek 5 farklı substrat için K_M ve V_{max} değerleri belirlendi. Yine enzim aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM, 0,1 mM SDS, EDTA, β-merkaptolanol bileşiklerinin ve 10 mM, 1 mM, 0,1 mM Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ katyonlarının etkisi araştırıldı. Ayrıca, taze bitkiden alınan ekstrelerde organik bileşen analizi yapıldı. Buna göre %38 1-octen-3-ol, %19,3 2-Hexenal ve %13,3 1-Hexanol içerdiği belirlendi. 1-Hexanol nem tutucu, kıvam artırıcı özelliğe sahip olan ve bitkiye güzel kokusunu veren aromatik bir bileşen olup nemlendirici ürünler için bitkiyi ideal kılmaktadır. Ayrıca çiçekten alınan ekstrelerde suda çözünen vitaminler ile A, D, E ve K vitamin analizi yapıldı. Analiz sonuçlarına göre antioksidan aktivite gösteren bazı önemli vitaminler içerdiği bulundu. Kır

menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden elde edilen ekstrelerde demir indirgeme gücü belirlendi, DPPH• serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi, metal şelat aktivitesi, H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesive fenolik bileşiklerin belirlenmesi tayini yapıldı. Bu sonuçlar menekşeden yeni bitkisel kaynaklı cilt bakım ürünleri geliştirilmesine imkan tanımıştır. Proteaz enziminin varlığı tasarlanan ürüne peeling işlemi özelliği katacaktır. 1-Hexanol bileşiğinin nem tutma ve kıvam artırıcı özelliği tasarlanan nemlendiricinin etkisini arttıracaktır. Antioksidan özellikli olması ve vitamin içermesi yaşlanmayı geciktirici bir etki yaratacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kır menekşesi, *Viola odorata*, Proteaz enzimi, Antioksidant aktivite, Peeling, Kozmetik

BIOCHEMICAL INVESTIGATION OF THE AVAILABILITY OF KIR MENEKŞESİ (*Viola odorata*) AS COSMETIC AND DRUG

Abstract

The cosmetics sector is open to development and appeals to a very large consumer group. This consumer group is increasing day by day. The rapid development of the field and the increase of the consumer segment cause some problems in terms of human health. Consumers who want to take action against these problems are shifting their preferences to organic products of plant origin. The producers are also pointing to innovative products produced in this direction. In this study, the protease enzyme was purified and characterized from the flowers of the *Viola odorata* plant growing in Muğla region. The protease enzyme was purified from the flowers of the *Viola odorata* plant using (NH₄)₂SO₄ precipitation and CM-cellulose ion exchange chromatography. SDS-PAGE electrophoresis was used to check the purity of the enzyme. Optimal pH and temperature values of pure enzyme and K_M and V_{max} values for 5 different substrates were determined. In addition, the effect of 10 mM, 1 mM, 0.1 mM SDS, EDTA, β-mercaptoethanol compounds on enzyme activity was investigated. The effect of 10 mM, 1 mM, 0.1 mM Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ cations on enzyme activity was also examined. Organic component analysis was also performed on fresh extracts. Accordingly, it was determined that the plant contained 1-octen-3-ol (38%), 2-hexenal (19,3%) and 1-hexanol (13,3%). 1-Hexanol is a moisture retainer and thickener.

This compound is the aromatic component that gives the plant its beautiful smell and makes the plant ideal for moisturizing products. In addition, analyzes of water and oil-soluble vitamins were made in the extracts from the flowers. According to the results of the analysis, the plant contains some important vitamins showing antioxidant activity. DPPH • free radical scavenging activity, metal chelating activity, H₂O₂ removal activity and identification of phenolic compounds were also performed on the extracts of the flowers of *Viola odorata*. According to the results, it is possible to develop new herbal skin care products using *Viola odorata* plant. The presence of the protease enzyme will add peeling properties to the intended product. 1-Hexanol compound will give moisture retention property to the designed product and increase its consistency. Having antioxidant properties and containing vitamins will have a detrimental effect on aging.

Keywords: Kır Menekşesi, *Viola odorata*, Protease enzyme, Antioxidant activity, Peeling, Cosmetic and pharmacy.

1. Giriş

Kır menekşesi antik çağlardan beri Avrupa' da kozmetik ve sağlık için yetiştirilmektedir [1]. Dünyanın birçok yerinde yetişebilmekle beraber en çok Kuzey Yarımkürede yetişir. Ayrıca Havai ve Güneydoğu Asya' da da yetişmektedir [2]. İnsanlar tarafından yayılan Akdeniz bölgesi, güney-batı Avrupa ve Batı Asya' nın bazı bölgelerinde orjinal alanın ötesinde dağılımı genişletilmiştir [3, 4, 5]. Bu bitki dünya çapında geniş uygulamalara sahiptir. Halk arasında bronşit, mide ağrısı, ateş, grip, pnömoni, balgam söktürücü ve öksürük için kır menekşesinin (*Viola odorata*) çiçek ve yaprakları halk arasında ilaç olarak kullanılır [6, 7, 8].

Vücudumuzda ve besinlerde bulunan lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler oksidasyona uğrayabilir ve canlı organizma için zararlı olabilecek yükseltgenme ürünleri oluşturabilirler [9]. Oksidasyon, radikalik zincir reaksiyonları üzerinden yürür. Radikaller eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için özellikle gevşek bağlı elektronları koparırlar. Bu özellikleri, radikallerin kimyasal olarak aktif olmalarını sağlar ve bunların organizmadaki varlığı biyomoleküllerin modifikasyonuna sebep olur. Reaktif oksijen ve azot türleri DNA bazlarını hasara uğratarak mutasyona sebep olur [10].

Ayrıca Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle son bulur. Bu ürünlerden başlıcaları olan hidroksinonenal (HNE) ve malondialdehit MDA, proteinlere ve DNA'ya bağlanarak kalıcı değişiklikler oluşturur. Lipit peroksitlerinin hücre yaşamı için en önemli etkileri, membran yapısında ve hücre bölünmesinde meydana getirdikleri değişimlerdir [11, 12].

Antioksidanlar, oksidasyonu başlangıç ve/veya gelişme basamağında geciktiren yada önleyen maddelerdir. Antimutajenik, antikarsinojenik ve yaşlanmayı geciktirmek gibi çoğu etki canlılardaki antioksidan özellikteki maddelerden kaynaklanır [13].

Proteaz enzimi, insan, hayvan, mikroorganizma ve bitkileri içeren geniş bir dağılım göstermesinin yanı sıra buldukları canlıların büyüme ve çoğalmaları için gerekli olan bir enzimdir. Proteinlerin hidrolizinde endopeptidaz ve ekzopeptidaz olarak yüksek katalitik rol oynayan, fizyolojik ve ticari açıdan oldukça önemli enzimlerden biridir.

Günümüzde farklı kaynaklardan elde edilen farklı proteazlar (Serin proteazlar, sistein proteazlar vs), deterjan ve gıda endüstrisi, tekstil, deri, fotoğraf, ipek ve yem sanayileri ile çeşitli klinik uygulamalar ve eczacılık başta olmak üzere kozmetik alanında da geniş bir kullanım alanına sahiptir [14, 15].

Bu çalışmada; kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinden proteaz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiş, bitkinin vitamin ve organik bileşen analizi yapılmıştır. Kısaca, Türkiye' de doğal olarak yetişen bir bitki olan kır menekşesi (*Viola odorata*)'nin kozmetik ürünlerde, özellikle cilt bakım ürünlerinde kullanılıp kullanılmayacağı sorusuna cevap aranmıştır.

2. Materyal ve Yöntemler

2.1. Örneklerinin toplanması

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

2.2. Homojenatin hazırlanması

-18°C’ de muhafaza edilen kır menekşesinden 25,0 g tartıldı. Sıvı azot ile muamele edildikten sonra mekanik olarak parçalandı ve hacminin yaklaşık olarak 3 katı kadar (60 mL) 0,1 M’ lık fosfat tamponu (pH: 7,6) içerisine alındı. Proteinlerin çözeltiye geçmesi için manyetik karıştırıcıda 30 dakika boyunca karıştırıldı ve süzgeç kâğıdı kullanılarak süzüldü. Katı kısım atıldıktan sonra 6000 rpm’ de 20 dakika boyunca santrifüjlendi, çökelek atıldı, süpernatant çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanıldı.

2.3. Amonyum sülfat çöktürmesi

Menekşeden elde edilen homojenatta %0 ile %100 arasındaki doygunluk oranlarında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Bu çöktürme işlemi %0-20, % 20-40, % 40-60, % 60-80, % 80-100 şeklinde gerçekleştirildi. Hangi aralıkta en yüksek proteaz enziminin çöktüğü belirlendi. Amonyum sülfat çöktürmesinde elde edilen çökelek 0,05 M CH₃COONa tamponunda (pH: 5,7) çözüldükten sonra ilk olarak 7 saat boyunca saf suya karşı diyalizlendi. Diyaliz işlemleri +4°C’ de yapıldı ve diyaliz süresince manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Bu işlem sonunda enzim çözeltisi CM-Selüloz iyon değişim kolonuna yüklemeye hazır hale geldi.

2.4. CM-Selüloz iyon değişim kolonunun hazırlanması

0, 05 M asetat tamponu (pH: 5.7) ile dengelenen CM-Selüloz kolonuna enzim çözeltisi yüklendi. 0, 05 M asetat tamponu (pH: 5.7) kullanılarak 280 nm’de absorbans görülmeyinceye kadar kolon yıkandı. Kolonun akış hızı peristaltik pompa yardımıyla 20 mL/saat’ e ayarlandı. 300 mL 0,1-1,0 M NaCl ihtiva eden 0,05 M asetat tamponu (pH: 5.7) ile gradientli mikser kullanılarak enzim elüe edildi. Elüatlar her bir tüpte 5 mL olacak şekilde toplandı. Elüsyon işlemine, toplanan elüatlarda 280 nm’ de absorbans görülmeyinceye kadar devam edildi. Toplanan elüsyonlarda 280 nm dalga boyunda spektrofotometre ile kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde proteaz aktivite tayini yapıldı. Proteaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirilerek enzim havuzu oluşturuldu ve karakterizasyon işlemi için saklandı.

2.5. Proteaz enzimi için aktivite tayini

Kır menekşesinden saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivitesi %1’lik kazein varlığında kazeinin sindirimi yöntemine göre belirlendi. Proteolitik aktivite için reaksiyon karışımı; 1 mL substrat (kazein), 0,5 mL enzim çözeltisi eklenip ve toplam hacim tampon çözeltiyle 2,5 mL’ye tamamlanarak hazırlandı. Kör çözelti için ise enzim

çözeltisi yerine tampon çözelti ilave edildi. Tüpler 20 dakika boyunca 40°C' deki su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra 3 mL %5'lik TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Çökmenin tamamen gerçekleşmesi için 60 dakika boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm' de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi. Proteolitik aktivite enziminin dakikada parçaladığı µg protein/mL olarak hesaplandı [16].

2.6. SDS-PAGE ile alt birimlerin belirlenmesi

Laemmli tarafından geliştirilen SDS-PAGE ile saflaştırılan proteaz enziminin alt birimi olup olmadığı kontrol edildi [17].

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

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin kazein substratına karşı K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı. Kinetik özelliklerini araştırmak üzere saflaştırılan enzimin optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri bulundu. Enzim aktivitesi üzerine bazı katyonların ve kimyasalların etkisi araştırıldı. Azokazein, azoalbumin, jelatin, hemoglobin, kazein substratları için V_{max} ve K_M değerleri belirlendi.

2.8. Optimum pH'nın belirlenmesi

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH'sının belirlenmesi için kazein substratına karşı proteolitik aktivitesinden yararlanıldı. pH: 4-5 için asetat tamponu, pH: 6-7 için fosfat tamponu, pH: 8-9 için Tris-HCl tamponu, pH: 10 için ise borat tamponu kullanıldı. Her bir numune tüpüne 1 mL kazein çözeltisi, 500 µL enzim çözeltisi ve 1 mL uygun pH'daki tampon çözelti eklendi. Kör olarak her bir numuneye karşılık 1 kör çözelti hazırlandı, kör çözeltilerde enzim yerine tampon kullanıldı.

2.9. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum sıcaklığını belirleyebilmek için 10-90°C aralığında sıcaklık 10°C artırılarak standart aktivite tayini yapıldı. Kör tüp ve numune; 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi. Daha sonra 3 mL %5'lik TCA eklenerek reaksiyon durduruldu. Çökmenin tamamen gerçekleşmesi için 60 dakika

boyunca beklendi ve bu süreden sonra 6.000 rpm’de 20 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatant filtre edildikten sonra, süpernatant içerisindeki parçalanmış ürünlerin miktarı Bradford yöntemi ile belirlendi [18].

2.10. Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) proteaz enzimi saflaştırdıktan sonra jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak molekül ağırlığı tayin edildi [19].

2.11. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi

Hemoglobin, jelatin, azoalbumin, azokazein substratlarına karşı, kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliği enzimin proteolitik aktivitesinden yararlanılarak belirlendi. Enzim için proteolitik aktivite parçaladığı µg protein/mL.dak olarak hesaplandı [20].

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

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine HgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, FeCl₂, FeCl₃, NiCl₂ MgCl₂ metal iyonlarının ve SDS (Sodyum dodesil sülfat), EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) ve β-merkaptotanol gibi bazı kimyasalların etkileri incelendi. Metal iyonlarının ve kimyasalların etkilerinin belirlemek amacıyla 0.1 mM, 1 mM ve 10 mM konsantrasyonları varlığında normal proteaz aktivite tayini yapılarak etkisi araştırıldı.

2.13. Aroma verici uçucu organik bileşenlerin Headspace GC/MSD ile belirlenmesi

Bitkiye kokuyu veren uçucu organik bileşikler tarafımızdan yeni geliştirilen metot ile analiz edilmiştir. Parçalara ayrılan taze kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden 5.0 g alınıp susuz magnezyum sülfat (MgSO₄) ilave edildi ve çiçek ile tamamen karışması sağlandı. Vial headspace örnekleyicisine yerleştirildi ve 90 °C’ de 30 dakika sürecek olan ekstraksiyon işlemine başlandı. 30 dakika sonunda headspace sampler tarafından GC Split/Splitless inlete bir transferline ile 1 dakika boyunca vial üst kısmındaki uçucu bileşenler helyum gazı ile transfer edildi.

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) çiçeklerinden hazırlanan örnekten yaklaşık 3,0 g alınarak üzerine 30 mL H₂O:CH₃CN (80:20) karışımı ilave edildi ve +4°C’ de 6 saat inkübe edilerek ekstraksiyon yapıldıktan sonra 4000 rpm’de 20 °C’de 10 dakika

santrifüjlendi. Whatman No 4 filtre kağıdından süzülür ve daha sonra kalıntı 2 kez daha 30 mL' lik H₂O:CH₃CN karışımları ile ekstraksiyona devam edildi. Birleştirilen ekstraktlardaki asetonitril düşük vakum altında, 40 °C'de buharlaştırıldı (Rotary Evaporator Heidolph Basis Hei-VAP ML).Çözelti Macherey-Nagel Chromafil Xtra PTFE-20/25 0,20 µm filtrelerden geçirilerek UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı ile analiz edildi.

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

Küçük parçalara ayrılan çiçek örnekleri, hekzan kullanılarak ekstrakte edildi. Ekstraktlar Macherey-Nagel Chromafil Xtra PTFE-20/25 0,20µm filtreden süzülür ve HPLC-DAD (Agilent 1260 Quat. Pump, 1260 ALS, 1260 TCC, 1260 DAD VL) cihazı ile A vitamini için 325nm, Ergosterol, D₂, K₁ ve K₂ vitaminleri için 260nm ve E vitamini için ise 285nm dalga boylarında analiz edildi.

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

Ekstrelerin hazırlanması

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

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstraktları için indirgeme gücü tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı [21]. 1 mL distile sudaki farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktları (25-800 µg/mL) 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH: 6,6) ve 2,5 mL %1'lik potasyum ferrisiyanür [K₃Fe(CN)₆]'e ilave edilerek reaksiyon karışımı oluşturuldu. Karışım 50°C' de 20 dakika inkübe edildi. 2,5 mL %10'luk TCA ilave edilip 10 dakika santrifüjlendi. Üst fazdaki solüsyondan 2,5 mL alınarak, 2,5 mL saf su ve 0,5 mL %1'lik FeCl₃ ile karıştırıldı ve 700 nm'de absorbansı okundu. Kör olarak distile su kullanıldı. Aynı işlem metanol ekstresi için tekrarlandı.

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstresinin serbest radikali giderim aktivitesi, DPPH• Serbest radikali kullanılarak belirlendi [22]. 0, 1 mM DPPH•'den 1 mL alınarak ve suda hazırlanan 3 mL bitki ekstresine (25 - 800 µg/mL) ilave edildi. 30 dakika sonra

517 nm’de absorpsansı okundu. Pozitif kontrol olarak sentetik antioksidan olan vitamin C ve BHA kullanıldı. DPPH• radikalini süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

A₀= Kontrol reaksiyonunun absorpsansı

A₁= Örnek reaksiyonunun absorpsansı

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

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstratlarında metal şelat aktivitesi; Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstratları ve standart ile demir iyonları arasında şelat oluşması Dinis yöntemine göre yapıldı [23]. Bitki ekstratları (25-800 µg/mL) 0,05 mL, 2 mM FeCl₂’e ilave edildi. Reaksiyon ortamına 0,2 mL 5 mM ferrozine ilave edildi ve iyice karıştırıldı. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 562 nm’de absorpsansı ölçüldü. % inhibisyon miktarı (1) numaralı denklem kullanılarak hesaplandı.

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstratlarında H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri yöntemine göre yapıldı [24]. Bu işlem için 40 mM’lık H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. Bitkinin (25 - 800 µg/mL) hazırlanmış olan ekstratları, 0,6 mL 40 mM H₂O₂ çözeltisine ilave edildi. 10 dakika inkübe edildi ve 230 nm’de absorpsansı okundu. Kör olarak H₂O₂ içermeyen fosfat tamponu kullanıldı.

$$\% \text{ H}_2\text{O}_2 \text{ uzaklaştırma} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstratlarında toplam fenolik bileşiklerin varlığı Silinkart ve Singleton yöntemlerine göre yapıldı [25]. 1 mL bitki ekstratına 1 mL folin-Ciocalteau çözeltisi ilave edildi ve karıştırıldı. 3 dakika sonra %2’lik NaHCO₃’ dan 3 mL ilave edilerek 2 saat manyetik karıştırıcı ile karışmaya bırakıldı. Ardından 700 nm’de absorpsansı ölçüldü.

$$\text{Absorbans} = 0,0008x + \text{Gallik asit (g)} \quad (3)$$

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

3. Sonuçlar ve Tartışma

3.1. Kır Menekşesinden (*Viola odorata*) Proteaz Enziminin Saflaştırılması

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) proteaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi teknikleri kullanılarak iki basamakta saflaştırıldı. Elde edilen elüatlarda Bradford yöntemi ile protein tayini yapıldı ve bu iki basamakta proteaz enziminin kaç kat saflaştırıldığı ayrı ayrı hesaplandı [26, 27] Saflaştırma sonuçları Tablo 1’de verildi ve proteaz enziminin kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden % 43,125 kat saflaştırıldığı hesaplandı.

Tablo 1. CM-Selüloz kolonunda kır menekşesinden (*Viola odorata*) elde edilen proteaz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve homojenattan saflaştırılan proteaz enziminde enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.

Basamaklar	Hacim mL	Aktivite EU/mL	Toplam Aktivite		Protein miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite EU/mg	Saflaştırma oranı
			EU	%			
Ham ekstrakt	25	0.118	2.95	100	1.056	0.112	1
%80-100 (NH ₄) ₂ SO ₄	10	0.097	0.97	32.88	0.076	1.27	11.34
CM-Selüloz	5	0.314	1.57	51.19	0.065	4.83	43.13

3.2. Amonyum sülfat çöktürmesi

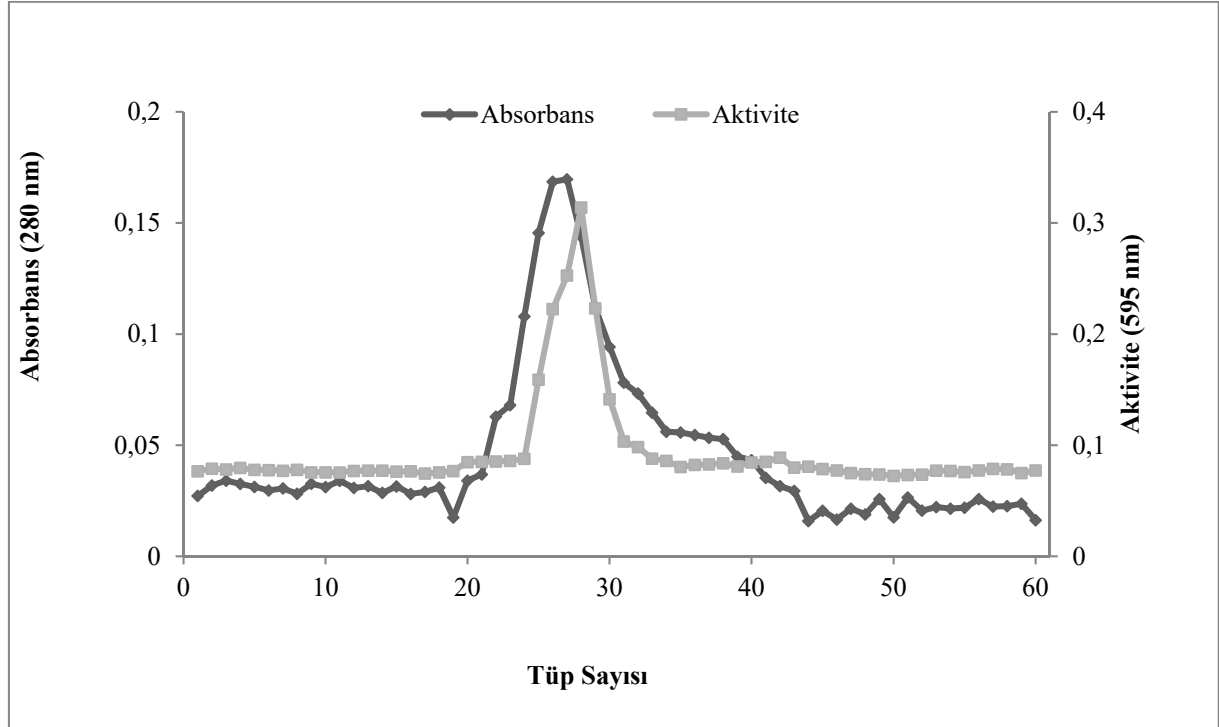
1. Basamakta hazırlanan homojenatta %0-100 aralığında amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Her basamak sonucunda elde edilen çökelek 0,05M fosfat tamponunda (pH:7,6) çözüldü ve aktivite tayini yapıldı. Ayrıca her adımda süpernatant kısmının da enzim aktivitesine bakıldı. Yapılan tayinler sonucunda en yüksek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

3.3. CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi

2. Basamakta 0,05M’lık asetat tamponu (pH: 5. 7) ile dengelenen CM-Selüloz iyon değişim kolonuna homojenat yüklendi. Kolon0, 05M’lık asetat tamponu (pH: 5.7) ile yıkandı. Yıkama işlemine 280nm’de 0,05M’lık asetat tamponuna (pH: 5.7) karşı elüsyonün absorbans değeri sıfır oluncaya kadar devam edildi. Enzim kolondan 0,1-1,0 M NaCl içeren aynı tampon ile elüe edildi. Toplanan elüatların 280nm’de absorbansı

alındı ve proteolitik aktivitesine bakıldı. Proteolitik aktivitesi yüksek olan elüatlar ile enzim havuzu oluşturuldu.

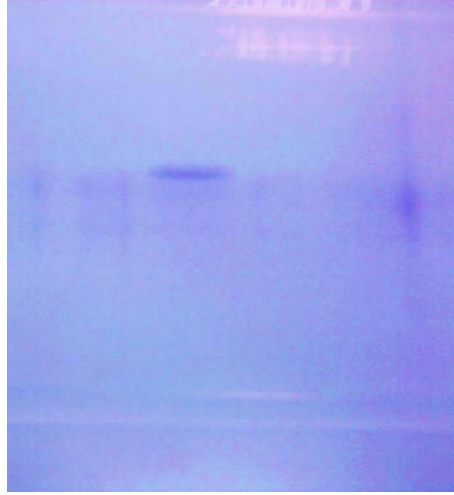
Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği Şekil 1’de gösterildi.



Şekil 1. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivite-absorbans grafiği

3.4. SDS-Poli akrilamid jel elektroforezi sonuçları

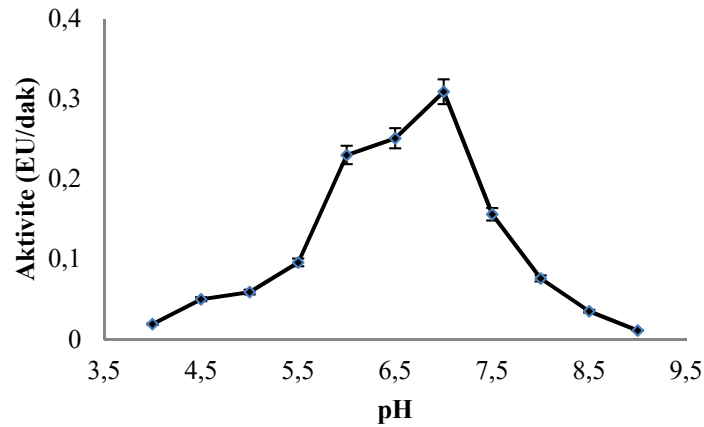
Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin alt birime sahip olup olmadığını belirlemek için SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Elde edilen sonuçlar kır menekşesinden saflaştırılan proteaz enziminin 25 kDa ağırlığında tek bir alt birime sahip olduğunu gösterdi. SDS-PAGE jel fotoğrafı Şekil 2’de gösterildi. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin molekül ağırlığı jel filtrasyon kromatografisi kullanarak da 25 kDa olarak belirlendi.



Şekil 2. CM-Selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan proteaz enziminin SDS-PAGE fotoğrafı. *(I: CA 29 kDa, II: Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi)

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

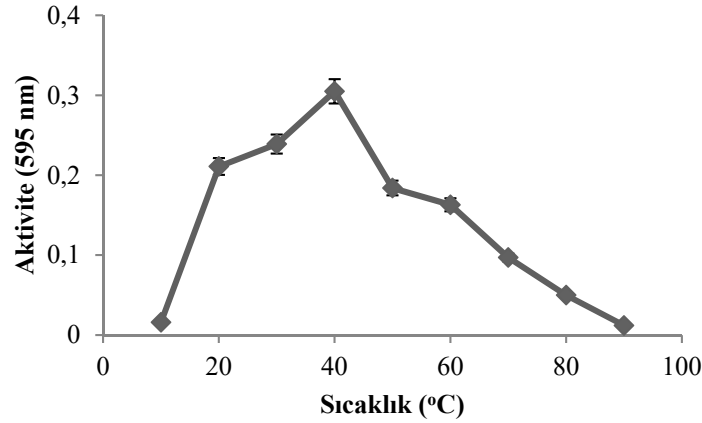
Optimum pH belirleyebilmek için pH 4-9 aralığında aktivite ölçümleri yapıldı. pH 4-5 için 0,1 M asetat tamponu, pH 6-7 için fosfat tamponu, pH 8-9 için Tris-HCl tamponu kullanıldı. pH değişimine karşı proteolitik aktivite miktarı Şekil 3’de verildi. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin optimum pH’sı 7.0 olarak bulundu.



Şekil 3. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine pH’nın etkisi

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

Optimum sıcaklığı belirlemek için 10-90°C'de aktivite ölçümleri yapıldı. Sıcaklık değişimine karşı proteolitik aktivite miktarı Şekil 4' de gösterildi. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin en yüksek aktivite ölçümünün alındığı sıcaklık 40 °C olarak belirlendi.



Şekil 4. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

3.7. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi

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

Hidrolizlenen iki substrat için 1/V'ye karşılık 1/[S] Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafiklerden yararlanarak V_{max} ve K_m değerleri ayrı ayrı hesaplandı (Tablo 2) ve elde edilen sonuçlardan kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinden saflaştırılan proteaz enziminin ilgisinin en çok kazein substratına karşı olduğu belirlendi.

Tablo 2. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin substrat spesifikliğı sonuçları

Substrat	KM (μM)	V _{max} ($\mu\text{g/mL.dak}$)
Kazain	1.33	1.24
Hemoglobin	2.90	1.4
Azokazein	2.54	1.87
Jelatin	0	0
Azoalbumin	0	0

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

Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivitesi üzerine 10 mM, 1 mM ve 0,1 mM HgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, FeCl₂, FeCl₃, NiCl₂ MgCl₂ gibi metal iyonlarının ve SDS, EDTA ve β -merkaptotanol bileşiklerinin etkileri substrat olarak kazain kullanılarak incelendi.

Değişen kimyasalların farklı konsantrasyonlarının varlığında saflaştırılan proteaz enziminin proteolitik aktivite değişim değerleri çizelge halinde gösterilmiştir (Tablo 3). Tablo 3’de Mg²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ ve Ca²⁺, katyonlarının düşük konsantrasyonlarda kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesini artırdığını, Ni²⁺ katyonunun ise kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimini kısmen inhibe ettiği, Hg²⁺ katyonunun ise düşük konsantrasyonlarda enzimin aktivitesini etkilemediği belirlendi. FeCl₃ hariç yüksek konsantrasyonlardaki katyonların kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enziminin aktivitesini azalttığı gözlemlendi.

Yapılan deneylerde SDS ve EDTA’ nın düşük konsantrasyonlarında enzimin aktivitesinin kısmen inhibe olduğu, kullanılan tüm kimyasalların yüksek konsantrasyonlarda enzimi tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir (Tablo 3). β -merkaptotanol varlığında ise enzimin aktivitenin düşmesi saflaştırılan enzimde disülfit bağlarının bulunduğunu göstermektedir. β - merkaptotanol disülfit bağlarını kırarak enzimin üç boyutlu yapısını değiştirdiği ve aktivitesini kaybetmesine neden olduğu, EDTA varlığında ise aktivitenin düşmesi enzimin kofaktör olarak metal iyonunu kullandığını göstermektedir.

Tablo 3. Kır menekşesinden (*Viola odorata*) saflaştırılan proteaz enzimi aktivitesi üzerine bazı kimyasalların etkisinin sonuçları

Kontrol	Konsantrasyon (mM)	Proteolitik Aktivite (%)	Konsantrasyon (mM)	Proteolitik Aktivite (%)	Konsantrasyon (mM)	Proteolitik Aktivite (%)
METAL İYONLARI						
Kontrol	-	100	-	100	-	100
Mg²⁺	0.1	108.28	1	102.8	10	71.15
Ca²⁺	0.1	103.19	1	97.2	10	90.19
Mn²⁺	0.1	97.70	1	96.18	10	89.43
Ni²⁺	0.1	97.71	1	86.05	10	60.83
Hg²⁺	0.1	98.03	1	94.33	10	80.26
Fe²⁺	0.1	109.31	1	95.92	10	73.06
Fe³⁺	0.1	111.34	1	112.26	10	104.21
KİMYASALLAR						
Kontrol	-	100	-	100	-	100
SDS	0.1	56.81	1	33.25	10	5.48
EDTA	0.1	20.89	1	8.40	10	2.17
β-merkaptöetanol	0.1	11.40	1	8.28	10	0.51

3.9. Aroma Bileşenlerinin Headspace GC/MSD ile Analiz Sonuçları

Kır menekşesinin (*Viola odorata*) aroma maddeleri Headspace GC/MSD kullanılarak belirlendi. Kır menekşesinin ekstraksiyon işlemi sonunda vial üst kısmında biriken aroma maddeleri 14 psi basınca sahip helyum gazı ve ısıtılmış bir transferlile hattı ile GC/MSD'ye gönderildi ve analiz bu şekilde gerçekleştirildi. Analizden elde edilen sonuçlar Tablo 4'de gösterildi. In-House bir metodun kullanıldığı analiz sonucunda kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinde hekzanal (% 3,01), 2-hezenal (% 19.31), 1-hekzanol (% 13.28), heptanal (% 1.76), 1-okten-3-ol (% 38.11), 3-oktanon (% 2.23), 2-pentil-furan (% 1.99), oktanal (% 1.22), nonanal (% 3.32), 1,4-dimethoksi-benzen (% 8.89) ve 2-undekanon-6,10-dimethyl (% 2.41) bileşenlerine rastlanılmıştır.

Tablo 4. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin aroma verici bileşen yüzdeleri

No	Bileşen Adı	Alıkonma Zamanı (dak.)	Yüzdesi (%)
1	Hekzanal	0.733	3.01
2	2-Hekzenal	0.963	19.31
3	1-Hekzanol	1.040	13.28
4	Heptanal	1.267	1.76
5	1-Okten-3-ol	1.991	38.11
6	3-Oktanon	2.084	2.23
7	2-pentil-furan	2.137	1.99
8	Oktanal	2.282	1.22
9	Nonanal	3.825	3.32
10	1,4-dimethoksi-benzen	4.872	8.89
11	2-Undekanon-6,10-dimetil	14.623	2.41

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

Tiamin (B₁ vitamini), Riboflavin (B₂ vitamini), Nikotinamid (B₃ vitamini), Nikotinik asit (B₃ vitamini), Pantotenik asit (B₅ vitamini), Piridoksin (B₆ vitamini), Biotin (B₇ vitamini), Folik asit (B₉ vitamini), Siyanokobalamin (B₁₂ vitamini) ve Askorbik asit (C vitamini), UPLC-MS/MS (Waters Acquity Ultra Performance LC, Xevo TQ-S MS-MS) cihazı ile analiz edildi. Ayrım Acquity UPLC BEH C18 kolonu (1,7 µm 2,1x100 mm) kullanılarak 40 °C'da gerçekleştirildi. Numune sıcaklığı 10 °C ve enjeksiyon hacmi 1 µL'dir. Mobil faz olarak A solvent hattında % 0,5'lik CH₃COOH içeren H₂O, B solvent hattında ise % 0,5'lik CH₃COOH içeren CH₃CN kullanıldı. İlk önce 6 noktalı kalibrasyon eğrileri çizilen tüm vitaminler daha sonra cihazda analiz edilmiş ve miktar tayinleri yapılmıştır (Tablo 5). Yapılan analizler sonucunda nikotinik asit (0.28 ± 0.13), piridoksin (0.39 ± 0.03), A vitamini (0.12 ± 0.06) ve E vitamini (0.09 ± 0.02) bulunmuştur.

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

Hekzan ekstraksiyonu ile elde edilip, temizlenen çözelti HPLC-DAD cihazı ile analiz edildi. Dedeksiyon A vitamini için 325 nm, D₂, K₁ ve K₂ vitaminleri için 260 nm ve E vitamini için ise 285 nm dalga boylarında ve ayrım Poroshell 120 EC-C18 kolonu (2,7 µm 4,6 x 100 mm) kullanılarak 40 °C'de gerçekleştirildi. Numune sıcaklığı 20 °C ve enjeksiyon hacmi 20 µl'dir. Mobil faz olarak 0,5 mL/dk. akış hızı ile CH₃OH:H₂O (95:05) kullanılmıştır.

Tablo 5. Kır menekşesinde (*Viola odorata*) bulunan, suda çözünebilen vitaminlerin UPLC-ESI-MS/MS ile analiz sonuçları (mg/100g kuru ağırlık \pm standart sapma).

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

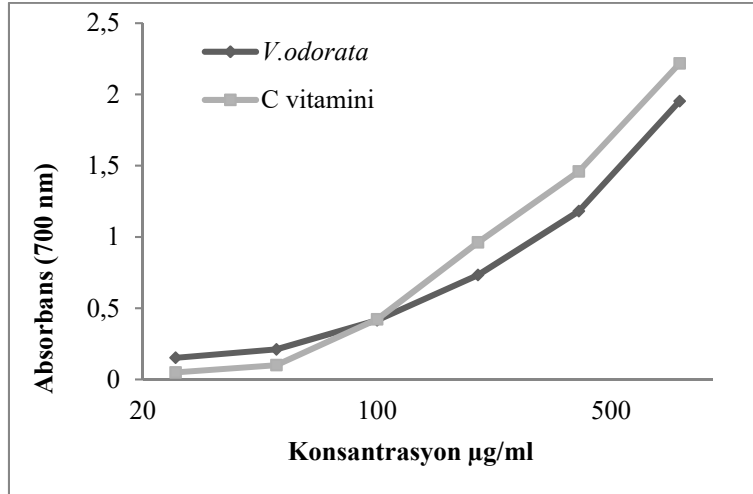
Tablo 6’da görüldüğü gibi kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin A, D, E ve K vitamin içeriği verilmiştir. Yapılan analizlerde kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinin çiçeklerinin A vitamini ve E vitamini içerdiği belirlendi.

Tablo 6. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde bulunan A, D, E ve K vitaminlerinin HPLC/DAD ile analiz sonuçları (mg/100g kuru ağırlık \pm standart sapma).

No	Vitamin Adı	R.T. (dk)	Viola odorata
1	A vitamini	3.567	0.12 \pm 0.06
2	D ₂ vitamini	7.056	< RL
3	E vitamini	10.436	0.09 \pm 0.02
4	K ₁ vitamini	20.142	< RL
5	K ₂ vitamini	9.504	< RL
6	Ergosterol, (Provitamin D ₂)	8.490	< RL

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) metanol ekstresi için indirgeme gücü tayini Oyaizu yöntemine göre yapıldı [21]. Standart olarak kullanılan C vitamini ile kır menekşesinin metanol ekstresinin indirgeme gücü tayin edildi, elde edilen sonuçlarla konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi ve Şekil 5'de gösterildi. Şekil 5’e bakıldığında kır menekşesinden (*Viola odorata*) alınan ekstrelerin C vitaminine yakın aktivite gösterdiği görülmektedir.



Şekil 5. Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisinde indirgeme gücü tayini sonuçları.

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinin radikal uzaklaştırma aktivitesi 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH•) yöntemiyle yapıldı [22]. Reaksiyon ortamındaki DPPH• konsantrasyonunu bulmak için 517 nm’ de ölçüm alındı. Absorbans değeri kullanılarak % DPPH• kapasitesi belirlendi. Sonuçlar Tablo 7’de verildi. Kontrol olarak BHA ve vitamin C standartları kullanıldı. Tablo 7’e bakıldığında metanol ekstresinin su ekstresine göre daha aktif olduğu görülmektedir [28].

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) bitkisi ekstrelerinde metal şelat aktivitesi tayini Dinis yöntemine göre yapıldı [23]. Yapılan işlemler sonucunda 562 nm’de absorbans okundu ve okunan absorbanslardan % inhibisyon aktivitesi hesaplandı. Kontrol olarak EDTA standardı kullanıldı. Sonuçlar Tablo 7’de verildi. Elde edilen sonuçlara göre kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinden su ekstresi metanol ekstresine göre daha aktif olduğu belirlendi [29].

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinde H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri yöntemine göre yapıldı [24]. Yapılan işlemler ve inkübasyon sonunda 230 nm’de çözeltinin absorbansı okundu ve % H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesi hesaplandı. Kontrol olarak vitamin C ve kersetin standartları kullanıldı ve

sonuçlar Tablo 7’de verildi. Tablo 7’de verilen sonuçlara göre kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinden metanol ekstresi su ekstresine göre daha aktif olduğu belirlendi.

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

Kır menekşesi (*Viola odorata*) ekstrelerinde toplam fenolik bileşiklerin varlığı Silinkart ve Singleton yöntemlerine göre yapıldı [25]. Bu yöntem doğrultusunda yapılması gereken tüm işlemler yapıldı ve sonrasında 700 nm dalga boyunda çözeltinin absorbansı okundu. Gallik asit için hazırlanan standart grafiğinden faydalanılarak elde edilen denklemden ($\text{Absorbans} = 0,0008x + \text{Gallikasit}(g)$) toplam fenolik bileşiklerin miktarları 27, 3µg GAE/mg iken su ekstresi için 41,8 µg GAE/mg olarak belirlendi [30].

Tablo 7. Serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi, Metal şelat aktivitesi, H₂O₂ uzaklaştırma aktivitesi sonuçları.

Örnek	Serbest radikal uzaklaştırma aktivitesi IC ₅₀ (µg/ml)	Metal şelat aktivitesi IC ₅₀ (µg/ml)	H ₂ O ₂ uzaklaştırma aktivitesi IC ₅₀ (µg/ml)
Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) su ekstresi	228.2±5.7	340.1±1.2	617±5.7
Kır menekşesi (<i>Viola odorata</i>) metanol ekstresi	197.5±8,3	392.7±3,5	560±7,8
BHA	48.47±3.7	-	-
Vitamin C	7.2±2.1	-	20.8±0.73
EDTA	-	21±0.9	-
Kersetin	-	-	49.3±2.38

Kaynaklar

- [1] Marcussen, T. (2006) Allozymic variation in the widespread and cultivated *Viola odorata* in western Eurasia, Bot J Linn Soc, 151: 563-572.
- [2] Beyazoglu, O. (2005) *Tohumlu Bitkiler Sistematigi*, Esen Ofset Matbaacılık, ISBN:975-98513-6-9, Trabzon, 125s.
- [3] Valentine, D.H., Merxmüller, H. ve Schmidt, A. (1968) *Viola* L., 270-282, Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. ve Webb,

- D.A. (editörler), *Flora Europaea*, 2. Cilt, Cambridge University Press, Cambridge, 433s.
- [4] Hulten, E. ve Fries, M. (1986) Atlas of North European vascular plants north of the Tropic of Cancer, 2.cilt, Koeltz Scientific Books, Königstein,1172s.
- [5] Marcussen, T. ve Borgen, L. (2000) Allozymic variation and relationships within *Viola subsection Viola* (Violaceae), *Plant Syst Evol*, 223: 29–57.
- [6] Leporatti, M.L. ve Ivancheva, S. (2003) Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy, *J Ethnopharmacol*, 87: 123–142.
- [7] Halberstein, R. (2005) Medicinal plants: historical ve cross-cultural usage patterns, *Ann Epidemiol*, 15: 686–699.
- [8] Lev, E. (2006) Ethno-diversity within current ethno-pharmacology as part of Israeli traditional medicine-a review, *J Ethnobiol Ethnomed*, 2: 4.
- [9] Papas, A.M. (1996) Determinants of antioxidant status in humans, *Lipids*, 31: 77–82.
- [10] Çetintaş, Y. (2013) *Sarcosphaera crassa* (santi) Pouz. türünün pişirilmeyle kimyasal bileşimlerinin ve biyoaktivitelerinin değişiminin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 128s.
- [11] Erden, M. (1992) Serbest radikaller, T. *Klin. Tıp Bilimleri Dergisi*, 12: 201-207.
- [12] Akkuş, I. (1995) Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri, *Mimoza yayınları*, Konya, 134s.
- [13] Cook, N.C. ve Samman, S. (1996) Flavonoids-chemistry metabolism cardioprotective effects and dietary sources, *Nutr Biochem*, 7: 66–76.
- [14] Taylor, J.M., Richardson, T. (1979). Applications of microbial enzymes in food systems and in biotechnology. *Advances in Applied Microbiology*. 25, 7-31.
- [15] Kalisz, M.H. (1988). Microbial Proteinases. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 36, 3-29.
- [16] Fadıoğlu, S. (2001) Immobilization and characterization of ficin, *Nahrung*, 45 (2): 143–146.
- [17] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680–685.
- [18] Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding, *Anal Biochem*, 72: 248-254.

- [19] Whitaker DR(1963). Criteria for characterizing cellulases, In E. T Reese [ed.], Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials. Pergamon Press, New York, pp. 51-70.
- [20] Pauling, L. (1973) Die Natur der chemischen Bindung, *Chemie-Verlag*, Weinheim, 66 (1): 470-523.
- [21] Oyaizu, M. (1986) Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *Jpn J Nutr*, 44: 307–315.
- [22] Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199–1200.
- [23] Dinis, T.C., Madeira, V.M. ve Almeida, L.M. (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers, *Arch Biochem Biophys*, 315: 161-169.
- [24] Ruch, R.J., Cheng S.J. ve Klaunig, J.E. (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, *Carcinogenesis*, 10 (6): 1003-1008.
- [25] Slinkard, K. ve Singleton, V.L. (1997) Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods, *Am J Enol Viticult*, 28: 49–55.
- [26] Demir, N., Nadaroglu, H., Topal, M., Demir, Y. (2011) A cystein protease from Asteraceae (*Centaurea aegialophila*), *Journal of The Chemical Society of Pakistan*, 33(5): 707-714.
- [27] Nadaroglu, H., Demir, N. (2012) Purification and characterization of a novel serine protease compositain from Compositae (*Scorzonera hispanica L.*), *European Food Research and Technology* 234 (6): 945-953.
- [28] Nadaroglu H., Demir Y., Demir N., The antioxidant and radical scavenging activities of *Iris germanica* (Iridaceae), 2007, *Pharm. Chem. J.*, 41 (8) 86-91.
- [29] Nadaroglu H., Demir N., Demir Y., Antioxidant and radical scavenging activities of capsules of caper (*Capparis spinosa*), 2009, *Asian J. Chem.*, 21 (7) 5123-5134.
- [30] Demir, N., Gungor A.A., Nadaroglu, H., Demir, Y., The antioxidant and radical scavenging activities of Primrose (*Primula vulgaris*) *European Journal of Experimental Biology* 2014, 4(2):395-401.