

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REZENE (*Foeniculum vulgare*) BİTKİSİNİN BAZI METABOLİK ENZİMLER
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

NİLÜFER ÜNLÜBAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. ŞEBNEM SELEN İŞBİLİR

Edirne-2025

NİLÜFER ÜNLÜBAY'ın hazırladığı “**REZENE (*Foeniculum vulgare*) BİTKİSİNİN BAZI METABOLİK ENZİMLER ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından **Kimya** Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

İmza

Prof. Dr. H. Hülya ORAK

.....

Prof. Dr. Hülya YAĞAR

.....

Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR

.....

Tez Savunma Tarihi: 10 / 04 / 2025

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.

İmza

Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR
Tez Danışmanı

.....

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

.....
Doç. Dr. Filiz UMAROĞULLARI
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

10 / 04 / 2025

Nilüfer ÜNLÜBAY

Yüksek Lisans Tezi

Rezene (*Foeniculum vulgare*) Bitkisinin Bazı Metabolik Enzimler Üzerine İnhibisyon Etkisinin Araştırılması

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Rezene (*Foeniculum vulgare*) Maydanozgillere ait keskin kokulu aromatik bir bitkidir. Ülkemizde özellikle Ege Bölgesi'nde arapsacı (yabani rezene) olarak bilinir ve mevsiminde Ege mutfağında sıkça tüketilir. Sunulan tez çalışmasında vücutta bulunan enzimlerden üçü model olarak seçilerek, rezene yapraklarının bu enzimler üzerindeki olası inhibitör etkisinin *in vitro* araştırılması amaçlanmıştır.

Rezene yaprakları %80'lik etanol ile çalkalayıcılı su banyosunda altı saat boyunca ekstrakte edildi. Elde edilen ham ekstraktın karbonhidrat metabolizmasında görev alan α -amilaz, lipid metabolizmasında etkili lipaz ve melanin biyosentezinde görevli tirozinaz enzimlerinin katalitik aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Ekstraktın toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile ve serbest radikal giderme aktivitesi DPPH metodu ile belirlendi. Rezene yapraklarından Clevenger aparatı kullanılarak hidrodestilasyonla uçucu yağ elde edildi ve yağın uçucu bileşenleri GC-MS yöntemiyle analiz edildi. Ayrıca ekstraktın ve uçucu yağın fenolik bileşen içerikleri LC-MS/MS ile belirlendi.

Çalışma sonucunda rezene ham ekstraktının yüksek konsantrasyonlarında α -amilaz ve lipaz enzimlerini inhibe ettiği, ancak tirozinaz enzimini önemli derecede inhibe etmediği gözlemlendi. Toplam fenolik madde miktarı $52,79 \pm 0,84 \mu\text{g GAE/g}$, DPPH radikali giderme gücü için $\text{EC}_{50} = 500 \mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi. LC-MS/MS ile yapılan fenolik bileşen analizinde bitki ekstraktında analizlenen bileşiklerden onaltı adedi tanımlanmış olup, en yüksek oranda absisik asit, indol-3 asetik asit, trans-ferulik asit, rutin, protokateşik asit, p-kumarik asit ve jasmonik asit bulunurken, uçucu yağında en fazla rosmarinik asit olmak üzere on adet bileşik tanımlandı. GC-MS ile yapılan uçucu bileşen

analizinde trans-anetol baskın olmakla birlikte timol, DL-fenkon ve alfa-felandren bileşikleri tayin edildi.

Rezene bitkisi diğer bitkisel kaynaklar gibi fonksiyonel ikincil metabolitlerce zengindir. Bitkinin ham ekstraktının gösterdiği anti-amilaz etkinliği nedeniyle gelecekteki antidiyabetik aktivite çalışmaları için potansiyeli olduğu söylenebilir.

Yıl : 2025

Sayfa Sayısı : 101

Anahtar Kelimeler: Rezene, *Foeniculum vulgare*, Arapsaçı, α -Amilaz, Lipaz, Fenolik bileşen

Master Thesis

Investigation of the Inhibitory Effect of the Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Some Metabolic Enzymes

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

ABSTRACT

Fennel (*Foeniculum vulgare*) is a strongly aromatic plant belonging to the Apiaceae family. It is known as “arapsacı” (wild fennel) in our country, especially in the Aegean Region, and is frequently consumed in Aegean cuisine. In the presented study, it was aimed to investigate in vitro the possible inhibitory effect of fennel leaves on three enzymes selected as a model, which are found in the body.

Fennel leaves were extracted with 80% ethanol in a shaking water bath for six hours. The effect of the obtained crude extract on the catalytic activity of α -amylase, which plays a role in carbohydrate metabolism; lipase, which is effective in lipid metabolism; and tyrosinase, which plays a role in melanin biosynthesis, was investigated. The total phenolic content of the extract was determined by the Folin-Ciocalteu method, and the free radical scavenging activity was determined by the DPPH method. Essential oil was obtained from fennel leaves by hydrodistillation using Clevenger apparatus, and the volatile components of the oil were analyzed by the GC-MS method. Also, the phenolic compounds of the extract and essential oil were determined by the LC-MS/MS method.

As a result of the study, it was seen that fennel crude extract inhibited α -amylase and lipase enzymes at high concentration but did not significantly inhibit the tyrosinase enzyme. The total phenolic substance amount and DPPH radical scavenging power were determined as $52.79 \pm 0.84 \mu\text{g GAE/g}$ and $\text{EC}_{50} = 500 \mu\text{g/mL}$, respectively. In the phenolic compound analysis performed by the LC-MS/MS method, sixteen compounds were detected in the extract, the highest levels of which were abscisic acid, indole-3 acetic acid,

trans-ferulic acid, rutin, protocatechuic acid, p-coumaric acid, and jasmonic acid, while ten compounds were detected in the essential oil, the highest level of which was rosmarinic acid. In the volatile compound analysis performed by the GC-MS method, trans-anethole, thymol, DL-fenchone, and alpha-phellandrene compounds were determined.

The fennel plant, like other plant sources, is rich in functional secondary metabolites. It can be said that it has potential for future antidiabetic activity studies due to the anti-amylase activity shown by the crude extract of the plant.

Year : 2025

Number of Pages : 101

Keywords: Fennel, *Foeniculum vulgare*, Wild fennel, α -Amylase, Lipase, Phenolic compound

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesinden yararlandığım, tez çalışmam boyunca öneri ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR'e,

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen bölüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Deney materyalimin sağlanmasında katkısı olan hocam Prof. Dr. Hülya YAĞAR'a, fenolik bileşen analizinin ve uçucu yağ analizinin yapıldığı Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi (TÜTAGEM)'ne, uçucu yağ eldesinde yardımını aldığım Eczacılık Fak. Farmakognozi ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Özlem DEMİRKIRAN'a, Chemdraw programında moleküllerin çizimlerini yapan Kimya Bölümü Arş. Gör. Dr. Zuhale HOŞGÖR'e,

Bugünlere gelmemi sağlayan maddi-manevi her zaman yanımda olan annem Hamide SAKARYA, babam Özcan SAKARYA, eşim Uğur ÜNLÜBAY, kayın validem Esen ÜNLÜBAY, Kayın babam Murat Tufan ÜNLÜBAY, Kardeşim Nilay ERTUNA ve çocuklarım Duru, Defne ve Doruk ÜNLÜBAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nişasta molekülü üzerinde α -amilaz enziminin etkisi.....	9
Şekil 2.2. Akarbozun kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.3. Lipaz enziminin genel reaksiyonu.....	11
Şekil 2.4. Orlistatin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.5. Tirozinaz enzimi ile melanin sentezi	13
Şekil 2.6. Kojik asidin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 3.1. Doğal ortamında bulunan ve kurutulmuş rezene bitkisi.....	21
Şekil 3.2. p-Nitrofenolpalmitat substratı üzerinde lipaz enziminin etkisi.....	23
Şekil 3.3. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standart grafiği.....	25
Şekil 4.1. Ekstrakt ve standart maddenin DPPH radikali giderme aktivitesi.....	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı referans kaynaklara göre tatlı ve acı rezene tohumunun uçucu yağ bileşenleri.....	5
Çizelge 3.1. Fenolik profil analizine ait cihaz ile ilgili parametreler.....	26
Çizelge 4.1. Akarboz ve ekstraktın α -amilaz enzimini inhibe etme oranları.....	28
Çizelge 4.2. Orlistat ve ekstraktın lipaz enzimini inhibe etme oranları.....	29
Çizelge 4.3. Kojik asidin tirozinaz enzimini inhibe etme oranları.....	30
Çizelge 4.4. Analiz edilen fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları.....	32
Çizelge 4.5. Rezene etanol ekstraktında bulunan fenolik bileşenler ve miktarları.....	37
Çizelge 4.6. Rezene uçucu yağında bulunan fenolik bileşenler ve miktarları.....	39
Çizelge 4.7. Rezene yapraklarından hidrodestilasyon ile elde edilen uçucu yağın bileşenleri ve oranları.....	41

EKLER DİZİNİ

Ek 1a. Etanol ekstraktının fenolik bileşenlerine ait LC-MS/MS kromatogramları	56
Ek 1b. Asidik hidroliz uygulanmış etanol ekstraktının fenolik bileşenlerine ait LC-MS/MS kromatogramları	63
Ek 2a. Uçucu yağın fenolik bileşenlerine ait LC-MS/MS kromatogramları.....	71
Ek 2b. Asidik hidroliz uygulanmış uçucu yağın fenolik bileşenlerine ait LC-MS/MS kromatogramları.....	79
Ek 3. Uçucu yağın uçucu madde bileşenlerine ait GC-MS kromatogramı.....	87

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
EKLER DİZİNİ.....	xi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Rezene (Arapsacı) Bitkisi.....	3
2.1.1. Rezene bitkisi ile ilgili literatür özeti.....	4
2.2. Çalışmada Kullanılan Enzimler ve İnhibitörleri.....	7
2.2.1. α -Amilaz enzimi.....	8
2.2.2. α -Amilaz ve Akarboz.....	9
2.2.3. Lipaz enzimi.....	11
2.2.4. Lipaz ve Orlistat	12
2.2.5. Tirozinaz enzimi.....	13
2.2.6. Tirozinaz ve Kojik asit.....	15
2.3. Bitkilerdeki Fenolik Bileşikler.....	16
BÖLÜM 3	
MATERYAL ve METODLAR.....	18
3.1. Materyaller.....	18
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar.....	18
3.2. Metodlar.....	21
3.2.1. Rezene yapraklarından etanol ekstraktının hazırlanması.....	21
3.2.2. Etanol ekstraktının α -amilaz inhibisyonunun belirlenmesi.....	21
3.2.3. Etanol ekstraktının lipaz inhibisyonunun belirlenmesi.....	22
3.2.4. Etanol ekstraktının tirozinaz inhibisyonunun belirlenmesi.....	23
3.2.5. Etanol ekstraktının toplam fenolik madde miktarı tayini.....	24
3.2.6. Etanol ekstraktının serbest radikal giderme aktivitesinin tayini.....	25
3.2.7. Etanol ekstraktının ve uçucu yağın fenolik bileşen içeriği.....	26
3.2.8. Rezene yapraklarından uçucu yağ eldesi ve uçucu bileşenlerinin analizi.....	26
BÖLÜM 4	
BULGULAR.....	28
4.1. Etanol Ekstraktının α -Amilaz İnhibisyonu.....	28
4.2. Etanol Ekstraktının Lipaz İnhibisyonu.....	29
4.3. Etanol Ekstraktının Tirozinaz İnhibisyonu.....	29
4.4. Ekstraktın Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Serbest Radikal Giderme Aktivitesi.....	30
4.5. Rezene Yaprak Ekstraktının ve Uçucu Yağının Fenolik Bileşen İçeriği.....	31
4.6. Rezene Yaprak Uçucu Yağının Uçucu Bileşenleri.....	41
BÖLÜM 5	
TARTIŞMA.....	42

KAYNAKLAR.....	48
EKLER.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	88



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Yabani rezene olarak bilinen arapsaçı bitkisi Apiaceae (=Maydanozgiller) ailesine ait, kendine has keskin bir kokusu olan ve anasonu andıran aromaya sahip bir bitkidir. Özellikle Ege Bölgesi'nde yaprakları salata olarak veya kavrulmuş hali yemek olarak yenilmektedir. Ayrıca kurutulup bitki çayı olarak ve köklerinden turşu hazırlanarak da tüketilmektedir.

Arapsaçı bitkisi birçok ülkede bitkisel tedavi yöntemleri içinde yer almakta ve çeşitli etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. Kas, kemik ve baş ağrılarında etkili olduğu, mide asitlerini dengelediği, sindirim sistemi rahatsızlıklarını ve adet sancılarını azalttığı, gaz oluşumunu önlediği, yapısında bulunan vitaminler sayesinde göz sağlığını koruduğu, güçlü antibiyotik içeriği ile enfeksiyon giderici olduğu ve öksürüğü kestiği bilinmektedir. Halk arasında şifalı bitki olarak bilinen ve besin olarak tüketilen bu bitki ile ilgili olarak çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır, bunların büyük kısmının meyvelerine (tohumuna) ait olduğu, az kısmının ise toprak üstü kısımlarına ait çalışmalar olduğu görülmektedir.

Rezene ve onun doğada yetişen hali arapsaçı bitkisi, aromatik bitkilerden biri olduğu için literatürde genellikle meyvesinden (tohumlarından) elde edilen uçucu yağının içerik analizi ve antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik ve antitümör gibi biyolojik aktivitelerinin çalışıldığı görülmektedir. Ancak besin olarak tüketilen yapraklarıyla ilgili yapılan çalışmalar daha azdır. Bu sebeple bu tez çalışmasında bitkinin yenilen toprak üstü kısımları (yaprakları) kullanılmış ve bitki ekstraktının model olarak seçilen üç enzim üzerinde inhibe edici etkisinin olup olmayacağı araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmada arapsaçı yapraklardan elde edilen alkolik ekstraktın karbonhidrat metabolizmasında

görevli α -amilaz, lipid metabolizmasında görevli lipaz ve melanin biyosentezinde görev alan tirozinaz enzimlerinin katalitik aktivitesi üzerine etkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Bitkilerin gösterdikleri biyolojik aktiviteleri içerdikleri çeşitli ikincil metabolitlerden, özellikle de polifenolik bileşiklerinden kaynaklanmaktadır. Farklı fenolik bileşik grupları mevcut olup, bunlar farklı biyolojik aktivitelere sahiptirler. Fenolik bileşenlerin en önemli özelliklerinden birisi antioksidan etkiye sahip olmalarıdır. Sebzeler ve meyveler insan diyetindeki fenolik bileşiklerin başlıca kaynaklarıdır. Bu bitki polifenollerini insan sağlığı ve hastalığı durumlarında diyet antioksidanları olarak oksidatif hasara karşı koruma sağlamaktadır. Çalışılan bitkinin fenolik madde miktarını ve içeriğini belirlemek üzere etanolik ekstraktta, spektrofotometrik temelli Folin-Ciocalteu metodu kullanılarak toplam fenolik madde tayini ve LC-MS/MS cihazı ile fenolik bileşen analizi yapılmıştır. DPPH metodu ile de fenolik bileşenlerden kaynaklı antioksidan gücün bir göstergesi olan serbest radikal giderme aktivitesi çalışılmıştır.

Rezene bitkisi tıbbi aromatik bitkilerden biridir. Özellikle tohumları aroma verici olarak gıda sektöründe veya tohumlarından elde edilen yağı parfümeri, kozmetik, ilaç sektörlerinde kullanılmaktadır. Bitkinin tohumunda bulunan biyoaktif bileşenleri, yemek ve salata olarak tüketilen yapraklarında da bulunabileceği için çalışmada bitkinin yapraklarından hidrodestilasyon ile uçucu yağı elde edildi ve bu yağın aroma veren yani uçucu yağ bileşenleri GC-MS ile ve fenolik bileşenleri LC-MS/MS cihazı ile analiz edildi.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Rezene (Arapsacı) Bitkisi

Rezene (*Foeniculum vulgare*) Apiaceae (Umbelliferae=Şemsiyegiller) familyasına ait Akdeniz kökenli, çok yıllık bir bitkidir. Anasonu andıran keskin bir kokuya sahiptir. Tıbbi değeri olan aromatik bitkilerden biri olup, çeşitli iklim koşullarına uyum sağlayabildiği için günümüzde yaygın bir şekilde tarımı yapılmaktadır. Genellikle 1,5 metreye kadar uzayabilen ince ve dik gövdesi, ipliksi çok parçalı yaprakları vardır. Küçük sarı renkli çiçekleri bileşik şemsiye şeklinde bir arada bulunur. Meyvesi 4-10 mm uzunluğunda yeşilimsi gri renkte tohumlardır (Baydar, 2020).

Rezene bitkisinin diğer adı arapsacı olup (Zeybek ve Zeybek, 2002; Seçkin, 2014), rezenenin özellikle yabani olarak doğada yetişen formu arapsacı otu olarak bilinmektedir. Bitki Akdeniz iklimine sahip bölgelerde doğal olarak yetişir ve sıcak, güneşli alanlarda daha iyi gelişir. Işık gereksinimi düşük olduğundan, çok çeşitli toprak koşullarında yetişebilme özelliğine sahiptir. Avrupa, Asya, Kuzey Amerika ve Avustralya gibi farklı kıtalarda üretimi yapılan rezene ticari olarak değerli bir bitkidir (Ahmed vd., 2022). Ülkemizde Batı Akdeniz Bölgesi'nde rezene bitkisinin tarımı yapılmakta (Baydar, 2020), yabani rezene olarak bilinen arapsacı bitkisi ise özellikle Ege Bölgesi'nde mutfaklarda bolca tüketilmektedir. Ege mutfağının önemli otlarından biri olan taze arapsacı bitkisinin salatası ve kavurması yapılmaktadır. Nisan-Mayıs ayı gibi kısa bir dönemde yetiştiği için salamura veya konservesi yapılarak yıl boyu tüketilebilmektedir (URL-1, URL-2).

Bitkinin ticari olarak kullanılan kısmı meyvesi olan tohumlarıdır. Baharat, kozmetik, gıda, parfümeri gibi alanlarda kullanılmakta ve çay olarak tüketilmektedir.

Rezene çayı süt veren annelerin laktasyon süresini uzatır ve bebeklerin gaz sancılarını giderir (Baydar, 2020).

Rezene veya yabani arapsaçı otu geleneksel ve modern tıpta çeşitli hastalık durumlarında kullanılmaktadır. Özellikle sindirim sistemi rahatsızlıklarında gaz giderici ve sindirimi destekleyici olarak (Badgujar vd., 2014), bronşit, öksürük ve soğuk algınlığı gibi solunum yolu hastalıklarında, hormon düzenleyici etkisiyle bilinen anetol bileşeninden dolayı adet düzensizlikleri ve sancılarını azaltmada, antioksidan ve anti-inflamatuvar etkisinden dolayı iltihaplanma durumlarında, göz, kas ve iskeletle ilgili hastalıklarda (Koppula ve Kumar, 2013; Jadid vd., 2023) etkili olduğu bildirilmiştir. Bitkinin topraküstü kısımları Brezilya'da ishal tedavisinde kullanılmaktadır (Brandelli vd., 2009).

Rezene çok yönlü ve hem önleyici hem de tedavi edici sağlık faydalarıyla dikkat çeken bir bitkidir. Yüksek antioksidan içeriği sayesinde yaşlanma sürecini yavaşlatmaya ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltmaya yardımcı olur. Aynı zamanda, bağışıklık sistemini güçlendiren zengin vitamin ve mineral içeriğine sahiptir. Ayrıca metabolizmayı hızlandırarak kilo kontrolüne destek sağlayan özellikleri de bulunmaktadır (Singh, 2020).

Rezenenin kimyasal bileşimi, onu hem gıda hem de tıbbi kullanımlar için çok önemli kılar. Rezene tohumlarında bulunan temel sabit yağ petroselinik asit; uçucu yağında bulunan ana bileşenler ise anetol, fenkon ve estragoldür (Baydar, 2020). Bu bileşenler rezeneye karakteristik bir koku ve tadını verir, bu karakteristik kokusundan dolayı bazı hamur işlerinde, et ve balık yemeklerinde, alkollü içeceklerde kullanılmaktadır. Ayrıca rezene önemli miktarda flavonoidler, tanenler, fenolik asitler ve vitaminleri (A, C ve E) de içermektedir.

2.1.1. Rezene bitkisi ile ilgili literatür özeti

Rezene bitkisininin tatlı rezene (*Foeniculum vulgare* var. dulce) ve acı rezene (*Foeniculum vulgare* var. vulgare) olarak iki farklı varyetesi vardır. Avrupa Farmakopesinde her iki kültür varyetesinin meyvelerine ilişkin monograf bulunmaktadır. Tatlı rezene tohumlarında trans-anetol ve estragol temel bileşen iken, acı rezene tohumlarında fenkon ve trans-anetol ana bileşendir. Çizelge 2.1'de Avrupa Farmakopesi (2002) ve şifalı bitkiler konusunda klinisyenlere önemli bir rehber olan kaynak kitapta

(Gruenwald, Brendler ve Jaenicke, 2000) verilmiş olan tatlı ve acı rezene tohumunun uçucu yağ bileşeni oranları görülmektedir.

Çizelge 2.1. Farklı referans kaynaklara göre tatlı ve acı rezene tohumunun uçucu yağ bileşenleri

	Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopoeia)		PDR için Bitkisel İlaçlar (Physicians Desk Reference for Herbal Medicines)	
	Tatlı rezene	Acı rezene	Tatlı rezene	Acı rezene
Trans-anetol (%)	min 80	min 60	80-90	50-75
Fenkon (%)	max 7,5	min 15	1-10	12-33
Estragol (%)	max 10	max 5	3-10	2-5
Uçucu yağ miktarı	20 mL/kg	40 mL/kg	-	-

2008 yılında Çosge ve ark. rezene tohumlarıyla yaptıkları iki çalışmanın birinde (Çosge, Gürbüz, Kendir & Ipek, 2008) Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi'nin deneme alanında yetiştirdikleri 20 tatlı rezene (*Foeniculum vulgare* Mill. var. dulce) örneğinin uçucu yağ bileşenlerini; diğer bir çalışmalarında ise (Çosge, Kıralan & Gürbüz, 2008) tatlı (*F. vulgare* Mill. var. dulce) ve acı (*F. vulgare* Mill. var. vulgare) rezene örneklerinin yağ asidi ve uçucu yağ bileşenlerini karşılaştırmışlar ve örneklerin ana bileşen trans-anetolün yanında fenkone göre daha yüksek oranda estragol içerdiklerini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Dirican da 2013 yılında yaptığı çalışmada Tokat yöresinde doğal ortamından topladığı 37 yabancı rezene (*F. vulgare* Mill.) örneğinin morfolojik özelliklerini belirlerken, sabit ve uçucu yağ bileşimini analiz etmiştir. Isparta-Atabey Ovası'nda doğal olarak yetişen tatlı rezenenin (*F. vulgare* Mill. var. dulce) büyüme ve gelişme dönemlerinde tohum, sap ve yapraklarındaki uçucu yağ bileşenlerinin değişimi izlenmiş ve bitkinin büyüme süresince önemli farklılıklar olduğu bildirilmiştir (Şanlı, Karadoğan & Baydar, 2008).

Rezene meyveleri (tohumları) laksatif, sedatif, antiseptik özellikli, süt arttırıcı ve bebeklerde gaz sancılarını giderici olduğu için (Gruenwald, Brendler & Jaenicke, 2000; Baydar, 2020) ağırlıklı olarak bitkinin tohumları ve tohumlarından elde edilen uçucu yağı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Araştırmaların bir kısmı tohum uçucu yağının bileşen miktarını ve kalitesini arttırmayı amaçlayan çalışmalardır. Örneğin Kan vd. (2006)

Konya’da azotlu ve çinkolu gübreler kullanarak farklı koşullarda yetiştirdikleri rezenelerin tohumlarında; Karayel ise Kütahya-Gediz’de yetiştirilen rezenelerin (*F. vulgare* Mill.) 1. ve 2. biçme sonrası toplanan tohumlarında (2019) ve ayrıca farklı bor dozları uygulanarak yetiştirilen tohumlarda (2020) uçucu yağ bileşimlerinin değişimlerini araştıran çalışmalar yapmışlardır. Son yıllarda ise rezene bitkisi diğer aromatik bitkilerle karıştırılarak karışımların etkisi araştırılmaktadır. Rezenenin antiseptik özelliğinin defne ilavesiyle değişimi incelenmiş; rezene (*F. vulgare* Mill.) tohumu ve defne yaprağı uçucu yağ karışımının bunların tek başına kullanılmalarına göre nispeten düşük konsantrasyonlarda daha yüksek antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir (Kara, Türkmen & Soylu, 2022). Bir diğer çalışmada rezene (*F. vulgare* Mill.) tohumu tozu ve kekik tozu karışımlarından gıda desteği amaçlı kapsül hazırlanmıştır (El Finou, Bammou, Zaid & El Rhaffari, 2023).

Literatürde rezene tohumlarının biyolojik aktivitesine dair çeşitli çalışmalar da mevcuttur. Bakır (2010) üç farklı bölgeden işlenmemiş ve üç farklı markadan işlenmiş paketlenmiş olarak temin ettiği rezene (*F. vulgaris*) örneklerinin çeşitli metaller, toplam fenolik ve toplam flavonoid madde içeriklerini ve metal şelatlama aktivitesini tayin etmiştir. Aydın (2023) rezene (*F. vulgare*) tohumunun uçucu yağ ve fenolik bileşenlerini analiz ederek, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesini beş farklı metod (FRAP, CUPRAC, DPPH, TPC, TFC) ile incelemiştir. Kuru (2019) ise tez çalışmasında rezene (*F.vulgare* Miller) bitkisinin fitoterapide kullanımını derleyen bir araştırma yapmıştır. Ege Bölgesinde sebze olarak tüketilen bitkilerden olan rezenenin kimyasal analizinde bitki mineral madde bakımından zengin bulunmuştur (İncekara, 2004).

Godavari, Amutha, & Moorthi (2019) rezene (*F. vulgare* Mill.) tohumlarının amilaz ve glukozidaz enzimleri üzerinde hipoglisemik etkisini; Chaudhary vd. (2013) de ACE (anjyotensin dönüştürücü enzim) inhibisyonunu araştırmıştır. Mueed vd. (2023) çalışmalarında rezene tohumlarının antidiyabetik (amilaz ve glukozidaz enzimleri üzerinde), antioksidan, antimikrobiyal ve antitumor aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Sözü geçen çalışmalarda bitkinin tohum kısmı kullanılmıştır. Bitki tohumundan elde edilen esansiyel yağlar antioksidan, antitrombotik, antidiyabetik ve antifungal özellik göstermektedir (Tekgül & Çalışkan Koç, 2020).

Majdoub vd. (2017) rezenenin (*F. vulgare* Mill.) topraküstü kısımlarından maserasyonla aldıkları su ekstraktında toplam fenolik ve flavonoid madde analizi, sekiz metod ile antioksidan aktivite tayini (TBARS, ABTS, DPPH, toplam antioksidan aktivite, Demir II indirgeme, Metal şelatlama, NO ve Süperoksit giderme metodları) ve lipoksigenaz, asetilkolin esteraz, tirozinaz enzimleri için inhibisyon denemesi yapmışlardır.

2.2. Çalışmada Kullanılan Enzimler ve İnhibitörleri

Enzimler, canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Genellikle protein yapısında olan bu moleküller, metabolik süreçlerin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir (Nelson & Cox, 2021). Enzimlerin çoğu, amino asitlerden oluşan polipeptit zincirlerinden meydana gelir ve proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapı düzeylerinde düzenlenmiştir. Enzimin biyolojik aktivitesi, üç boyutlu yapısıyla doğrudan ilişkilidir. Enzimlerin aktif bölgesi, substrat molekülünün bağlandığı ve reaksiyonun gerçekleştiği yüksek derecede özgül bir bölgedir. Bu özellik, enzimin seçici çalışmasını ve biyokimyasal reaksiyonların kontrollü şekilde ilerlemesini mümkün kılar. Enzimlerin bazıları da katalitik aktivitelerini gerçekleştirebilmek için metal iyonları gibi kofaktörlere veya organik yapıli koenzimlere (örneğin NAD⁺ ve FAD) ihtiyaç duyar.

Enzimler gıda işleme, biyoyakıt üretimi, deterjan formülasyonu, kozmetik ve ilaç üretimi gibi birçok endüstride kullanılmaktadır. Örneğin, amilaz ve proteaz gibi enzimler, unlu mamullerde hamurun kalitesini artırmak için kullanılırken, laktaz enzimi süt ürünlerinde laktozun parçalanmasında rol oynar (Garrett & Grisham, 2017). Lipazlar gıda sanayinde unlu mamüllerde lezzet arttırıcı; süt ve süt ürünlerinde süt yağının hidrolizi, peynirin olgunlaştırılması; transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Ayrıca eczacılık, kimya, kağıt ve temizlik sektörlerinde de lipazlar kullanılarak çeşitli uygulamalar yapılmaktadır. Tıp alanında ise, enzim bazlı tedavi yöntemleri ve teşhis araçları, birçok hastalığın yönetiminde kritik bir öneme sahiptir. Tirozinaz enzimi de özellikle melanom hastalığının tedavisinde kullanılmasının yanısıra zirai ilaç kalıntılarının giderilmesi ve bazı patojenlerin tespitine yönelik biyosensör geliştirme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Enzimler biyolojik reaksiyonları hızlandırma kapasiteleri ve yüksek özgülükleri sayesinde bilimsel araştırmaların odak noktası olmayı sürdürmektedir. Bu nedenle, enzimler üzerine yapılan çalışmalar, hem biyokimya bilimindeki temel sorunların anlaşılmasında hem de uygulamalı bilimlerde yenilikçi çözümlerin geliştirilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Enzim inhibitörleri ise enzimlerin katalitik aktivitesini yavaşlatarak veya durdurarak, enzimlerin biyolojik süreçlerdeki işlevini düzenlemekte ve bunun yanı sıra metabolik enzimleri inhibe ederek hastalıkların tedavilerinde kullanılmaktadırlar. Bu açıdan enzim inhibitörleri önemli ilaç molekülü adayı olabilmektedirler. Endüstriyel uygulamalarda da enzim inhibitörleri önemli ve çeşitli rollere sahiptirler (Nelson & Cox, 2021).

Doğal inhibitörler metabolik yolların kontrolünde görev alırlar ve geri bildirim mekanizmalarıyla enzim aktivitelerini düzenlerler. Sentetik inhibitörler ise ilaç geliştirme sürecinde kullanılırlar. Örneğin, HIV proteaz inhibitörleri virüs çoğalmasını engeller, α -amilaz ve glukozidaz inhibitörleri şeker hastalığının tedavisinde, lipaz inhibitörleri kilo kaybı ilaçlarında, tirozinaz inhibitörleri pigmentasyon sorunlarının giderilmesinde ve ACE inhibitörleri ise hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır.

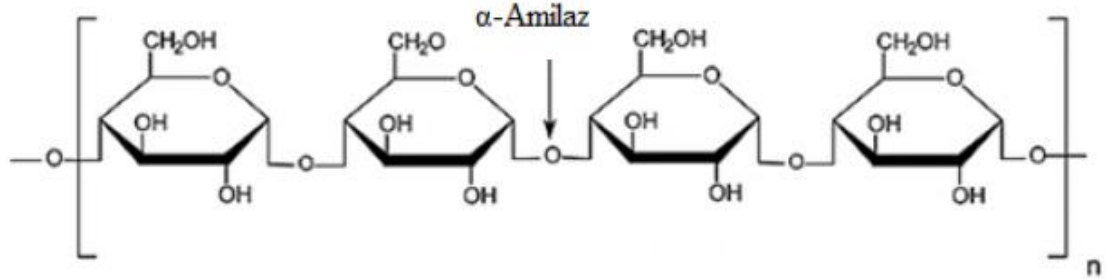
Yeşil çayın eldesi ve kuru kayısıların sarı renginin korunması ise bitki içeriğindeki polifenol oksidaz enziminin inhibe edilmesiyle olan gıda işleme uygulamalarına örnek olarak verilebilir.

2.2.1. α -Amilaz enzimi

α -Amilaz (EC 3.2.1.1) karbonhidrat metabolizmasında temel rol oynayan ve nişasta gibi karmaşık polisakkaritlerin içindeki (α 1,4)-glikozidik bağlarını hidrolize ederek daha küçük şeker birimlerine parçalayan bir enzimdir. Hem hayvan hem de bitki kaynaklı olarak pek çok canlı organizmada bulunmakla birlikte, memelilerde özellikle tükürük bezleri ve pankreasta üretilen şekli sindirim sürecinin önemli bir enzimidir. Yapısında kalsiyum (Ca^{2+}) gibi metal iyonlarına ihtiyaç duyan metaloenzim sınıfına girer (Van der Maarel vd., 2002).

α -Amilaz substratı olan nişasta ve glikojen gibi kompleks karbonhidratların (α 1,4)-glikozidik bağlarını hidrolize ederek maltoz, malto-trioz gibi daha basit şekerlere dönüştürür (Van der Maarel vd., 2002). İnsan vücudunda sindirim ağızda başladığı için

ilk aşamada tükürükte bulunan α -amilaz gıdalarla alınan nişastalı besinleri parçalamaya başlar (Şekil 2.1). Ardından pankreastan salgılanan α -amilaz, ince bağırsakta karbonhidratların sindirimini tamamlayarak monosakkaritlerin emilimine olanak tanır.



Şekil 2.1. Nişasta molekülü üzerinde α -amilaz enziminin etkisi

α -Amilaz seviyeleri ve aktivitesi, bazı hastalıkların tanı ve takip süreçlerinde önemli bir biyokimyasal belirteçtir. Örneğin, pankreas kökenli α -amilazın kandaki seviyesinin artması, pankreas iltihaplanmalarının bir göstergesi olabilmektedir (Streb, Fischer & Khan, 2018). Ayrıca, sindirim sisteminde α -amilazın aşırı aktivitesi veya kontrolsüz karbonhidrat alımı, kan şekeri seviyelerinin hızla yükselmesine neden olabilir. Bu durum, obezite ve tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıkların gelişim riskini artırır.

Son yıllarda α -amilaz inhibitörleri üzerinde yapılan çalışmalar, bu enzimin kan şekeri dengelemesindeki rolüne işaret etmekte ve diyet ile alınan karbonhidratların emilimini azaltarak glisemik kontrolü iyileştirmeyi amaçlamaktadır (Kim vd., 2020). Bu nedenle α -amilaz, diyabet tedavisi için potansiyel hedeflerden biri olarak değerlendirilmektedir. Aynı şekilde diyet takviyeleri ve işlenmiş gıdalardaki α -amilaz aktivitesinin düzenlenmesi, obezite ve metabolik sendrom gibi durumların önlenmesinde stratejik öneme sahiptir (Streb vd., 2018).

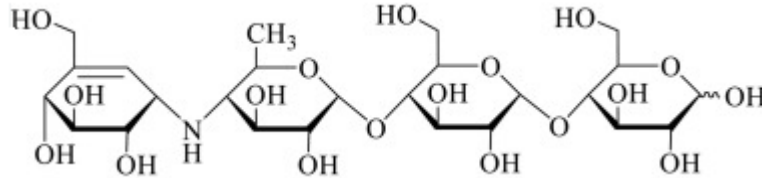
2.2.2. α -Amilaz ve Akarboz

Diabetes mellitus (DM) başta karbonhidrat metabolizması olmak üzere diğer metabolik yolları da etkileyen, kronik, karmaşık bir endokrin rahatsızlığıdır. Kandaki yüksek glukoz ve lipitler vücuttaki çeşitli organları, özellikle böbrek, göz, sinirler ve kan damarlarını etkileyen kronik komplikasyonlara yol açar. Dünya Sağlık Örgütü'nün

(WHO) verilerine göre, günümüzde DM yüksek halsizlik ve ölüme eğilimli bir salgındır. Küresel olarak yaklaşık 387 milyon kişi bu metabolik bozukluktan etkilenmektedir.

Akarboz, ince bağırsakta bulunan α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin aktivitesini engelleyerek kompleks karbonhidratların daha basit şekerlere dönüştürülmesini sınırlar. Bu süreç, karbonhidratların emilim hızını azaltarak yemek sonrası kan şekeri yükselişini geciktirir. Böylece diyabet yönetiminde ek bir tedavi seçeneği olarak, oral antidiyabetik ilaçların etkisini tamamlayıcı nitelikte bir ajan şeklinde kullanılabilir (Chiasson vd, 2002).

Akarboz, mikrobiyal kaynaklı bir pseudo-oligosakkarittir (Şekil 2.2). Yapısında glukoz benzeri üniteler bulunmaktadır, ancak doğal şekerlerden farklı olarak konfigürasyonu ve bağlanma biçimi sayesinde enzimin aktif bölgesine sıkı bir şekilde tutunabilir (Bischoff, 1994). Bu yapısal özelliğinden dolayı akarboz hem α -amilaz hem de α -glukozidaz enzimlerine güçlü bir bağlanma affinitesine sahiptir ve sonuçta enzimlerin doğal substratı olan nişasta ve diğer kompleks karbonhidratlara bağlanmasını engeller. Akarboz, gastrointestinal sistemden zayıf bir şekilde emilir (% 1-2'si) ve plazma yarı ömrü 2 saattir. Bağırsak mikrobiyal florası ve sindirim enzimleri tarafından metabolize edilir ve dışkıyla atılır.

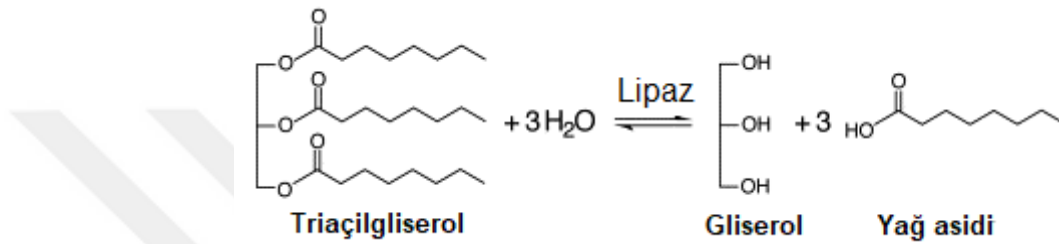


Şekil 2.2. Akarbozun kimyasal yapısı

Akarboz, tip 2 diyabetin yönetiminde önemli bir yere sahiptir. Diyabetli bireylerde yemek sonrası kan şekeri yükselmesi, kardiyovasküler rahatsızlıklar dahil olmak üzere çeşitli komplikasyonların oluşumunda etkilidir. Akarboz, bu dönemde kan şekeri düzeylerini düzenleyerek komplikasyon riskini azaltır. Ayrıca bazı araştırmalar, akarbozun tip 2 diyabetin ortaya çıkma olasılığını düşürebileceğini ve insülin duyarlılığını artırabileceğini göstermektedir (Chiasson vd., 2002).

2.2.3. Lipaz enzimi

Lipazlar (EC 3.1.1.3), lipidlerin (yağların) hidrolizini gerçekleştirerek yağ asitleri ve gliserol oluşumunu sağlayan (Şekil 2.3), vücudun enerji metabolizmasında ve besinlerin sindirilmesinde kritik öneme sahip bir enzim ailesidir (Arroyo vd., 1994). Pek çok canlı türünde bulunan lipazlar, özellikle pankreasta üretilen formuyla insan sindirim sistemi için büyük öneme sahiptir. Bu enzimler, hem vücut sağlığının korunmasında hem de endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.3. Lipaz enziminin genel reaksiyonu

Lipazlar, triasilgliserolleri hidrolize ederek monogliserit, digliserit, yağ asitleri ve gliserol oluşumuna aracılık eder. Bu süreç diyetle alınan yağların sindirimi ve enerji elde edilmesi için temel basamaklardan biridir. Lipazların çoğu, nötr veya hafif alkali pH değerlerinde en yüksek aktiviteye sahiptir ve bu özellikleri, mide-bağırsak sisteminin uygun bölgelerinde etkili çalışmaları için avantaj sağlar (Hasan, Shah, Hameed & Ahmed, 2006).

Lipazlar sadece biyolojik sistemlerde değil, endüstriyel süreçlerde de önemli rol oynar. Özellikle gıda, deterjan, ilaç, biyoyakıt ve deri işleme endüstrilerinde lipazlar yaygın olarak kullanılır. Teknolojik açıdan mikrobiyal kaynaklı lipazlar büyük öneme sahiptir; zira mikroorganizmalar hızlı üreme, genetik kolay modifikasyon ve yüksek aktivite gösterme potansiyelleri ile endüstriyel üretimde tercih edilir (Hasan vd., 2006). Günümüzde rekombinant DNA teknolojileri sayesinde, lipaz üretimi hedeflenen özelliklere göre optimize edilebilmekte ve enzim stabilitesi, pH direnci, sıcaklık toleransı gibi faktörler geliştirilebilmektedir (Arroyo vd., 1994).

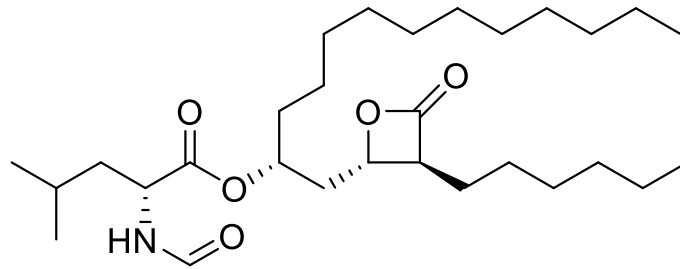
Metabolik hastalıklar, obezite ve diyabet gibi durumlarda, lipazın rolü dolaylı da olsa önemlidir. Yağ metabolizmasıyla ilgili bozukluklar, insülin direnci ve

kardiyovasküler riskin artışı ile ilişkilendirilir. Dolayısıyla lipazın fonksiyonel dengesinin korunması, bu tür metabolik hastalıkların önlenmesi ve yönetiminde kritik bir etmen olarak değerlendirilebilir.

2.2.4. Lipaz ve Orlistat

Obezite, günümüzde dünya genelinde önemli bir sağlık sorunudur. Fazla kilolu veya obez bireylerde kalp-damar hastalıkları, tip 2 diyabet, yüksek tansiyon ve bazı kanser türlerinin görülme riski artmaktadır (WHO, 2000). Bu nedenle obezite tedavisi, sadece kilo vermeyi değil, aynı zamanda uzun dönemli kilonun korunmasını ve buna bağlı sağlık risklerinin azaltılmasını hedefler. Obezite tedavisinde, bireylerin ihtiyaçlarına göre kişiye özel yaklaşımlar uygulanması önemlidir. Temel tedavi yaklaşımı; beslenme düzeninin iyileştirilmesi, düzenli fiziksel aktivite ve davranış değişiklikleridir. Ancak bu yöntemlerin yanı sıra farmakolojik tedaviler de önemli bir destek sağlamaktadır (Bray & Ryan, 2012). Orlistat, obezite tedavisinde sıkça kullanılan ilaçlardan biridir. Bu ilaç, ince bağırsakta yağların sindirilmesini sağlayan lipaz enzimlerini inhibe ederek yağ emilimini azaltır.

Orlistat, başlangıçta *Streptomyces toxytricini* adlı bakteriden elde edilen lipstatin adlı doğal bir lipaz inhibitörünün yarı sentetik türevidir (Hadvary vd., 1988). Kimyasal yapısında, lipaz enzimine bağlanarak işlevini engelleyen bir beta-lakton halkası (Şekil 2.4) bulunur. Bu yapı, ilacın enzim aktif bölgesindeki serin amino asidine kovalent olarak bağlanmasını sağlar.



Şekil 2.4. Orlistatın kimyasal yapısı

Orlistat suda çok az çözünür ve büyük oranda bağırsak lümeninde etkilidir. Ağız yoluyla alınan orlistatın vücut tarafından emilimi çok düşüktür; genellikle dozun %1'inden azı kana karışır (Heck vd., 2000). Bu durum ilaçtan kaynaklanabilecek sistemik

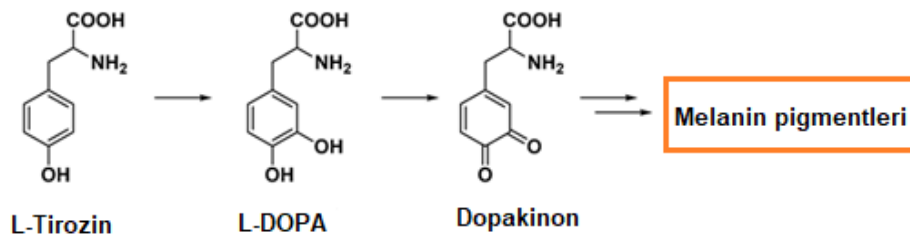
yan etkilerin daha az görülmesine neden olur. Emilmiş az miktardaki kısmın büyük bölümü ise karaciğerde metabolize olarak inaktif hale gelir. İlaç esasen dışkı ile atıldığından sistemik etkileri sınırlı kalır.

Besinlerle alınan yağlar, pankreas ve gastrik lipaz enzimleri sayesinde serbest yağ asitleri ve monogliseritlere parçalanarak vücut tarafından emilir. Orlistat özellikle pankreatik lipazı geri dönüşümsüz inhibe ederek yağların sindirimi önemli ölçüde azaltır. Sindirilemeyen yağlar dışkı yoluyla atılır ve günlük enerji alımı düşmüş olur. Bu da uzun vadede kilo kaybını destekler. Günümüzde birçok ilaç firması orlistat etken maddesini içeren zayıflama preparatlarını üretmektedir.

Orlistatın en yaygın yan etkileri, sindirilemeyen yağların atılmasına bağlı olan bağırsak hareketlerindeki değişikliklerdir. Yağlı veya gevşek dışkılama, gaz ve karın krampları gibi gastrointestinal şikayetler görülebilir (Sjöström vd., 1998). Uzun süreli kullanımda yağda çözünen vitaminlerin (A, D, E, K) emiliminin azalması söz konusu olabilir ve bu durum vitamin takviyesini gerektirebilir.

2.2.5. Tirozinaz enzimi

Tirozinaz (EC 1.14.18.1) doğada yaygın olarak bulunan ve özellikle melanin sentezi başta olmak üzere pek çok biyolojik süreçte rol oynayan önemli bir enzimdir (Kim & Uyama, 2005). Bitkilerde, hayvanlarda, ayrıca mantarlar ve bazı mikroorganizmalarda da bulunabilen tirozinaz, fenolik bileşiklerin oksidasyonu yoluyla çeşitli pigmentlerin oluşumunu sağlar (Solano, 2014).



Şekil 2.5. Tirozinaz enzimi ile melanin sentezi

Tirozinaz enzimi, yapısında iki bakır iyonu içeren bir metaloproteindir. Tirozinaz melanin biyosentezinde rol oynar (Şekil 2.5) ve tirozinin L-DOPA'ya (3,4-dihidroksi-L-

fenilalanin) o-hidroksilasyonunu ve L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonunu katalize eder. Tirozinazın monofenollerin karşılık gelen kateşollere o-hidroksilasyonu (tirozinin L-DOPA'ya dönüşümü) “monofenolaz veya kresolaz aktivitesi” ve monofenollerin karşılık gelen o-kinonlara oksidasyonu (L-DOPA'nın dopakinona dönüşümü) “difenolaz veya katekolaz aktivitesi” olarak bilinir. Dopakinonun enzimatik olmayan oksidasyonu dopakromu oluşturur ve son olarak bir dizi polimerizasyon reaksiyonunun sonucunda melanin pigmentleri oluşur (Agunbiade & Roes-Hill, 2022).

Melanin deri, saç ve gözlerdeki biyolojik pigmenttir ve cildi güneş ışınlarının UV fraksiyonundan ve serbest radikal hasarından korur. Tirozinaz melanin biyosentezindeki ilk ve hız sınırlayıcı olan basamakları katalizler. Bu sebeple melanin sentezinde merkezi bir role sahip olduğundan, tirozinaz melanin üretimi ile ilgili hastalıkların çoğunda önemli bir hedeftir. Örneğin:

- Hipopigmentasyon bozukluklarında: Tirozinaz aktivitesinin düşük olması veya tirozinaz proteininin yapısında meydana gelen genetik değişiklikler, derideki melanin miktarının azalmasına neden olur. Bu durum albinizm gibi hipopigmentasyon bozukluklarının ortaya çıkmasında etkili olabilir (Oetting & King, 1999).
- Hiperpigmentasyon Problemleri: Tirozinaz aktivitesinin artması veya düzensiz kontrolü, melanin miktarının artmasına ve ciltte istenmeyen lekelerin oluşmasına yol açabilir. Melazma ve güneş lekeleri gibi sorunlar, tirozinazın aşırı aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir (Solano, 2014).
- Kronik Hastalıklar ve Kanserler: Melanin sentezinde rol oynaması nedeniyle, tirozinaz özellikle cilt kanseri (melanom) çalışmalarında odak noktalarından biridir. Melanomda tirozinaz eksprese eden hücrelerin varlığı tanısal ve terapötik yaklaşımlara öncülük edebilir (Kim & Uyama, 2005).

Tirozinaz kozmetik endüstrisinde de cilt sağlığının korunmasında ve pigmentasyon bozukluklarının tedavisinde sağlık açısından stratejik bir hedeftir. Tirozinaz inhibitörleri cilt beyazlatıcı ürünlerin geliştirilmesinde kullanılmakta ve böylece hiperpigmentasyon problemlerinin giderilmesinde yardımcı çözümler sunulabilmektedir.

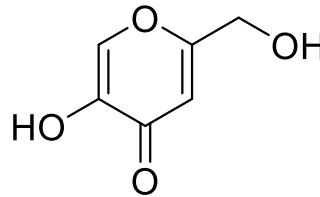
Ayrıca polifenol oksidaz ailesinden olan tirozinaz meyve-sebzelerin toplanması, işlenmesi, depolanması sırasında meydana gelen kararma reaksiyonlarındaki rolü

nedeniyle tarım alanında da önemlidir. Bazı durumlarda tirozinaz aktivitesi belirgin organoleptik özelliklerin oluşması için (kuru üzüm, çay ve kakaoda olduğu gibi gibi) gerekli olmasına rağmen; tarımda bu tür enzimatik esmerleşme reaksiyonları büyük ekonomik etkiye sahip önemli bir sorundur.

Son yıllarda çok sayıda yeni tirozinaz inhibitörü arama çalışmaları hız kazanmıştır. Çünkü çok yönlü bir enzim olan tirozinaz Parkinson hastalığı ile de ilişkilendirilmiştir. Tirozinaz enzimi, beynin dopamin nörotransmitterince zengin olan substantia nigra bölgesindeki nöronların pigmentasyonunda yani nöromelanin üretiminde de rol alır. Ancak katalizlediği bazı oksidasyon reaksiyonları sonucu beyin için toksik metabolitlerin oluşumuna ve Parkinson hastalığı ile ilişkili nöronların hasarına yol açar (Asanuma, Miyazaki & Ogawa, 2003; Mendes, Perry & Francisco, 2014). Bu yüzden tirozinaz inhibitörlerinin kullanımı Parkinson hastaları için de söz konusu olup, tirozinaz enziminin katalitik aktivitesinin durdurulması ilaç araştırmalarında önemli bir hedef haline gelmiştir. Sağlık alanının yanı sıra kozmetik ve tarım alanlarında kullanılmak üzere doğal ve olumsuz etkileri daha az olan tirozinaz inhibitörleri arayışı da devam etmektedir.

2.2.6. Tirozinaz ve Kojik asit

Kojik asit *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilen bir mantar metabolitidir. Halihazırda endüstride kullanılan tirozinaz inhibitörlerinden (hidrokinonlar, arbutin, aloesin, askorbik asit, salisilik asit, retinoik asit, azelaik asit (Kima & Uyama, 2005; Chang, 2009) en çok bilinen ve inceleneni kojik asittir. Kojik asit tirozinazın katekolaz aktivitesini yavaşça ve geri dönüşümlü bir şekilde inhibe ederek melanin üretimini baskılar. Bu inhibitör etkinin temelinde, kojik asidin tirozinazın aktif merkezindeki bakır iyonlarına bağlanarak substratın oksidasyonunu engellemesi yatar (Kim & Uyama, 2005).



Şekil 2.6. Kojik asidin kimyasal yapısı

Kojik asit Şekil 2.6’da görüldüğü gibi, kimyasal yapı olarak 5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-4-piron iskeletine sahip bir moleküldür. Özellikle kozmetik sektöründe cilt beyazlatma amaçlı ürünlerde yaygın olarak kullanılmakta ve melanin sentezini azaltmaktadır (Kim & Uyama, 2005). Günümüzde enzimatik esmerleşmeyi önlemek için bir gıda katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır.

Kojik asit, başta hiperpigmentasyon sorunları olmak üzere yaşlılık lekeleri, güneş lekeleri ve melazma gibi cilt lekelerini azaltmada umut vadeden doğal bir bileşik olarak öne çıkmaktadır (Chang, 2009). Bu nedenle cilt bakım kremleri, serumlar ve losyonlarda etkin bir bileşen olarak yer alır. Kojik asit kozmetik endüstrisindeki sentetik tirozinaz inhibitörlerine karşı daha doğal bir alternatif olmaktadır. Bununla birlikte kojik asit, arbutin, salisilik asit, azelaik asit gibi standart tirozinaz inhibitörlerine ek olarak, son yıllarda polifenoller, benzaldehit ve benzoat türevleri, uzun zincirli lipitler gibi doğal veya sentetik başka yeni inhibitörler de keşfedilmektedir.

2.3. Bitkilerdeki Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler yapılarında en az bir fenol halkası bulunduran çoğunlukla bitkiler tarafından sentezlenen doğal ürünlerdir. Bu bileşikler bitkilerin büyüme, gelişme, savunma ve çevresel koşullara uyum sağlamasında önemli bir rol oynar (Dixon & Paiva, 1995). Fenolik bileşikler bitkilerde genellikle “ikincil metabolitler” olarak adlandırılır ve bitki türüne, gelişim evresine ve çevresel koşullara bağlı olarak çok farklı tür ve miktarlarda bulunabilirler.

Fenolik bileşikler bitkileri zararlı organizmalara, hastalıklara ve UV ışınlarının olumsuz etkilerine karşı korumada etkindir. Bitkilerin dayanıklılığını artırır ve çeşitli stres koşullarına daha iyi uyum sağlamasına yardımcı olurlar. Geniş bir yelpazede dağılım ve çeşitlilik gösteren fenolik bileşikler ailesinde basit fenoller, fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, ligninler, stilbenler gibi farklı alt gruplar bulunur (Crozier vd., 2006). Bazı fenolikler, tohum çimlenmesi ve bitkiler arası etkileşim gibi süreçlerde görev alır (Shahidi & Naczki, 2004). Flavonoidler ve antosiyaninler bitkilere ve meyvelere renk verirken, böcekleri çekerek tozlaşmaya da katkı sağlarlar. Tanenler çoğunlukla acı bir tat verir, böylece bazı otçul hayvanların o bitkileri tüketmesini engelleyebilir.

Polifenolik bileşikler bitkilerin ekolojik ve fizyolojik durumlarında önemli rol oynarken, aynı zamanda insan sağlığı üzerinde etkili olan ve gıda, ilaç, kozmetik gibi farklı sektörlere de katkı veren değerli doğal ürünlerdir. Fenolik bileşikler insan sağlığı üzerinde özellikle antioksidan etkili yönleriyle öne çıkarlar. Antioksidanlar vücuttaki zararlı serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücre hasarını azaltır, böylece kalp-damar hastalıkları, bazı kanser türleri ve diğer kronik rahatsızlıkların önlenmesinde yararlı olabilirler (Shahidi & Nacz, 2004). Gıda endüstrisinde ise fenolik bileşikler doğal renklendirici veya koruyucu olarak kullanılabilirler. Polifenolik bileşiklerden flavonoidler, hidrokinonlar ve bazı benzaldehit türevi bileşikler çeşitli enzimler üzerine inhibitör olarak etki göstermektedir. Örneğin flavonoidler metal şelatlama özelliklerinden dolayı, kofaktörü bulunan enzimleri inhibe edebilirler.

Bu çalışmada, halk arasında şifalı bitkilerden biri olduğu düşünülen ve yüksek aromatik özellikli olan rezenenin fenolik bileşenlerinin türü ve miktarının belirlenmesi için hem etanolik ekstraktı hem de uçucu yağı LC-MS/MS ile analiz edildi. Ayrıca ekstraktın toplam fenolik miktarı Folin-Ciocalteu metoduyla belirlendi. Bitkinin antioksidan aktivitesini değerlendirmek üzere serbest radikal giderme gücü DPPH metoduyla tayin edildi.

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali giderme metodu ilk olarak 1958 yılında M. Blois tarafından geliştirilmiş olup, günümüzde sıkça kullanılmaktadır. Antioksidan bileşiklerin ve bitkisel ekstraktların serbest radikal giderme kapasitesini belirlemek için hızlı, pratik ve yaygın olarak kabul görmüş bir tekniktir. DPPH radikali, azot merkezli, stabil bir sentetik radikaldir. Alkoldeki çözeltisi mor renkli olup, 515-520 nm dalga boyları arasında maksimum absorbands gösterir. Ortamdaki bileşik veya bitki ekstraktı antioksidan etkiye sahip ise radikali nötralize eder ve çözeltinin rengi sarıya döner. Absorbansda meydana gelen azalma genellikle 517 nm’de spektrofotometrik olarak izlenebilir ve analiz edilen örneğin antioksidan aktivitesi hakkında bilgi verir (Molyneux, 2004; Blois, 1958).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOTLAR

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler ve cihazlar

Domuz pankreatik lipazı (Tip II, 100-400 U/mg protein), domuz pankreatik amilazı (Tip IV-B, 1MU, 30 U/mg katı), mantar tirozinazı (50 KU, ≥ 1000 U/mg katı), p-nitrofenilpalmitat, nişasta, akarboz, L-DOPA, kojik asit, dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), gum arabik, sodyum deoksikolat, Triton X-100, dinitro salisilik asit (DNS), DPPH, BHA, Folin-Ciocalteu ayırıcı, gallik asit, Na_2CO_3 Sigma/Sigma-Aldrich firmalarından; Tris, disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), monopotasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), sodyum potasyum tartarat, sodyum hidroksit, sodyum sülfat dimetil sülfoksit (DMSO) Merck; etanol İzolab; hidroklorik asit Tekkim ve sodyum klorür Riedel-de Haen firmalarından temin edilmiştir.

Deneyler sırasında kullanılan cihazlar ve markaları şunlardır:

- Blender (Waring)
- Çalkalamalı su banyosu (Wisebath Daihan)
- Rotaevaporatör (Buchi)
- Derin dondurucu (-80 °C) (Wise Cyro Daihan)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Ultrasonik su banyosu (Wiseclean Daihan)
- pH Metre (Jenco 6173)
- Terazî (Presica XB 220A)
- Spektrofotometre ve mikropilaka okuyucu (Thermo Scientific)

- Mikro pipetler (Eppendorf)
- Vorteks (Whirli mixer)
- Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı (IKA RH basic-2)

α -Amilaz aktivitesi ve inhibisyonu tayininde kullanılan çözeltiler:

- α -Amilaz çözeltisi (domuz pankreatik amilazı, w/v): 0,020 g amilaz enzimi tartıldı ve 20 mL fosfat tamponunda (20 mM, pH 6.9) çözülerek hazırlandı.
- % 1'lik nişasta çözeltisi: 0,5 g nişasta destile su ile beherde ısıtılarak çözüldü, soğuyunca 50 mL'lik balon jojede hacmine tamamlandı.
- 3,5-Dinitro salisilik asit çözeltisi: 1 g DNS tartılarak 50 mL destile suda çözüldü. 20 mL 2N NaOH, 0,125 g sodyum sülfat ve 30 g sodyum potasyum tartarat eklenerek destile su ile 100 mL hacme tamamlandı.
- 20 mM fosfat tamponu (pH 6.9): Hazırlanan 20 mM KH_2PO_4 ve 20 mM Na_2HPO_4 çözeltileri tampon tablosunda belirtilen oranlarda karıştırıldı ve pH-metrede karışımın pH değeri ölçüldükten sonra kullanıldı.
- 2 N sodyum hidroksit çözeltisi: 2 g NaOH tartıldı, destile suda çözülerek 50 mL'lik balon jojede hacmine tamamlandı.
- Bitki örneği: Bitki ekstraktı 5 mg/mL konsantrasyonu sağlayacak şekilde tartıldı ve tamponda çözüldü. Bu stok çözelti, tamponla seyreltilerek farklı konsantrasyonlardaki örnek çözeltileri (100 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 1 mg/mL, 2 mg/mL) hazırlandı.
- Akarboz çözeltisi: 50 mg akarboz tartılarak 10 mL destile suda çözüldü. Bu stok çözeltiden çalışılan konsantrasyonlara seyreltildi.

Lipaz aktivitesi ve inhibisyonu tayininde kullanılan çözeltiler:

- Lipaz çözeltisi: Domuz pankreatik lipazı 1 mg/mL olacak şekilde 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,6) 1,15 mg/mL sodyum deoksikolat ve 0,55 mg/mL gum arabik eklenerek hazırlandı.
- 50 mM fosfat tamponu (pH 7,6): Hazırlanan KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 çözeltileri tampon tablosunda belirtilen oranlarda karıştırıldı ve pH-metrede karışımın pH değeri ölçüldükten sonra kullanıldı.
- p-Nitrofenil palmitat substratı (p-NPP): 0,003 g p-nitrofenil palmitat 10 mL % 3'lük DMSO'da çözüldü.

- Bitki örneği: Bitki ekstraktı 5 mg/mL konsantrasyonu sağlayacak şekilde tartıldı ve tamponda çözüldü. Bu stok çözelti değişen konsantrasyonlara (100 µg/mL, 500 µg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL) seyreltildi.
- Orlistat çözeltisi: 10 mg orlistat tartılarak 10 mL destile suda çözüldü. Bu stok çözeltiden çalışılan konsantrasyonlara seyreltildi.

Tirozinaz aktivitesi ve inhibisyonu tayininde kullanılan çözeltiler:

- Tirozinaz enzimi: Enzim 50 mM fosfat tamponunda (pH 6.8) çözülerek 10,4 U olacak şekilde hazırlandı.
- 3 mM L-DOPA: 0,0148 g tartıldı, destile suda çözülerek 25 mL'lik balon jode hacmine tamamlandı.
- 50 mM fosfat tamponu (pH 6.8): Hazırlanan 50 mM KH_2PO_4 ve 50 mM Na_2HPO_4 çözeltileri tampon tablosunda belirtilen oranlarda karıştırıldı ve pH-metrede karışımın pH değeri ölçüldükten sonra kullanıldı.
- Bitki örneği: Bitki ekstraktı 5 mg/mL konsantrasyonu sağlayacak şekilde tartıldı ve tamponda çözüldü. Bu stok çözelti, tamponla seyreltilerek çalışılan konsantrasyonlardaki örnek çözeltileri hazırlandı.
- Kojik asit çözeltisi: 1 mg/mL konsantrasyonda olacak miktarda tartılarak, destile suda hazırlandı. Bu stok çözeltiden çalışılan konsantrasyonlara seyreltildi.

Toplam fenolik madde tayininde kullanılan çözeltiler:

- % 2'lik Na_2CO_3 çözeltisi: 0,5 g Na_2CO_3 tartıldı ve saf suda çözülerek balon jode 25 mL'ye tamamlandı.
- Gallik asit çözeltisi (1 mg/mL): 0,05 g gallik asit tartıldı ve saf suda çözüldükten sonra 50 mL'ye tamamlandı. Bu stok çözeltiden 50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL konsantrasyonlara seyreltildi.
- Folin Ciocalteu Reaktifi (FCR): Satın alındığı şekilde direk kullanıldı.

DPPH' giderme metodunda kullanılan çözeltiler:

- 1 mM DPPH: 0,0394 g DPPH tartılarak balon jodeye konuldu. Magnetik karıştırıcı yardımıyla etanolde çözülmesi sağlandı ve etanol ile 100 mL'ye tamamlandı. Işık almaması için balon jode alüminyum folyo ile kaplanarak duz dolabında muhafaza edildi.
- 0,1 mM DPPH: 1 mM DPPH çözeltisinden 25 mL alınıp etanol ile 250 mL'ye seyreltildi.

- 1 mg/mL’lik BHA çözeltisi: 25 mg BHA tartıldı ve 25 mL etanolde çözülerek hazırlandı. Bu stok çözelti 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 µg/mL konsantrasyonlara seyreltilti.

3.2. Metodlar

3.2.1. Rezene yapraklarından etanol ekstraktının hazırlanması

Edirne’nin Hıdırağa Köyündeki bir bahçede yetişen rezene (arapsacı) bitkisinin topraküstü kısımları (çiçeklenmeden önce) toplanarak (Mayıs 2024) direk güneş ışığı görmeyen, havadar bir ortamda kurutuldu ve uygun koşullarda saklandı. Bitki ekstraktı hazırlaması için kurutulmuş bitki örneği (Şekil 3.1) Waring blendırdan geçirilerek öğütüldü ve 55 g olarak tartıldı. Üzerine 550 mL % 80’lik etanol eklenerek 25° C’deki çalkalayıcı su banyosunda 125 rpm hızda 6 saat boyunca çalkalandı. Süre sonunda bitki-çözücü karışımı süzgeç kağıdından süzüldü ve çözücüsü rotaevoparatörde uzaklaştırıldı. Balondaki ekstrat petri kabına alınarak, çözücüsü tamamen uçuncaya kadar oda koşullarında bekletildi. Elde edilen yeşil renkli ekstrakt “ham ekstrakt” olarak adlandırıldı ve enzim inhibisyonu deneylerinde kullanılıncaya kadar uygun koşullarda saklandı.



Şekil 3.1. Doğal ortamında bulunan ve kurutulmuş rezene bitkisi

3.2.2. Etanol ekstraktının α -amilaz inhibisyonunun belirlenmesi

Rezene yapraklarından elde edilen etanol ekstraktının karbonhidrat sindiriminde görev alan α -amilaz enzimi üzerindeki olası inhibitör etkisi Apostolidis, Kwon ve Shetty (2007) tarafından bildirilen metoda göre çalışılmıştır.

α -Amilaz enzim aktivitesi için; 500 μ L nişasta substratı üzerine 500 μ L (15 U) enzim çözeltisi eklendi ve 37 °C’de 15 dakika boyunca inkübe edildi. 1 mL DNS çözeltisi ilave edildikten sonra 5 dakika boyunca kaynar su banyosunda kaynatıldı. Soğutarak tüpler oda sıcaklığına getirildi ve üzerlerine 7,5 mL destile su eklendi. 540 nm’deki absorbans değerleri ölçüldü. Enzim yerine tampon alınarak kontrol tüpü çalışıldı.

Bitki ekstraktının α -amilaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisini değerlendirebilmek için önce çalışma tamponunda 5 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 500 μ g/mL, 100 μ g/mL konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerden 500 μ L alınarak 500 μ L enzim ile 37 °C’de 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda karışıma 500 μ L nişasta çözeltisi eklenerek 37 °C’de 15 dakika daha inkübasyon yapıldı. DNS ilavesinden sonra yukarıda belirtildiği gibi deneye devam edildi. Herbir örnek konsantrasyonu için enzim yerine tampon alınarak numune körü çalışıldı.

Pozitif kontrol olarak α -amilaz inhibitörü olan Akarboz kullanıldı ve 10-1000 μ g/mL konsantrasyon aralığındaki akarboz çözeltilerine de aynı deney prosedürü uygulandı.

Deneyde sadece enzim ve substrat eklenerek enzim aktivitesi çalışılan tüp % 100 aktif kabul edildi. Değişen konsantrasyonlardaki örneklerin ve akarboz çözeltilerinin α -amilaz enzimini üzerindeki inhibisyon yüzdeleri aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

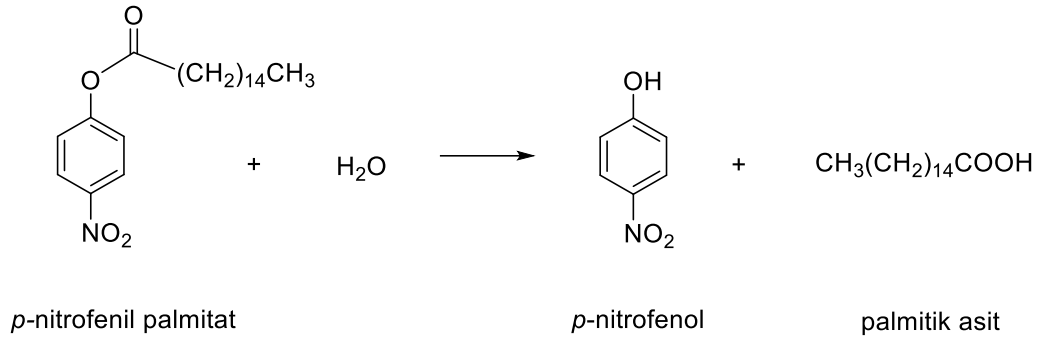
$$\% \text{ İnhibisyon} = [(\text{Absorbans}_{\text{Amilaz}} - \text{Absorbans}_{\text{Ekstrakt/Akarboz}}) / \text{Absorbans}_{\text{Amilaz}}] \times 100$$

$\text{Absorbans}_{\text{Amilaz}}$ % 100 aktif kabul edilen tüpün absorbansı; $\text{Absorbans}_{\text{Ekstrakt}}$ numune körü absorbansı çıkarıldıktan sonra elde edilen absorbans değerlerini ifade etmektedir.

3.2.3. Etanol ekstraktının lipaz inhibisyonunun belirlenmesi

Lipaz aktivitesi (Tan, Chang & Zhang, 2017) için; 450 μ L tampon (pH 7.6 fosfat tamponu), 600 μ L enzim ve 450 μ L p-NPP substrat çözeltileri 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi ve mikropilaya okuyucuda 405 nm dalgaboyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Enzim yerine tampon alınarak kontrol tüpü çalışıldı.

Lipaz enziminin p-nitrofenil palmitat substratını katalizleme reaksiyonu Şekil 3.2’de görülmektedir.



Şekil 3.2. p-Nitrofenilpalmitat substratı üzerinde lipaz enziminin etkisi

Bitki ekstraktının anti-lipaz aktivitesini incelemek için; 1800 µL tampon üzerine, 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL ve 5 mg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerden 450 µL alınarak 600 µL enzim ile 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra ortama 450 µL p-NPP substratı eklenerek 37 °C’de 20 dakika daha inkübe edildi ve 405 nm dalgaboyunda absorbansları okundu. Herbir örnek için enzim yerine tampon konularak numune körü çalışıldı.

Enzim inhibitörü olan Orlistat pozitif kontrol olarak kullanıldı ve 1-2-10-100-500 ve 1000 µg/mL konsantrasyon aralığındaki orlistat çözeltileri ile deney yapıldı.

Örnek veya orlistat eklenmeden enzim aktivitesi yapılan tüp % 100 aktif kabul edildi. Verilen formüle göre, değişen konsantrasyonlardaki örneklerin ve orlistat çözeltilerinin lipaz enzimini üzerindeki inhibisyon yüzdeleri hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left[\frac{\text{Absorbans}_{\text{Lipaz}} - \text{Absorbans}_{\text{Ekstrakt/Orlistat}}}{\text{Absorbans}_{\text{Lipaz}}} \right] \times 100$$

Absorbans_{Lipaz} % 100 aktif kabul edilen tüpün absorbansı; Absorbans_{Ekstrakt} numune körü absorbansı çıkarıldıktan sonra elde edilen absorbans değerlerini ifade etmektedir.

3.2.4. Etanol ekstraktının tirozinaz inhibisyonunun belirlenmesi

Tirozinaz aktivite tayini için (Masuda vd., 2007); 120 µL tampon (pH 6.8 fosfat tamponu), 40 µL enzim (10,4 U) ve 40 µL L-DOPA çözeltileri 10 dakika oda koşullarında inkübe edildi ve mikropłaka okuyucuda 475 nm dalgaboyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Enzim yerine tampon alınarak kontrol tüpü çalışıldı.

Bitki ekstraktının tirozinaz enzimi üzerindeki olası inhibisyon etkisini incelemek üzere; 40 µL tampon ve farklı konsantrasyonlarda çalışma tamponunda hazırlanan 40'ar µL (50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL) örnek üzerine 40 µL enzim eklenerek 10 dakika oda koşullarında ön inkübe edildi. Sonra ortama 40 µL L-DOPA substratı eklenerek oda koşullarında 10 dakika daha inkübe edildi. Herbir örnek için enzim yerine tampon konularak numune körü çalışıldı. 475 nm dalgaboyunda mikropilok okuyucuda absorbansları okundu.

Enzim inhibitörü olarak bilinen kojik asit pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kojik asit çözeltileri 10-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanarak aynı deney prosedürü uygulandı.

Ekstrakt veya kojik asit eklenmeden sadece enzim ve substrat eklenerek yapılan deney % 100 aktivite gösteren tüp olarak kabul edildi. Değişen konsantrasyonlardaki örneklerin ve kojik asit çözeltilerinin tirozinaz enzimini üzerindeki inhibisyon yüzdeleri aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left[\frac{(\text{Absorbans}_{\text{Tirozinaz}} - \text{Absorbans}_{\text{Ekstrakt/Kojik asit}})}{\text{Absorbans}_{\text{Tirozinaz}}} \right] \times 100$$

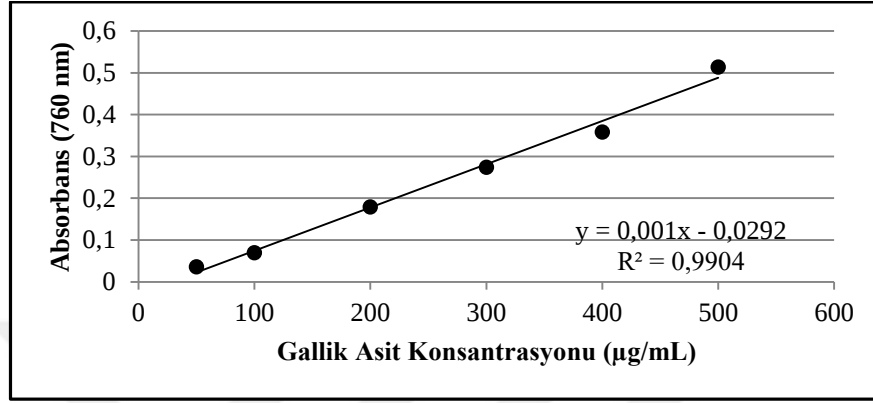
$\text{Absorbans}_{\text{Tirozinaz}} \% 100$ aktif kabul edilen tüpün absorbansı; $\text{Absorbans}_{\text{Ekstrakt}}$ numune körü absorbansı çıkarıldıktan sonra elde edilen absorbans değerlerini ifade etmektedir.

3.2.5. Etanol ekstraktının toplam fenolik madde miktarı tayini

Rezene bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstraktta toplam fenolik madde tayini Singleton ve Rossi (1965) metodu kullanılarak çalışıldı. 1 mg/mL konsantrasyondaki 0,1 mL ekstraktın üzerine 4,5 mL destile su ve 0,1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek vortekslendi. 3 dk bekletmeden sonra 0,3 mL % 2'lik Na_2CO_3 eklendi. Oda koşullarında 2 saat çalkalamalı su banyosunda 125 rpm hızda çalkalanarak bekletildi. 760 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Ekstrakt yerine 0,1 mL su kullanılarak kör deneme yapıldı.

Örneğin toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde, bitkilerde yaygın olarak bulunan gallik asit standart madde olarak kullanıldı. Bu amaçla 50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/mL konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri hazırlandı ve her birine yukarı verilen deney prosedürü uygulandı. Okunan absorbans değerleri, gallik asit çözeltilerinin

konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildi ve gallik asit standart grafiği oluşturuldu (Şekil 3.3). Bu lineer grafiğin doğru denklemi $y=0,001x-0,0292$ ($R^2=0,9904$) olarak belirlendi. Elde edilen denklem kullanılarak ekstraktın toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri cinsinden ($\mu\text{g GAE}$) hesaplandı.



Şekil 3.3. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit standart grafiği

3.2.6. Etanol ekstraktının serbest radikal giderme aktivitesinin tayini

Rezene yaprak ekstraktının antioksidan kapasitesini değerlendirmek amacıyla DPPH serbest radikali giderme metodu (Blois, 1958) kullanıldı.

Çalışmada 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan stok bitki ekstraktı 100, 250, 500 ve 750 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlara seyreltilti. Her bir konsantrasyondan 1 mL alınarak üzerine 4 mL 0,1 mM DPPH çözeltisinden eklendi ve karışımlar vortekslendi. Oda koşullarında ve karanlıkta 30 dk bekletildikten sonra 517 nm’de absorbansları okundu. Kontrol tüpü ekstrakt yerine etanol kullanılarak çalışıldı. Standart antioksidan madde olarak kullanılan BHA (25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda) çözeltileri de aynı deney prosedürüne göre çalışıldı.

Herbir konsantrasyonda çalışılan bitki ekstraktı ve BHA çözeltileri için ölçülen absorbans değerleri kullanılarak serbest radikal giderim aktiviteleri % inhibisyon cinsinden hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \left[\frac{(\text{Absorbans}_{\text{Kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{Ekstrakt/BHA}})}{\text{Absorbans}_{\text{Kontrol}}} \right] \times 100$$

3.2.7. Etanol ekstraktının ve uçucu yağın fenolik bileşen içeriği

Rezene bitkisinden elde edilen ham ekstraktın (Bölüm 3.2.1) ve hidrodestilasyon ile elde edilen uçucu yağın (Bölüm 3.2.8) fenolik bileşenleri Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma Geliştirme ve Uygulama Merkezi (TÜTAGEM)’nde Agilent marka LC-MS/MS cihazıyla tayin edildi. Analiz prosedürüne ait cihazda uygulanan parametreler Çizelge 3.1’de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Fenolik profil analizine ait cihaz ile ilgili parametreler

Analiz Parametresi	Koşul
Mobil Faz A	5 mM Amonyum format + %0.1 Formik asit + Ultra saf su
Mobil Faz B	%0.1 Formik asit + Metanol
Kolon türü	Zorbax-Extend-C18 (4.6x100 mm ve 3.5 micron)
Kolon Sıcaklığı	25°C
Örnekleyici Sıcaklığı	4°C
Enjeksiyon Hacmi	5 µL
Analiz Süresi	12 dk
Akış Hızı	0.600 ml/dk
İyon Kaynağı	Elektrosprey İyonizasyon (ESI)
İyonlaştırma Türü	Pozitif
Kapiler Voltajı	3000 V
Source Sıcaklığı	375°C
Azot Gazı Sıcaklığı	300°C
Azot Gaz Akışı	10 L/dk
Delta EMV (+)	0 V

Ham ekstrakttan ve uçucu yağ fraksiyonundan hidroliz yapılmadan ve asidik hidrolize tabi tutularak fenolik bileşen ekstraksiyonu yapıldı. Böylece her iki örnekte de hem şeker içeren fenolik bileşenler (glikozid halinde bulunan maddeler), hem de basit fenolik asitler analiz edildi.

3.2.8. Rezene yapraklarından uçucu yağ eldesi ve uçucu bileşenlerinin analizi

20 g rezene yaprakları 300 mL su içeren cam balona koyularak Clevenger cihazıyla 2 saat süre ile hidrodestilasyona tabi tutuldu ve uçucu yağın toplanması sağlandı (verim % 4,6). Elde edilen uçucu yağ koyu renkli cam şişeye alınarak fenolik bileşenlerinin ve uçucu bileşenlerinin analizi için buzdolabında muhafaza edildi.

Elde edilen uçucu yağın bileşenleri TÜTAGEM'deki Agilent marka 8890 model GC ve Agilent marka 7000D GC/TQ model kütle spektrometresi ile tayin edildi. Kapiler kolon olarak HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25   m film kalınlığı) ve 1 ml/dk akış hızında helyum taşıyıcı gazı kullanılmıştır. GC fırın sıcaklığı 50  C'de 3 dk tutulup, 100  C'ye 3  C/dk hızla çıkarılıp, 2 dk sonra 8  C/dk hızla 250  C'ye çıkarılmıştır. Bu sıcaklıkta 4,5 dk tutulmuştur. Enjektör sıcaklığı 250  C ve split oranı 1:70 olarak ayarlanmıştır. Kütle spektrometresi tarama aralığı (m/z) 45-700 atomik kütle birimi (amu) aralığına ayarlanmıştır. Elde edilen kromatogramdaki uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesinde NIST ve Wiley GC-MS kütüphaneleri verileri esas alınmıştır.



BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. Etanol Ekstraktının α -Amilaz İnhibisyonu

Çalışmada amilaz enziminin substratı olarak nişasta, inhibitör standartı olarak da akarboz kullanılmıştır. Öncelikle bitki örneği veya akarboz eklenmeden deneme yapılmış ve bu analiz enzimin optimum koşullarda çalıştığı yani tam aktivite gösterdiği analiz tüpü olarak kabul edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda bitki ekstraktı veya akarboz eklenerek çalışılan tüplerden elde edilen sonuçlar enzimatik aktivite ile kıyaslanarak inhibisyon oranları belirlenmiş ve Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Akarboz ve ekstraktın α -amilaz enzimini inhibe etme oranları

Akarboz ($\mu\text{g/mL}$)	% İn	Ekstrakt ($\mu\text{g/mL}$)	% İn
10	10,75 $\pm$ 0,89	100	40,10 $\pm$ 3,80
50	19,22 $\pm$ 1,04	500	40,91 $\pm$ 1,01
100	41,69 $\pm$ 5,65	1000	43,82 $\pm$ 0,11
250	60,40 $\pm$ 3,81	2000	47,28 $\pm$ 1,39
500	69,30 $\pm$ 2,92	5000	55,88 $\pm$ 3,26
1000	80,48 $\pm$ 2,85		
EC ₅₀	145 $\mu\text{g/mL}$	EC ₅₀	2300 $\mu\text{g/mL}$

EC₅₀ (Etkili konsantrasyon) değeri enzimatik reaksiyonun hızını %50 oranında azaltmak için gereken inhibitör konsantrasyonudur. Çalışılan örneğin inhibisyon etkinliğini yorumlamak için sıklıkla kullanılan bir parametredir ve akarbozun EC₅₀ değeri 145 $\mu\text{g/mL}$ iken, rezene için 2300 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir.

4.2. Etanol Ekstraktının Lipaz İnhibisyonu

Çalışmada lipaz enziminin substratı olarak p-nitrofenil palmitat kullanılmıştır. Öncelikle bitki örneği eklenmeden deneme yapılmış ve bu enzimin optimum koşullarda çalıştığı yani tam aktivite gösterdiği tüp olarak kabul edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (100 µg/mL, 500 µg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL ve 5 mg/mL) bitki ekstraktı eklenerek çalışılan tüplerden elde edilen sonuçlar enzimatik aktivite ile kıyaslanarak inhibisyon oranları belirlenmiştir. Arapsaçı bitkisinin ve pozitif standart olarak kullanılan orlistatın doz ve lipaz enzimi üzerindeki inhibisyon yüzdeleri Çizelge 4.2’de görülmektedir. Konsantrasyon artışıyla inhibisyon oranları da artmıştır. Bitki ekstraktı 3000 µg/mL ve sonrası konsantrasyonlarda lipaz enzimini yüksek oranlarda inhibe etmiştir ancak ticari inhibitör orlistat 10 µg/mL konsantrasyonda % 85 inhibisyon etkisi göstermiştir.

Çizelge 4.2. Orlistat ve ekstraktın lipaz enzimini inhibe etme oranları

Orlistat (µg/mL)	% İnh	Ekstrakt (µg/mL)	% İnh
1	11,06±0,52	500	11,10±1,27
2	36,49±1,35	1000	21,42±0,40
10	85,08±3,95	2000	37,83±5,08
100	94,43±1,91	3000	77,55±3,53
500	93,02±0,37	4000	84,20±4,21
1000	91,99±1,00	5000	88,94±1,51

4.3. Etanol Ekstraktının Tirozinaz İnhibisyonu

Çalışmada tirozinaz enziminin substratı olarak L-DOPA, inhibitör standardı olarak da kojik asit kullanılmıştır. Öncelikle bitki örneği veya kojik asit eklenmeden deneme yapılmış ve bu deneme enzimin optimum koşullarda çalıştığı yani tam aktivite gösterdiği tüp olarak kabul edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda bitki ekstraktı veya kojik asit çözeltisi eklenerek çalışılan tüplerden elde edilen sonuçlar enzimatik aktivite ile kıyaslanarak inhibisyon oranları belirlenmiştir. Kojik asit 10-50-100-250-500-750 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda çalışılmış ve dozla orantılı şekilde artan inhibisyon oranları gözlenmiştir (Çizelge 4.3). Bitki ekstraktıyla ise öncelikle 500-1000-2000-5000 µg/mL olarak seçilen nispeten yüksek konsantrasyonlarda çalışılmış ancak inhibisyon

aktivitesi tayin edilememiştir. Sonrasında konsantrasyonlar 50-100-250-500 µg/mL olacak şekilde deney tekrarlanmış ve yine inhibisyon gözlenmemiştir. Sadece 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında sırasıyla % 2,99±0,61 ve % 3,91±0,53 olan çok düşük oranlarda inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

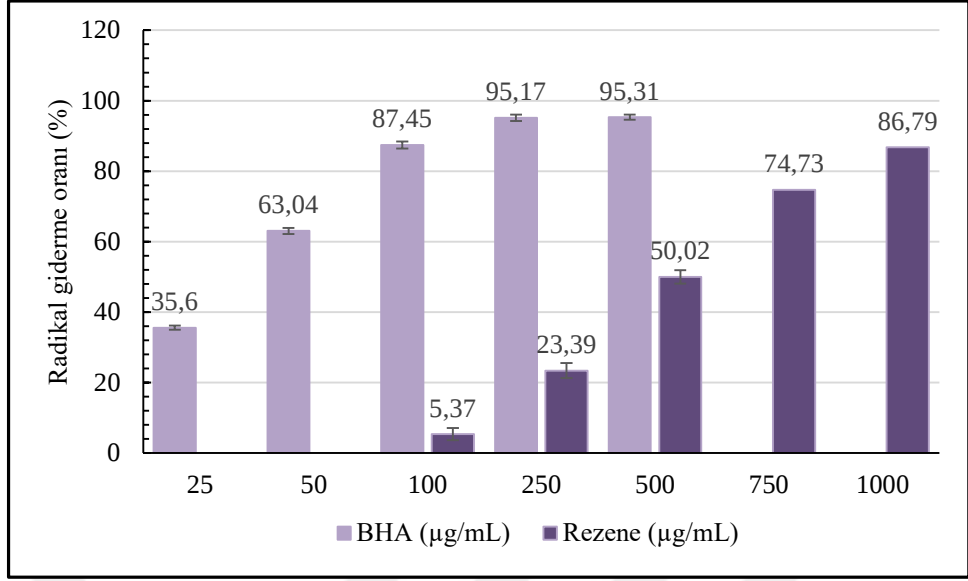
Çizelge 4.3. Kojik asidin tirozinaz enzimini inhibe etme oranları

Kojik asit (µg/mL)	% İnhibisyon
10	38,25±1,48
50	75,89±2,14
100	82,35±2,45
250	81,41±3,16
500	86,86±2,42
750	88,45±4,19
1000	89,70±4,49

Tirozinaz enzimi için kullanılan aktivite tayin yöntemi oluşan renkli ürünün yani dopakromun spektrofotometrik metodla ölçülmesine yöneliktir. Bitki ekstraktları genellikle renkli olduğu için spektrofotometrik temelli ölçümlerde girişim olabilir. Bu çalışmada da olası girişim etkisi deneyler sırasında prosedüre numune körü çalışması eklenerek giderilmeye çalışılmasına rağmen, rezene yaprak ekstraktının tirozinaz enzimini inhibe etmediği görülmüştür.

4.4. Ekstraktın Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Serbest Radikal Giderme Aktivitesi

Çalışmada toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile spektrofotometrik olarak tayin edildi ve rezene bitki ekstraktının gallik asit cinsinden 52,79±0,84 µg/g fenolik maddeye sahip olduğu belirlendi. Bitkilerin fenolik bileşiklerine atfedilen antioksidan özelliği, aktivite tayin metodlarından biri olan DPPH radikalini giderme metoduna göre çalışıldı. Örneğin konsantrasyon artışı ile serbest radikal giderme gücünün de arttığı görülmüştür. Şekil 4.1’de de görüldüğü gibi rezene ekstraktı ortamdaki DPPH radikallerini 500 µg/mL ve üzeri konsantrasyonlarında % 50’nin üzerinde gidermiştir ve bir ham ekstrakt için elde edilen bu oranların BHA standart maddesiyle kıyaslanabilecek derecede olduğu söylenebilir.



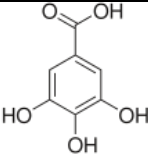
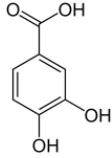
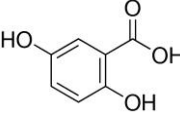
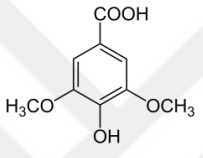
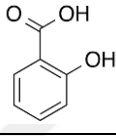
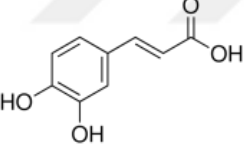
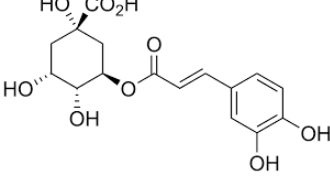
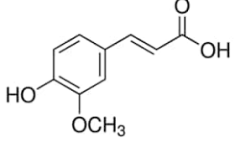
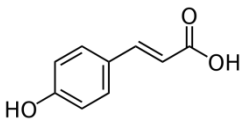
Şekil 4.1. Ekstrakt ve standart maddenin DPPH radikali giderme aktivitesi

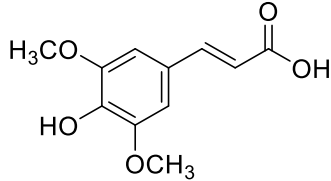
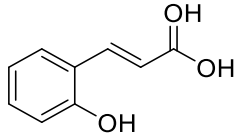
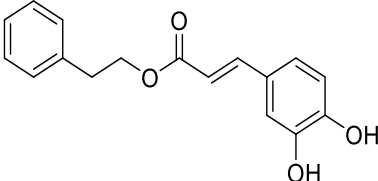
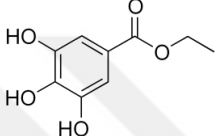
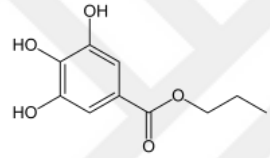
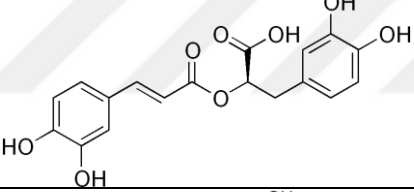
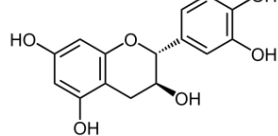
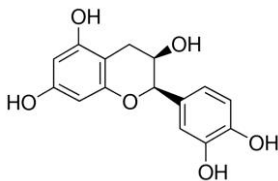
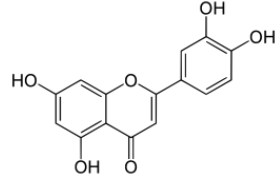
Bir örneğin antioksidan aktivitesini yorumlamak için genellikle EC_{50} (Etkili konsantrasyon) değeri kullanılmaktadır. Bu değer antioksidan maddenin, bitki ekstraktının veya çalışılan örneklerin çalışılan konsantrasyonları ile hesaplanan % inhibisyon değerleri arasında çizilen grafiklerden hesaplanmaktadır. EC_{50} değeri başlangıçta ortamda bulunan DPPH radikali konsantrasyonunun % 50'sini gidermek için gerekli madde/ekstrakt miktarını ifade eder ve birimi mg/mL veya µg/mL'dir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre EC_{50} değerleri ekstrakt için 500 µg/mL ve standart madde BHA için 40 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu da bitkinin standart maddenin serbest radikal giderme gücüne 12,5 kat yaklaştığını göstermektedir.

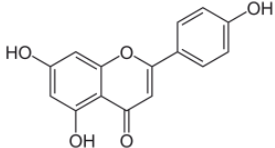
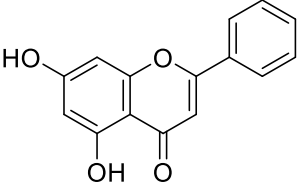
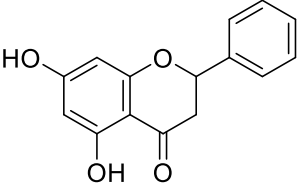
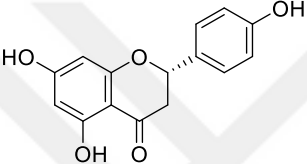
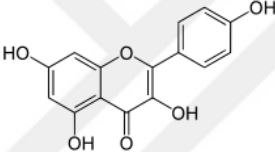
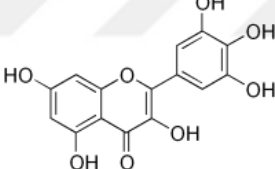
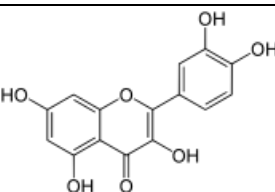
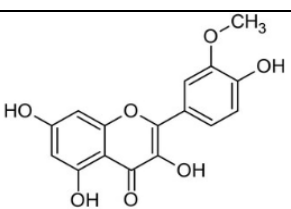
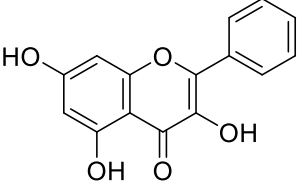
4.5. Rezene Yaprak Ekstraktının ve Uçucu Yağının Fenolik Bileşen İçeriği

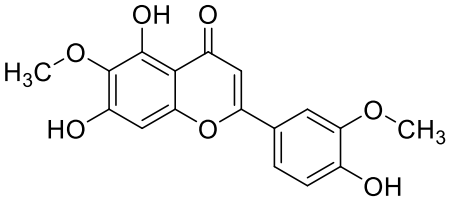
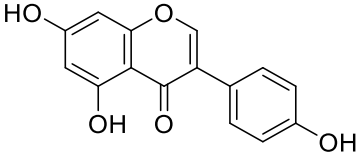
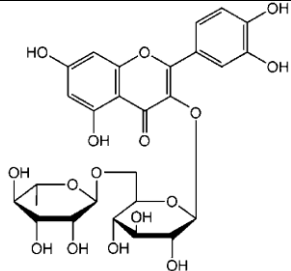
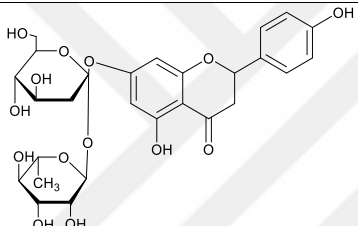
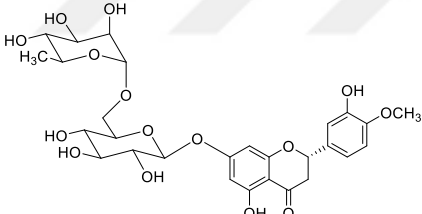
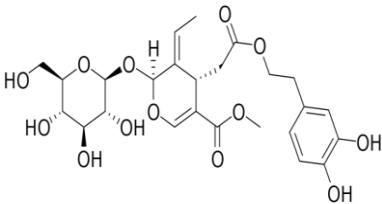
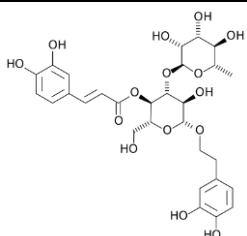
Rezene bitkisinden elde edilen etanol ekstraktında ve Clevenger aparatı kullanılarak hidrodestilasyon esasıyla elde edilen uçucu yağ fraksiyonunda 6460 Triple Quadrupole marka LC-MS/MS cihazı ile Çizelge 4.4'de listelenen 44 çeşit fenolik bileşen içerikleri analiz edildi.

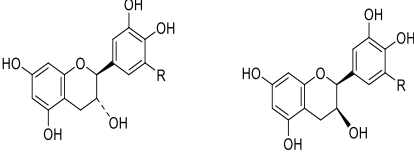
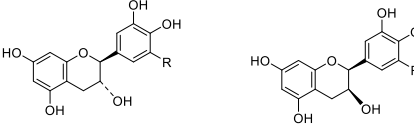
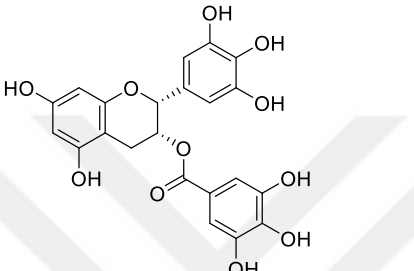
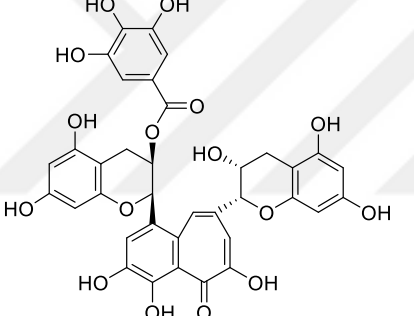
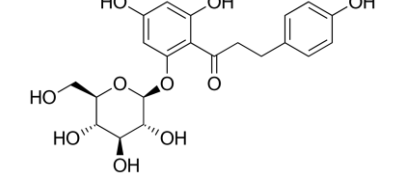
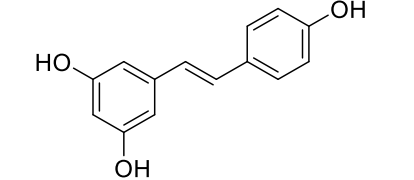
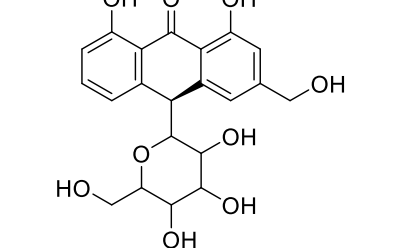
Çizelge 4.4. Analiz edilen fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları

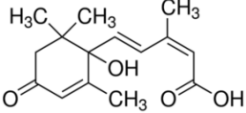
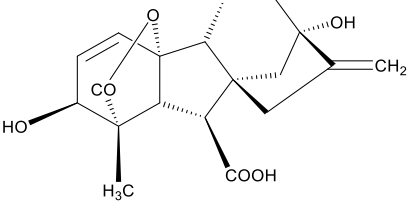
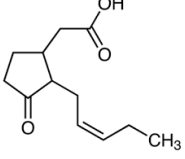
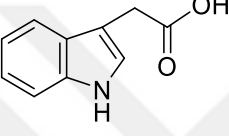
Fenolik Bileşiğin Kimyasal Yapısı	Fenolik Bileşiğin Adı	Fenolik Bileşik Grubu
	Gallik Asit	Hidroksibenzoik asit
	Protokateşik Asit	Hidroksibenzoik asit
	2,5-Dihidroksibenzoik asit	Hidroksibenzoik asit
	Şiringik asit	Hidroksibenzoik asit
	Salisilik asit	Hidroksibenzoik asit
	Kafeik Asit	Sinnamik asit
	Klorojenik asit	Sinnamik asit
	Trans ferulik asit	Sinnamik asit
	p-Kumarik asit	Sinnamik asit

	Sinapik asit	Hidroksisinamik asit türevi
	2-Hidroksitrans sinamik asit	Hidroksisinnamik asit
	Kafeik asit fenetil esteri (CAPE)	Hidroksisinamik asit türevi
	Etil gallat	Gallik asidin etil esteri
	Propil gallat	Gallik asidin propil esteri
	Rozmarinik asit	Kafeik asit esteri
	Kateşin	Flavanol
	Epikateşin	Flavanol
	Lutolein	Flavon

	Apigenin	Flavon
	Chrysin	Flavon
	Pinosembrin	Flavanon
	Naringenin	Flavanon
	Kamferol	Flavonol
	Mirisetin	Flavonol
	Kersetin	Flavonol
	İzoramnetin	Flavonol
	Galangin	Flavonol

	Jaseosidin	Flavonoid
	Genistein	İzoflavonoid
	Rutin	Flavonoid glikozidi
	Naringin	Flavonoid glikozidi
	Hesperidin	Flavonoid glikozidi
	Oleuropein	Glikozidli fenolik bileşik
	Verbaskozit	Glikozidli fenolik bileşik

	Gallokatëşin + Epigallokatëşin	Flavanoller
	Kateşin gallat + Epikateşin gallat	Flavanoller
	Epigallokatëşin gallat	Flavanoller
	Teaflavin-3-gallat	Kondanse tanen
	Florizin	Dihidrochalkon
	Resveratrol	Stilben
	Aloin A	Antrakinon glikoziti

	Absisik asit	Seskiterpenoid sınıfı bitki hormonu
	Gibberellik asit	Diterpenoid sınıfı bitki hormonu
	Jasmonik asit	Lipidik bitki hormonu
	İndol-3-asetik asit	Oksinler (bitki hormonu)

Çizelge 4.5'te görüldüğü gibi rezene bitkisinin etanol ekstraktında analizlenen 44 bileşikten 16 adedi tanımlanmış olup bunlardan sırasıyla en fazla absisik asit, indol-3 asetik asit, trans-ferulik asit, rutin, protokateşik asit, p-kumarik asit ve jasmonik asit bulunmaktadır. Asidik hidroliz uygulanmış etanol ekstraktında ise tanımlanan 19 bileşikten absisik asit, kafeik asit, kamferol, trans-ferulik asit, p-kumarik asit ve protokateşik asit en fazla miktarlarda belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Rezene etanol ekstraktında bulunan fenolik bileşenler ve miktarları

Fenolik Bileşiğin Adı	Etanol ekstraktı (ng/g)	Hidrolizlenmiş etanol ekstraktı (ng/g)
Gallik asit	649	2135
Protokateşik asit	2630	22407
2,5-Dihidroksibenzoik asit	615	13365
Şiringik asit	0	0
Salisilik asit	1110	12406
Kafeik asit	869	84064
Trans ferulik asit	3442	49448
p-Kumarik asit	1932	33262
Klorojenik asit	0	0

Kateşin+ Epikateşin	0	0
Lütolein	5	306
Apigenin	0	31
Kamferol	0	55427
Mirisetin	0	0
Kersetin	307	171306
İzoramnatin	83	17382
Oleuropein	0	0
Etil gallat	0	0
Propil gallat	0	0
Florizin	0	0
Absisik asit	67773	10627
Jasmonik asit	1640	0
Gallokateşin + Epigallokateşin	0	0
Rosmarinik asit	0	482
Epigallokateşin Gallat	0	0
Gibberellik asit	0	0
Vebaskozit	0	0
Rutin	3115	0
Kateşin Gallat + Epikateşin Gallat	0	0
Sinapik asit	0	0
Naringin	0	0
Hesperidin	1356	242
İndol-3-asetik asit	5021	1438
2-Hidroksitranssinamik asit	0	0
Teaflavin-3-gallat	0	0
Resveratrol	0	0
Aloin A	0	0
Naringenin	0	115
Genistein	0	0
Jasmonik asit	1639	0

CAPE	126	8
Pinosembrin	0	68
Galangin	0	0
Chrysin	0	0

Çizelge 4.6'ya göre bitkinin uçucu yağında analizlenen fenolik bileşiklerden sadece 10 çeşidi belirlenmiş olup, en fazla rosmarinik asit tayin edilmiştir. Hidroliz uygulanan uçucu yağ örneğinde ise 12 tür bileşen belirlenmiş olup, trans-ferulik asit ve apigenin en yüksek orana sahiptir.

Çizelge 4.6. Rezene uçucu yağında bulunan fenolik bileşenler ve miktarları

Fenolik Bileşiğin Adı	Uçucu yağ (ng/g)	Hidrolizlenmiş uçucu yağ (ng/g)
Gallik asit	2	114
Protokateşik asit	10	745
2,5-Dihidroksibenzoik asit	0	0
Şiringik asit	0	0
Salisilik asit	0	0
Kafeik asit	0	0
Trans ferulik asit	0	13028
p-Kumarik asit	0	0
Klorojenik asit	0	134
Kateşin+ Epikateşin	0	0
Lütolen	12	2153
Apigenin	31	0
Kamferol	0	0
Mirisetin	0	0
Kersetin	3	51
İzoramnetin	10	55
Oleuropein	0	0
Etil gallat	0	0
Propil gallat	0	0
Florizin	0	0

Absisik asit	0	0
Jasmonik asit	0	10586
Gallokateşin + Epigallokateşin	0	0
Rosmarinik asit	1609	0
Epigallokateşin Gallat	2	0
Gibberellik asit	0	0
Verbaskozit	0	0
Rutin	2,4	39
Kateşin Gallat + Epikateşin Gallat	0	0
Sinapik asit	0	0
Naringin	0	0
Hesperidin	23	211
İndol-3-asetik asit	0	0
2-Hidroksitranssinamik asit	0	0
Teaflavin-3-gallat	0	0
Resveratrol	0	0
Aloin A	0	0
Naringenin	0	0
Genistein	0	382
Jaceosidin	14	180
CAPE	0	0
Pinosembrin	0	0
Galangin	0	0
Chrysin	0	0

Her iki örnekten elde edilen sonuçlar, fenolik bileşen analizi için cihaza enjekte edilecek örnek hazırlığı sırasında uygulanan ekstraksiyon yönteminin fenolik bileşiklerin kantifikasyonu ve tanımlanması üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

4.6. Rezene Yaprak Uçucu Yağının Uçucu Bileşenleri

Rezene bitkisinin yapraklarından elde edilen uçucu yağın kimyasal bileşenleri GC-MS ile belirlenmiş olup, fenilpropanoid ve monoterpenoid sınıflarına ait sekiz bileşik tayin edilmiştir (Çizelge 4.7). Yaprak uçucu yağının ana bileşimini bir fenilpropanoid olan trans-anetol (% 60,57) oluşturmaktadır. Monoterpenoid sınıfı bileşiklerden olan timol, DL-fenkon ve alfa-felandren ise sırasıyla % 22,25, % 8,07 ve % 3,20 oranlarında tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Rezene yapraklarından hidrodestilasyon ile elde edilen uçucu yağın bileşenleri ve oranları (%)

Bileşen	RT*	Relatif alan (%) (Normalize edilmiş)
α -Pinen	8,58	1,09
α -Felandren	11,58	3,20
o-Cymene (Benzen, 1-metil-2-(1-metiletil))	12,50	2,36
DL-Limonen	12,67	1,51
DL-Fenkon	15,41	8,07
trans-Anetol (Benzen, 1-metoksi-4-(2-propenil)-)	20,67	60,57
Fensil asetat	22,50	0,96
Timol (Fenol, 5-metil-2-(1-metiletil)-)	25,16	22,25

*RT: Alıkonma zamanı (dk)

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Yabani rezene olarak da bilinen arapsaçı bitkisi güçlü kokusu olan aromatik bitkilerden birisidir. Bu sebeple literatürde genellikle meyvesinden (tohumlarından) elde edilen uçucu yağın içerik analizi ve uçucu yağına ait çeşitli biyolojik aktivite çalışmaları mevcuttur. Arapsaçı bitkisi özellikle Ege Bölgesinde çok tüketilmekte olup, yaprakları salatalara eklenerek veya kavrulmuş hali yemek olarak yenmektedir. Ayrıca köklerinden turşu hazırlanarak da tüketilmektedir. Yabani rezene Sicilya’da haşlanarak tüketilmekte veya salatalara katılmaktadır (Licata vd., 2016). Besin olarak tüketilen yapraklarıyla ilgili yapılan çalışmalar sınırlı olduğu için bu tez çalışmasında bitkinin yenilebilen toprak üstü kısmının (yaprakları) kullanılması ve yaprak ekstraktının farklı metabolik yollara ait olan α -amilaz, lipaz ve tirozinaz enzimleri üzerinde inhibe edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bitkilerin gösterdikleri biyolojik aktiviteler onların içerdikleri çok çeşitli ikincil metabolitlerden kaynaklandığı için ekstraktın fenolik bileşen analizi yapılmıştır. Ayrıca bitki yapraklarından elde edilen uçucu yağın da fenolik bileşen analizi yapılmıştır.

Bitki ekstraktlarının eldesi için çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılabilir. Bu çalışmada arapsaçı bitkisinin ekstraksiyonu örnek:çözücü oranı 1:10 olacak şekilde çalkalayıcılı su banyosunda 6 saat boyunca çalkalanarak elde edildi ve ekstraksiyon verimi % 11,6 olarak hesaplandı. Aydın ve Demirci (2021) nane ve rezene bitkilerinden homojenizatör destekli, ultrason destekli ve Soxhlet ekstraksiyon yöntemlerini kullanarak elde ettikleri ekstraktlarda Folin-Ciocalteu yöntemiyle fenolik bileşen tayini yapmışlardır. Çalışmada üç ekstraksiyon yöntemi karşılaştırılmış ve özellikle ultrason destekli ekstraksiyonun fenolik bileşik miktarı açısından en etkili yöntem olduğu bildirilmiştir. Tunus’ta Khammassi vd. (2022) 16 farklı yerden topladıkları yabani rezene

tohumlarının ekstraksiyonunu oda koşullarında 24 saat bekleterek maserasyon yöntemiyle yapmışlar ve % 4,11-10,18 arasında değişen oranlarda ekstraksiyon verimi elde etmişlerdir. Dolayısıyla aynı bitki için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanılması veya aynı türden olan bitkiler için herhangi bir ekstraksiyon yönteminin kullanılması durumlarında bitkisel kaynaklardaki aktif bileşenlerin veriminin ve içeriğinin etkilendiği görülmektedir.

Aromatik bitkilerin uçucu yağları su buharı destilasyonu düzeneği ile veya hidrodestilasyon esaslı Clevenger aparatı kullanılarak elde edilmekte ve bileşenleri gaz kromatografisi ile analiz edilmektedir. Çalışmada rezene yapraklarından elde edilen uçucu yağın GC-MS ile yapılan analizinde ana bileşenler olarak trans-anetol, timol, DL-fenkon ve alfa-felandren tayin edilmiştir. Miguel vd. (2010) de kurutulmuş rezene yapraklarının ve tohumunun hidrodestilasyonundan elde edilen uçucu yağı GC-MS ile analiz etmiş ve yaprak uçucu yağında trans-anetol, alfa-pinen ve limoneni ana bileşen olarak belirlemişlerdir. Ayrıca dört farklı metod ile yapılan antioksidan aktivite ve 5-lipoksigenaz inhibisyonu çalışmalarından beklenen sonucu alamadıklarını bildirmişlerdir.

Portekiz'in güneybatısından yabani rezeneyi de içeren dört aromatik bitkinin toprak üstü kısımlarıyla yapılan bir çalışmada, bitkilerin uçucu yağları Clevenger cihazı ile hidrodestilasyon yöntemiyle; sulu ekstreleri dekoksasyon yöntemiyle elde edilmiştir. Örneklerin çeşitli metodlar ile antioksidan potansiyelleri, toplam fenolik ve flavonoid analizi, kolinesteraz (AChE ve BChE) inhibitör aktiviteleri analiz edilmiştir. GC-FID ile uçucu yağın karakterizasyonu yapılmıştır. Uçucu yağın ana bileşenleri oksijenli monoterpenler olup, sulu ekstre ise fenol ve flavonoid bileşikleri açısından zengin bulunmuştur. Uçucu yağ ve sulu ekstrenin lipit substratını koruma, serbest radikal giderme ve demir indirgeme gücüyle yüksek bir antioksidan potansiyele sahip olduğu; ayrıca, örneklerin standart ilaç olan rivastigmin'den daha yüksek AChE ve BChE inhibitör aktiviteleri gösterdiği bildirilmiştir (Arantes vd., 2017).

Mısır'ın Mersa Matruh bölgesinden toplanan yabani rezene ile Bilbase şehrinden satın alınan rezenenin toprak üstü kısımlarından uçucu yağları elde edilerek GC-MS ile analiz edilmiş ve kültüre alınmış rezenede daha yüksek oranda pinen, fenkon, estragol, mirsen ve kamfen bulunurken, yabani rezenede çok daha yüksek oranda limonen olduğu

bildirilmiştir (Shatat vd., 2012). Benzer diğer bir karşılaştırma çalışmasında Hindistan'ın beş farklı rakımlı lokasyonundan toplanan rezene bitkilerinin toprak üstü kısımlarının hidrodestilasyon yöntemiyle uçucu yağları alınmış ve GC-MS ile analiz edilmiştir. Genel bileşenler değişen oranlarda trans-anetol (% 26,2-85,4) ve limonen (% 2,7-51,5) olmasına rağmen, bitkinin yetiştiği yerin yüksekliğine bağlı olarak yağların kimyasal bileşimlerinde fark edilir farklılıklar olduğu bildirilmiş ve bitki içerikleri iklim koşullarıyla da ilişkilendirilmiştir. Örneğin limonen yüzdesinin yağmurla pozitif ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Punetha, Tewari, Pande & Bhatt, 2019).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada İstanbul'dan toplanan yabani rezenelerin toprak üstü kısımlarından uçucu yağları hidrodestilasyon yöntemiyle elde edilerek GC-MS ile analiz edilmiş ve içeriğinde çoğunluğu estragol (% 34), limonen (% 27,1) ve α -pinenden (% 19,5) oluşan 17 bileşen belirlenmiştir. Yapılan antioksidan aktivite ve antibakteriyel aktivite çalışmalarında zayıf aktiviteler gözlemlendiği bildirilmiştir. Enzim inhibisyon çalışmasında ise iyi derecede anti-lipoksijenaz aktivitesine sahipken, önemli ölçüde alfa glukozidaz inhibisyonu göstermemiştir (Servi, Şen, Yıldırım Servi & Doğan, 2021).

İtalya Avrupa'da önde gelen rezene üreticilerinden biridir ve Calabria bölgesine ait coğrafi işaretli ('Finocchio di Isola Capo Rizzuto'-PGI) korunan bir ürünleri bulunmaktadır. Yeni yapılan bir çalışmada Marrelli vd. (2024) tarafından ilk kez bu rezene üretiminden elde edilen atık malzemenin biyoaktif bileşik kaynağı olarak potansiyeli araştırılmıştır. Rezene bitkisinin soğanlarından ve toprak üstü kısımlarından maserasyon yoluyla etanol ekstraktları alınmış ve iki ekstraktın fenolik içerik ile antioksidan özellikleri değerlendirilmiştir. Ayrıca ekstraktların potansiyel anti-obezite etkileri lipaz enzimi üzerindeki inhibitör etkileri açısından değerlendirilmiştir. Yapraklardan elde edilen ekstraktın DPPH radikal temizleme ve lipid peroksidasyon inhibitör aktiviteleri gösterdiği ve pankreas lipazını inhibe etmede etkili ($IC_{50} = 3.51 \pm 0.09$ mg/mL) olduğu rapor edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre PGI yan ürünlerinin potansiyel bir antioksidan ve anti-obezite ajan kaynağı olabileceği önerilmiştir (Marrelli vd., 2024). Rezene bitkisinin etanol ekstraktının DPPH radikal temizleme ve lipaz inhibisyonu denemeleri için, tez çalışmasından elde edilen verilerin bu çalışmanın sonuçları ile uyumludur.

Enzim inhibisyon çalışmalarında analiz edilen bitki ekstraktlarının veya maddelerin gösterdiği inhibisyonun başarılı kabul edilebilmesi için; ham ekstraktların IC₅₀ değerlerinin çalışmada kullanılan standart inhibitör maddenin IC₅₀ değerine 1000 kat, izole edilmiş olan bileşiklerin ise en az 10 kat yaklaşmış olması arzulanır (Önal, 2021). Bu yaklaşıma göre değerlendirildiğinde, bu çalışmada rezene ekstraktının (2300 µg/mL) standart madde akarbozun (145 µg/mL) EC₅₀ değerine 15,8 kat yaklaşarak amilaz enzimini inhibe etmede etkili olduğu görülmektedir. Rezene ekstraktı lipazın güçlü inhibitörü olan orlistat ile kıyaslandığında düşük anti-lipaz etkisine sahip olsa da, bitkinin inhibisyon oranları kendi içinde değerlendirildiğinde lipaz enzimini iyi derecede inhibe etmiştir. Anti-tirozinaz aktivite tayininde, rezene ekstraktı inhibisyon aktivitesi göstermemiştir. Literatürdeki çeşitli bitki ekstraktları çok farklı ve değişen oranlarda tirozinaz inhibisyonu gösterdikleri (Uysal, Zengin, Aktumsek & Karataş, 2016; Deniz, Orhan & Duman, 2021; Sharafan vd., 2023) için elde edilen sonuçların birbiriyle kıyaslanması zorlaşmaktadır. Bu durum kısmen, uygulanan reaksiyon şartlarının (ortamın pH değeri, enzim ünitesi, substratın çeşidi ve konsantrasyonu, bitki ekstraktının konsantrasyonu gibi) farklılığından kaynaklanmakta ve/veya ekstraktın içeriğine göre de değişiklik göstermektedir. Bitki örneklerinin askorbik asit, sitrik asit, malik asit, tartarik asit gibi doğal organik asitlerce zengin olmasının ekstraktın anti-tirozinaz gücünü arttıracak beklenmektedir, çünkü bu asitler tartarik asit ve sitrik asidin yaptığı gibi enzimin bakır kofaktörünü bağlayarak veya güçlü bir indirgen olan askorbik asidin yaptığı gibi substratı indirgeyerek kararmayı engelleyebilen ve halihazırda ticari olarak kullanılan fenol oksidaz inhibitörleridir.

Sonuç olarak; farklı metabolik yollarda yer alan üç enzim için yapılan inhibisyon denemelerinde rezene yaprakları alkolik ekstraktı yüksek konsantrasyonlarında α-amilaz ve lipaz enzimlerini inhibe etmede etkili olmuş ancak tirozinaz üzerinde inhibisyon etkisi göstermemiştir. Farklı coğrafyalarda yetişen rezene ekstraktları ile ilgili yapılan enzim inhibisyon çalışmalarının da değişen sonuçlarda olduğu görülmektedir (Majdoub vd. 2017; Godavari, Amutha, & Moorthi, 2019; Mueed vd., 2023; Marrelli vd., 2024).

Rezene bitkisinin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitesiyle ilişkili olarak; ekstraksiyon metodlarının verimliliğini karşılaştıran ve rezene artıklarının biyobileşenlerine dair yapılan iki çalışmaya değinilebilir. Rezene tohumlarına etanol

çözücüsü ile termosonikasyon, Soxhlet ve perkolasyon ekstraksiyonları uygulanmış ve geleneksel Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen ekstrakt toplam fenolik madde ($\sim 4900 \mu\text{g GAE/g}$), DPPH ($\sim 3000 \mu\text{g TE/g}$) ve ABTS ($\sim 3500 \mu\text{g TE/g}$) radikallerini giderme metodlarında diğer iki yöntem ile elde edilen ekstraktlara göre en yüksek sonuçları vermiştir (Urango, Strieder, Silva & Meireles, 2021). Diğer çalışmada ise araştırmacılar İtalya’da rezene üretimi ve pazarlaması yapan bir firmadan alınan atıkları yumru, yaprak, dal ve ince dallar olarak ayırdıktan sonra etanol çözücüsüyle ultrasonik destekli ekstraksiyon ve suyla dekoksasyon yaparak ekstraktlarını elde etmişlerdir. Tüm ekstraktlarda biyoaktif bileşenleri tanımlamak üzere LC-ESI-FT-MS ile metabolomik analizler yapılmış ve dekoksiyona (38 metabolit) göre etanol ekstraksiyonuyla (41 metabolit) daha fazla bileşen elde edilmiştir. Toplam flavonoid tayini, DPPH ve ABTS radikallerini giderme aktivitelerinde yaprak ekstraktları bitkinin diğer kısımlarına göre daha yüksek antioksidan özellik göstermiş, 5 mg/mL konsantrasyonda etanol ekstraktı % 90 ve dekoksasyon % 80 DPPH inhibisyonu sağlamıştır. Benzer şekilde en yüksek TEAC değerleri de yaprak ekstraktlarında belirlenmiştir (Crescenzi, D'Urso, Piacente & Montoro, 2021). Tez çalışmasında da rezene etanol ekstraktı 1 mg/mL konsantrasyonda % 86,8 oranında DPPH radikallerini gidermiştir.

Rezene bitkisi başlangıçtan olgunlaşınca kadar tüm toprak üstü kısımlarında uçucu yağ bileşenlerini bulundurmaktadır. Ancak bu uçucu yağın bileşenleri ve miktarı bitkinin büyüme ve gelişme dönemlerine (Şanlı, Karadoğan & Baydar, 2008) ve bitkinin yetiştiği yere göre (Punetha, Tewari, Pande & Bhatt, 2019) değişiklik göstermektedir. Çalışmada kullanılan rezene bitkisi Edirne yöresinde yetişmiş olup, uçucu yağının bileşenleri literatür ile uygunluk göstermektedir.

Bitkinin Clevenger cihazı ile hidrodestilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağında LC-MS/MS ile yapılan fenolik içerik taramasında analizlenen bileşiklerden sadece on çeşidi belirlenmiş olup, en fazla rosmarinik asit tayin edilmiştir. Etanol ekstraktında ise 16 bileşik tanımlanmış olup en fazla absisik asit, indol-3 asetik asit, transferulik asit, rutin, protokateşik asit, p-kumarik asit ve jasmonik asidin bulunduğu görülmüştür. Radikal giderme etkisiyle birlikte değerlendirildiğinde, çoğunlukla çalışılan rezene tohumlarına ek olarak yapraklarının da bitkinin aktif kısımlarından biri olduğu görülmektedir. Arapsaçı bitkisi rezenenin doğal ortamda yetişen şekli olarak bilinmekte ve ülkemizde özellikle Ege Bölgesindeki mutfaklarda mevsiminde sıklıkla

tüketilmektedir. Literatürdeki çalışmaların da genellikle Sicilya, İtalya ve Portekiz gibi Akdeniz kuşağı ülkelerinde yapıldığı dikkati çekmektedir. Dolayısıyla sağlık üzerinde etkili bu tür fenolik bileşenlere ve radikal giderme etkisine sahip olan rezene yapraklarının iyi bir antioksidan kaynağı olarak tüm mutfaklarda ve daha sık tüketilmesi önerilebilir.

Fenolik profil analizinde rezene etanol ekstraktında diğer bileşenlere göre yüksek miktarda absisik asit (67773 ng/g) tayin edilmiştir. Absisik asit büyüme düzenleyici bir bitki hormonudur, soğuk havalarda tohumların uyku halinin devamlılığını sağlayarak vaktinden önce çimlenmesini engeller. Rezene yapraklarından veya herhangi bir işleme sonrası kalan rezene atıklarından absisik asitçe zengin fraksiyonlar elde edilerek biyoaktif bileşen kaynağı olarak rezene bitkisi ileriki çalışmalarda zirai alanda değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

- Agunbiade, M., Le Roes-Hill, M. (2021). Application of bacterial tyrosinases in organic synthesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(1),2. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03186-0>
- Ahmed, M., Khan, S., & Malik, A. (2022). Cultivation and medicinal uses of fennel (*Foeniculum vulgare*). *Medicinal Plants Journal*, 45(2), 121-136.
- Arantes, S., Piçarra, A., Candeias, F., Teixeira, D., Caldeira, A.T., Martins, M.R. (2017). Antioxidant activity and cholinesterase inhibition studies of four flavouring herbs from Alentejo, *Natural Product Research*, 31:18, 2183-2187, DOI:10.1080/14786419.2017.1278598
- Arroyo, M., Sánchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. V., Alcántara, A. R. (1994). Stabilization of immobilized lipases by coating with ionic polymers. *Biotechnology Letters*, 16(3), 297-302.
- Asanuma, M., Miyazaki, I., Ogawa, N. (2003). Dopamine- or L-DOPA- induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 5, 165-176.
- Aydın, E. (2023). *Rezene (Foeniculum vulgare) Bitkisinin Uçucu Yağ ve Fenolik Bileşenlerinin Belirlenmesi; Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Artvin Çoruh Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Artvin.
- Aydın, T., Demirci, M. (2021). Nane ve rezene bitkilerinden ekstraksiyon yöntemleriyle fenolik bileşiklerin elde edilmesi. *İstanbul Üniversitesi Tez Arşivi*.
- Badgujar, S.B., Patel, V.V., Bandivdekar, A.H. (2014). *Foeniculum vulgare* Mill: A review on its botany, phytochemistry, and pharmacology. *BioMed Research International*, 2014:842674, 1-32.
- Bakır, C. (2010). *Anason (Pimpinella anisum) ve Rezene (Foeniculum vulgaris)'de Toplam Fenol/Flavonoid Miktarları ve Antioksidan Aktivitelerinin Metal İçeriği ile Değişiminin İncelenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Baydar, H. (2020) *Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi* Ankara: Nobel

- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J. (2019). *Biochemistry* (9th ed.). W. H. Freeman.
- Bischoff, H. (1994). Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. *European Journal of Clinical Investigation*, 24(Suppl 3), 3–10.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Brandelli, C.C., Giordani, R.B., De Carli, G.A., Tasca, T. (2009). Indigenous traditional medicine: *in vitro* anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitology Research*, 104, 1345-1349.
- Bray, G.A., Ryan, D.H. (2012). Update on obesity pharmacotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1264(1), 290–308.
- Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2440-2475.
- Chaudhary, S.K., Maity, N., Kumar Nema, N. vd. (2013). Angiotensin converting enzyme inhibition activity of fennel and coriander oils from India. *Natural Product Communications*. 8(5), 671-672.
- Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: The STOP-NIDDM trial. *Lancet*, 359(9323), 2072–2077.
- Crescenzi, M.A., D'Urso, G., Piacente, S., Montoro, P. (2021). LC-ESI/LTQ Orbitrap/MS metabolomic analysis of fennel waste (*Foeniculum vulgare* Mill.) as a byproduct rich in bioactive compounds. *Foods*, 10, 1893. <https://doi.org/10.3390/foods10081893>
- Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell.
- Çosge, B., Gürbüz, B., Kendir, H., Ipek, A. (2008). Composition of essential oil in sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. dulce) lines originated from Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 20(2), 1137-1142.
- Çosge, B., Kıralan, M., Gürbüz, B. (2008). Characteristics of fatty acids and essential oil from sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. dulce) and bitter fennel fruits (*F. vulgare* Mill. var. vulgare) growing in Turkey. *Natural Product Research*, 22(12), 1011-1016. <https://doi.org/10.1080/14786410801980675>
- Deniz, F.S.S., Orhan, I.E., Duman, H. (2021). Profiling cosmeceutical effects of various herbal extracts through elastase, collagenase, tyrosinase inhibitory and antioxidant assays. *Phytochemistry Letters*, 45, 171-183.

- Dirican, A. (2013). *Tokat Florasında Doğal Yayılış Gösteren Yabani Rezene (Foeniculum vulgare Mill.) Populasyonlarının Morfolojik ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi*. (Yüksek lisans tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, 7(7), 1085–1097.
- El Finou, H., Bammou, M., Zaid, A., El Rhaffari, L. (2023). Nutritional composition, sensory quality and bioactivity of a dietary supplement based on the *Origanum compactum* Benth and *Foeniculum vulgare* Mill aerial part. *Journal of Food and Nutritional Research*, 62(3), 236-244.
- European Pharmacopoeia, 4th edition, (2002), Council of Europe, Strasbourg.
- Garrett, R. H., Grisham, C. M. (2017). *Biochemistry* (6th ed.) Cengage Learning.
- Godavari, A., Amutha, K., Moorthi, N.M. (2019). In-vitro hypoglycemic effect of *Foeniculum vulgare* Mill. seeds on the carbohydrate hydrolyzing enzymes, α -Amylase and α -Glucosidase. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(10), 4441-4445.
- Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C. (Scientific Eds.), (2000). PDR for Herbal Medicines, (4th ed.) Thomson Healthcare, New Jersey.
- Hadvary, P., Lengsfeld, H., Wolfer, H. (1988). Inhibition of pancreatic lipase *in vitro* by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochemical Journal*, 256(2), 357–361.
- Harborne, J.B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. In Harborne, J.B. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 1, Academic Press, pp. 1–28.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481–504.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., Ahmed, S. (2006). Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology*, 5(10), 1107-1112.
- Heck, A. M., Yanovski, J. A., Calis, K. A. (2000). Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity. *Pharmacotherapy*, 20(3), 270-279.
- İncekara, N., (2004). Ege Bölgesi’nde sebze olarak tüketilen yabani kuşkonmaz, sirken, yabani hindiba, rezene, gelincik, çobandeğneği ve ebegümecinin bazı kimyasal analizleri. *Y.Ü. Ziraat Fak. Tarım Bilimleri Dergisi*, 14(1), 1-6.
- Jadid, N., Widodo, A.F., Ermavitalini, D., Sa'adah, N.N., Gunawan, S., Nisa, C. (2023). The medicinal Umbelliferae plant Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): Cultivation, traditional uses, phytopharmacological properties, and application in animal husbandry. *Arabian*

- Kan, Y., Kartal, M., Aslan, S., Yıldırım, N. (2006). Farklı koşullarda yetiştirilen rezene meyvelerinin uçucu yağ bileşenleri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35(2): 95-101.
- Kara, M., Türkmen, M., Soylu, S. (2022). Rezene ve defne uçucu yağ karışımlarının kimyasal bileşenlerinin ve *Pestalotiopsis funerea*'ya karşı antifungal etkinliklerinin belirlenmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(1):113-126.
- Karayel, H.B. (2019). Kütahya-Gediz koşullarında yetiştirilen rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.) bitkisinin uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (16), 131-135.
- Karayel, H.B. (2020). Doğal bor madeni kullanımının rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.)'de uçucu yağ oranı ve bileşimi üzerine etkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 1389-1395. doi.org/10.21597/jist.596182
- Khammassi, M., Mighri, H., Ben Mansour, M., Amri, İ., Jamoussi, B., Khaldi, A. (2022). Metabolite profiling and potential antioxidant activity of sixteen fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) populations growing wild in Tunisia. *South African Journal of Botany*, 148: 407-414.
- Kim, H.K., Jeon, Y.J., Lee, S.R., Park, J.H. (2020). Regulation of glucose homeostasis by α -amylase inhibitors: implications for obesity and diabetes. *Food Chemistry*, 123(4), 1020–1026.
- Kim, Y.J., Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15), 1707-1723.
- Kima, Y.J., Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Science*, 62, 1707-1723.
- Koppula, S., Kumar, H. (2013). *Foeniculum vulgare*: A comprehensive overview of its pharmacological properties. *Journal of Ayurvedic and Integrative Medicine*, 4(2), 77-83.
- Koru, T. (2019). *Foeniculum vulgare* Miller (Rezene) Bitkisinin Fitoterapide Kullanımı. (Yüksek lisans tezi). Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Kwon, Y., Apostolidis, E., Shetty, K. (2006). Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 32(1), 15-31.
- Licata, M., Tuttolomondo, T., vd. (2016). A survey of wild plant species for food use in Sicily (Italy) - results of a 3-year study in four Regional Parks. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12: DOI10.1186/s13002-015-0074-7.

- Majdoub, N., el-Guendouz, S., Rezgui, M., vd. (2017). Growth, photosynthetic pigments, phenolic content and biological activities of *Foeniculum vulgare* Mill., *Anethum graveolens* L. and *Pimpinella anisum* L. (Apiaceae) in response to zinc. *Industrial Crops and Products*, 109, 627-636.
- Marrelli, M., Lupia, C., Argentieri, M.P., Bava, R., Castagna, F., Cozza, N., Mollace, V., Palma, E., Statti, G. (2024). *Foeniculum vulgare* Mill. aerial parts (Italian 'Finocchio di Isola Capo Rizzuto' PGI): Valorization of agri-food waste as a potential source of lipase inhibitors and antioxidants. *Resources*. 13(7), 89. <https://doi.org/10.3390/resources13070089>
- Masuda, T., Fujita, N., Odaka, Y., Takeda, Y., Yonemori, S., Nakamoto, K., Kuninaga, H. (2007). Tyrosinase inhibitory activity of ethanol extracts from medicinal and edible plants cultivated in Okinawa and identification of a water-soluble inhibitor from the leaves of *Nandina domestica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(9), 2316-2320. <https://doi.org/10.1271/bbb.70249>
- Mendes, E., Perry, M.d.J., Francisco, A.P. (2014). Design and discovery of mushroom tyrosinase inhibitors and their therapeutic applications. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 9(5), 533-554.
- Miguel, M.G., Cruz, C., Faleiro, L., Simões, M.T, Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2010). *Foeniculum vulgare* essential oils: Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Communication*, 5(2), 319-28.
- Molyneux, P. (2004). The use of the DPPH free radical method to evaluate antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 26(3), 211-219.
- Mueed, A., Shibli, S., Al-Quwaie, D., vd. (2023). Extraction, characterization of polyphenols from certain medicinal plants and evaluation of their antioxidant, antitumor, antidiabetic, antimicrobial properties, and potential use in human nutrition. *Frontier in Nutrition*, Volume 10-2023.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2021). *Lehninger Principles of Biochemistry* (8th ed.). W. H. Freeman.
- Oetting, W.S., King, R.A. (1999). Molecular basis of albinism: Mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism. *Human Mutation*, 13(2), 99-115.
- Önal, F.N. (2021). *Türkiye’de Yayılış Gösteren Cistus L. Türlerinin Kolinesteraz ve Tirozinaz Enzim İnhibitör Potansiyelinin Araştırılması*. (Yüksek lisans tezi). Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Punetha, D., Tewari, G., Pande, C., Bhatt, S. (2019). Effect of climatic conditions on the volatile compounds of the aerial parts of *Foeniculum vulgare* Mill., *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22:4, 1093-1103, DOI:10.1080/0972060X.2019.1662330
- Seçkin, T. (2014). *İşlevsel Bitki Kimyası* Ankara: Nobel

- Servi, H., Şen, A., Yıldırım Servi, E., Doğan, A. (2021). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Foeniculum vulgare* Mill. and *Daucus carota* L. growing wild in Turkey. *Journal of Research in Pharmacy*, 25(2), 142-152. DOI: 10.29228/jrp.5
- Shahat, A. A., Hammouda, F. M., Shams, K. A., & Saleh, M. A. (2012). Comparative chemical analysis of the essential oil of wild and cultivated fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(2), 314–319. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644053>
- Shahidi, F., & Naczki, M. (2004). *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press.
- Sharafan, M., Malinowska, M.A., Kubicz, M., Kubica, P., Gémin, M.P., et. al. (2023). Shoot cultures of *Vitis vinifera* (Vine grape) different cultivars as a promising innovative cosmetic raw material-phytochemical profiling, antioxidant potential, and whitening activity. *Molecules*, 28(19), 6868. <https://doi.org/10.3390/molecules28196868>
- Singh, G. (2020). The nutritional and therapeutic benefits of fennel. *Food Science and Nutrition*, 10(4), 182-194.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sjöström, L., Rissanen, A., Andersen, T., vd. (1998). Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. *Lancet*, 352(9123), 167–172.
- Solano, F. (2014). Melanins: Skin pigments and much more-Types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, 498276.
- Streb, A.G., Fischer, D.N., Khan, F.S. (2018). Pancreatic α -amylase: A putative diagnostic marker and therapeutic target in type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology*, 239(1), R1–R10.
- Şanlı, A., Karadoğan, T., Baydar, H. (2008). Doğal olarak yetişen tatlı rezene (*Foeniculum vulgare* Mill. var. dulce)’nin farklı büyüme ve gelişme dönemlerinde uçucu yağ miktarı ile bileşenlerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(2), 17-22.
- Tan, Y., Chang, S. K.C., Zhang, Y. (2017). Comparison of α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food Chemistry*, 214, 259–268.
- Tekgül, Y., Çalışkan Koç, G. (2020). Arapsaçı otunun (*Foeniculum vulgare*) kuruma kinetiğinin incelenmesi ve kuruma davranışının modellenmesi. *GIDA*, (45)3, 676-688.

Urango, A.C.M., Strieder, M.M., Silva, E.K., Meireles, M.A.A. (2021). Thermosonication process design for recovering bioactive compounds from fennel: A comparative study with conventional extraction techniques. *Applied Sciences*, 11, 12104. <https://doi.org/10.3390/app112412104>

URL-1 (<https://organigiz.org/urun/12299/>) (Kasım 2024)

URL-2 <https://www.greenada.com/arapsaci> (Kasım 2024)

Uysal, Ş., Zengin, G., Aktumsek, A., Karatas, S. (2016). Chemical and biological approaches on nine fruit tree leaves collected from the Mediterranean region of Turkey. *Journal of Functional Foods*, 22, 518-532, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.006>.

Van der Maarel, M.J.E.C., van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137–155.

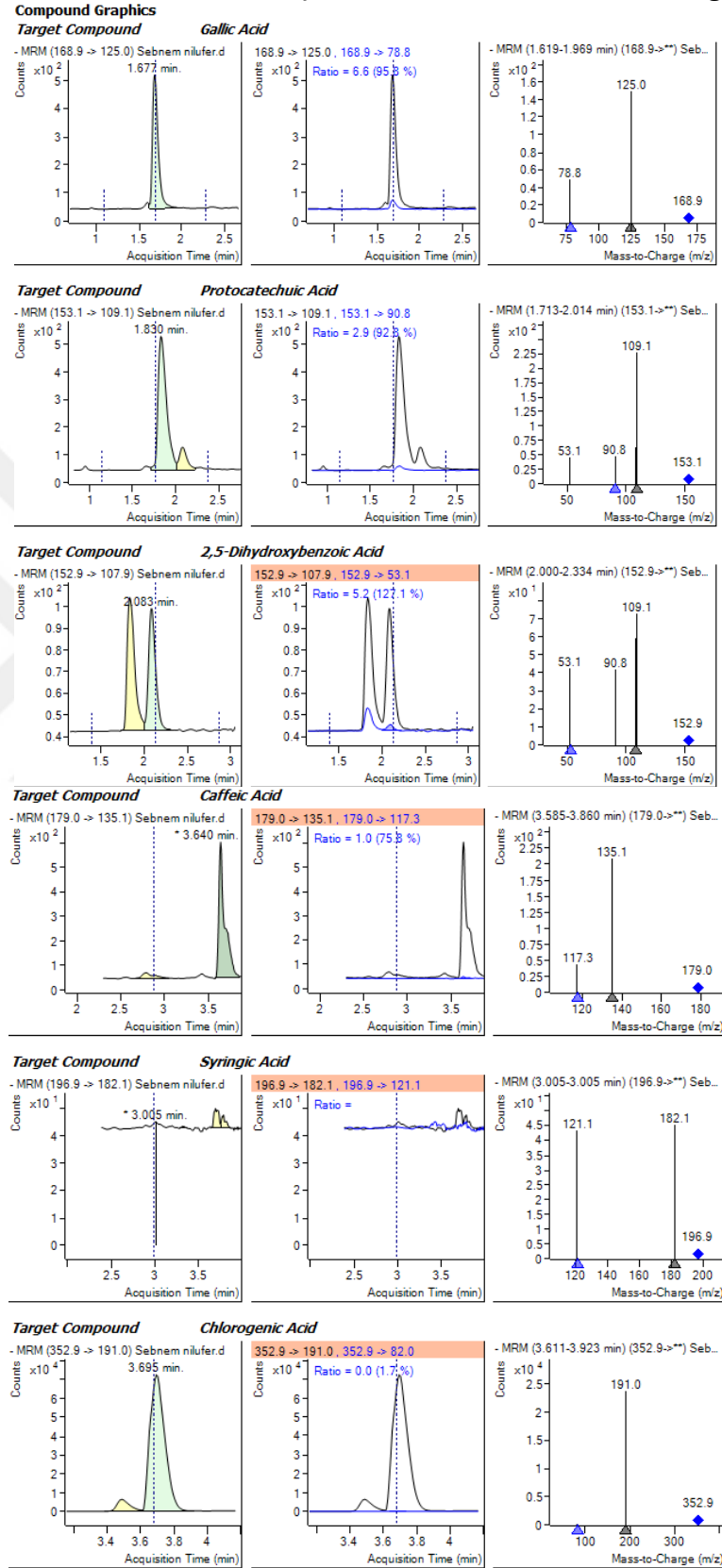
Voet, D., & Voet, J. G. (2011). *Biochemistry* (4th ed.). John Wiley & Sons.

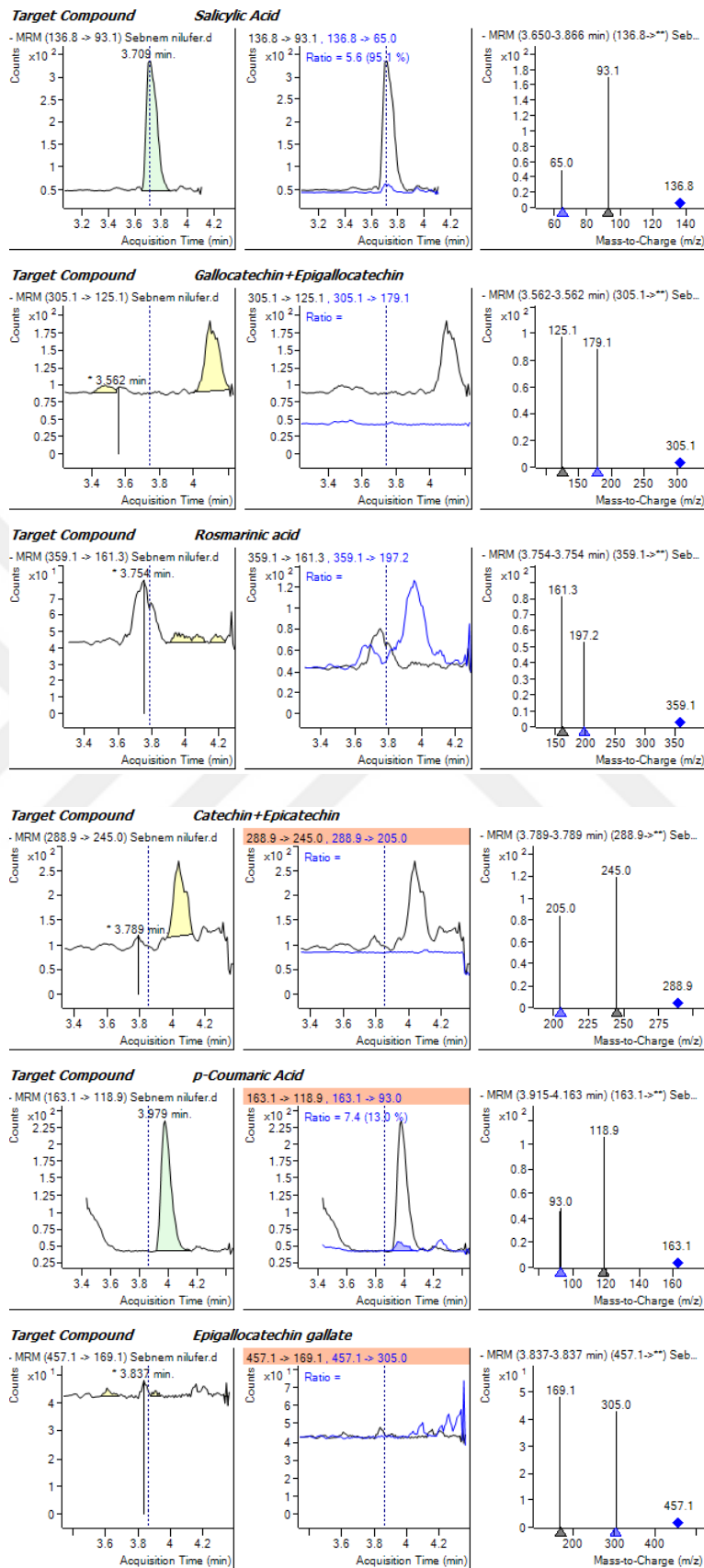
WHO (2000). Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. World Health Organization.

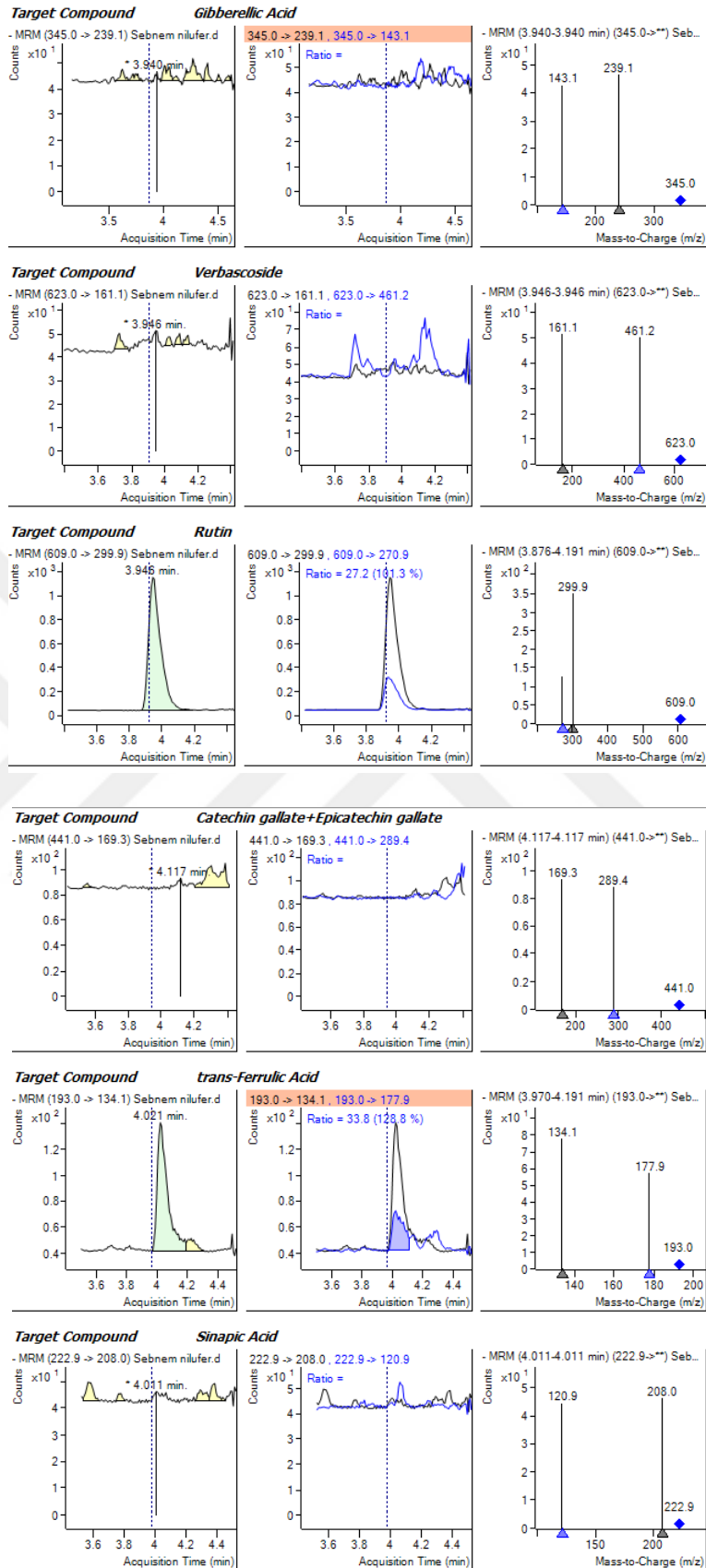
Zeybek, U., Zeybek, N. (2002) *Farmasötik Botanik*. İzmir:Ege Üniv. Ecz. Fak. Yayınları

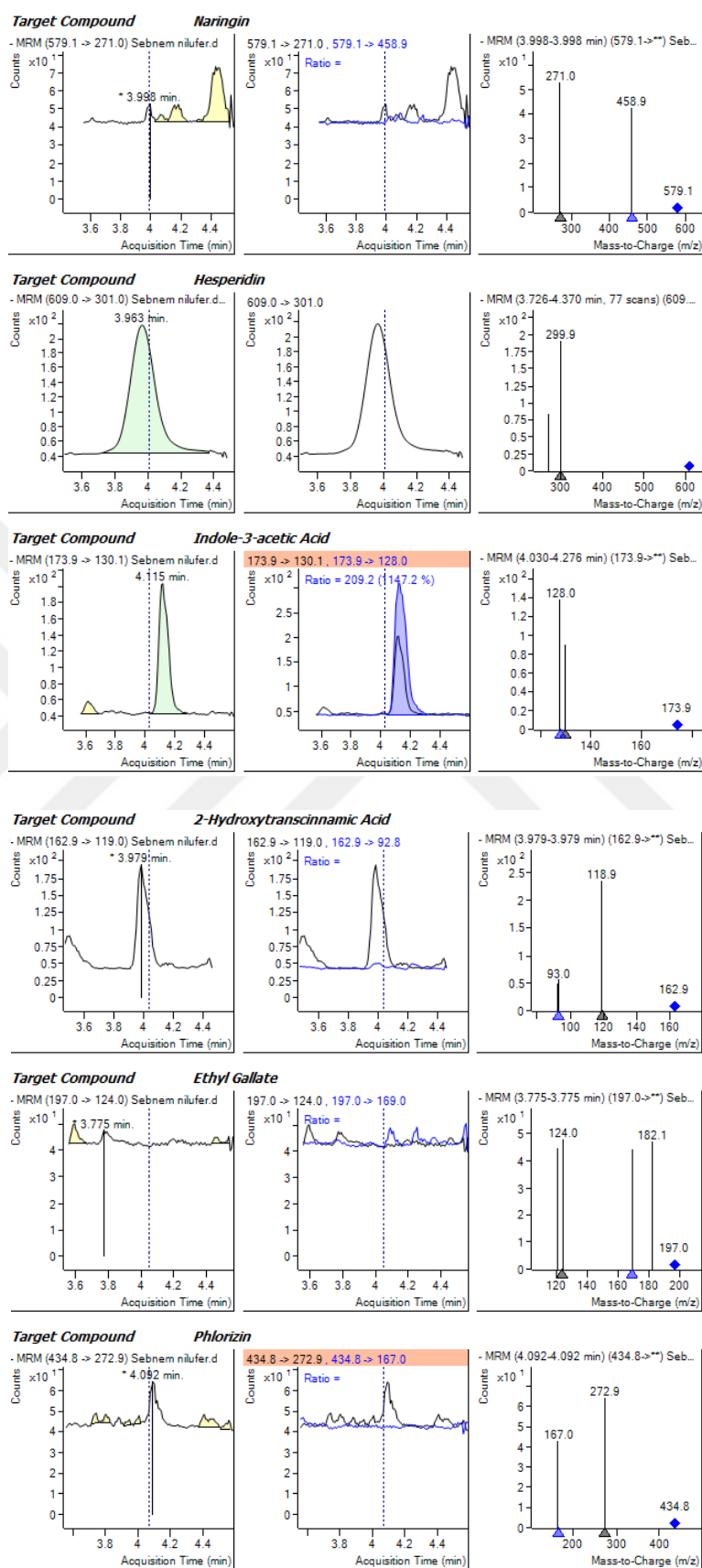
EKLER

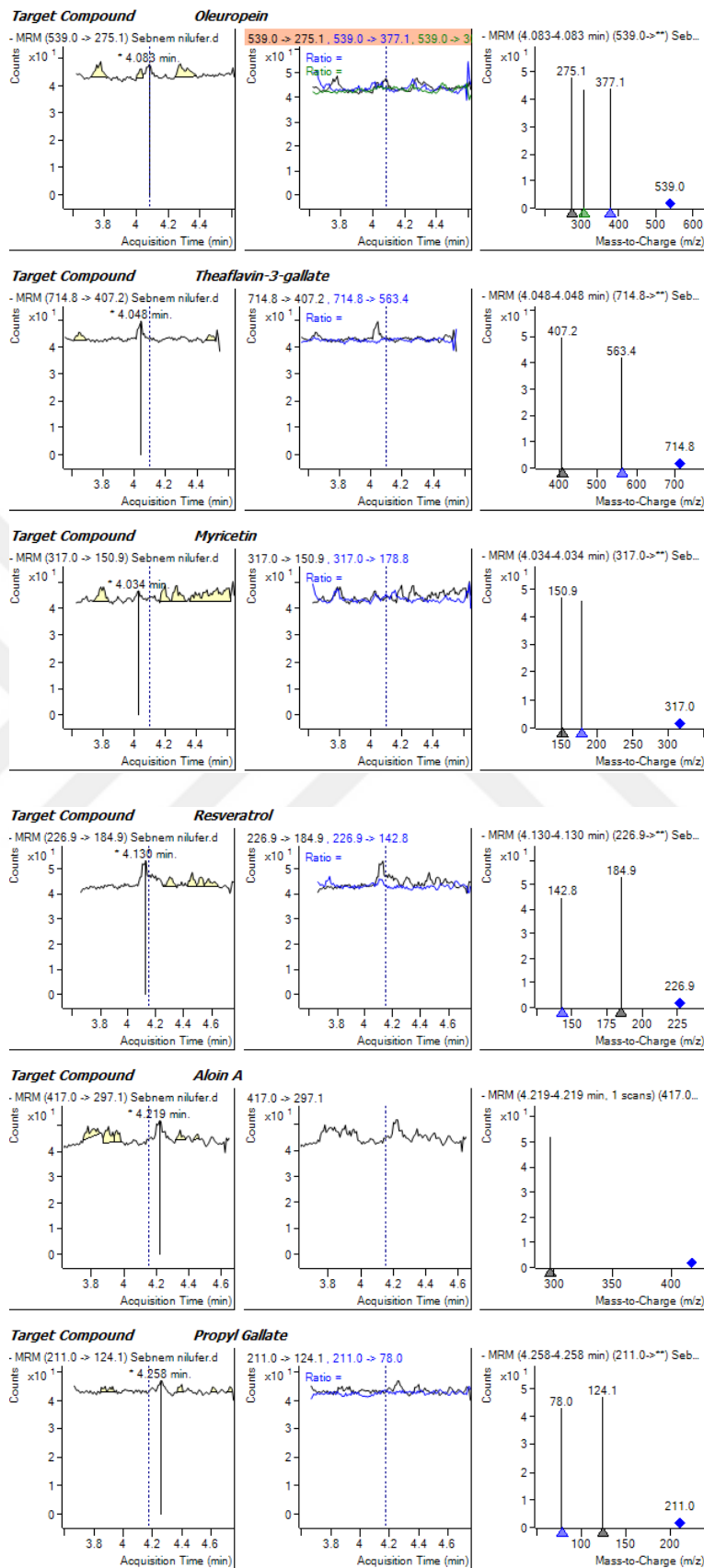
Ek 1a. Etanol ekstraktının fenolik bileşenlerine ait LC-MS/MS kromatogramları

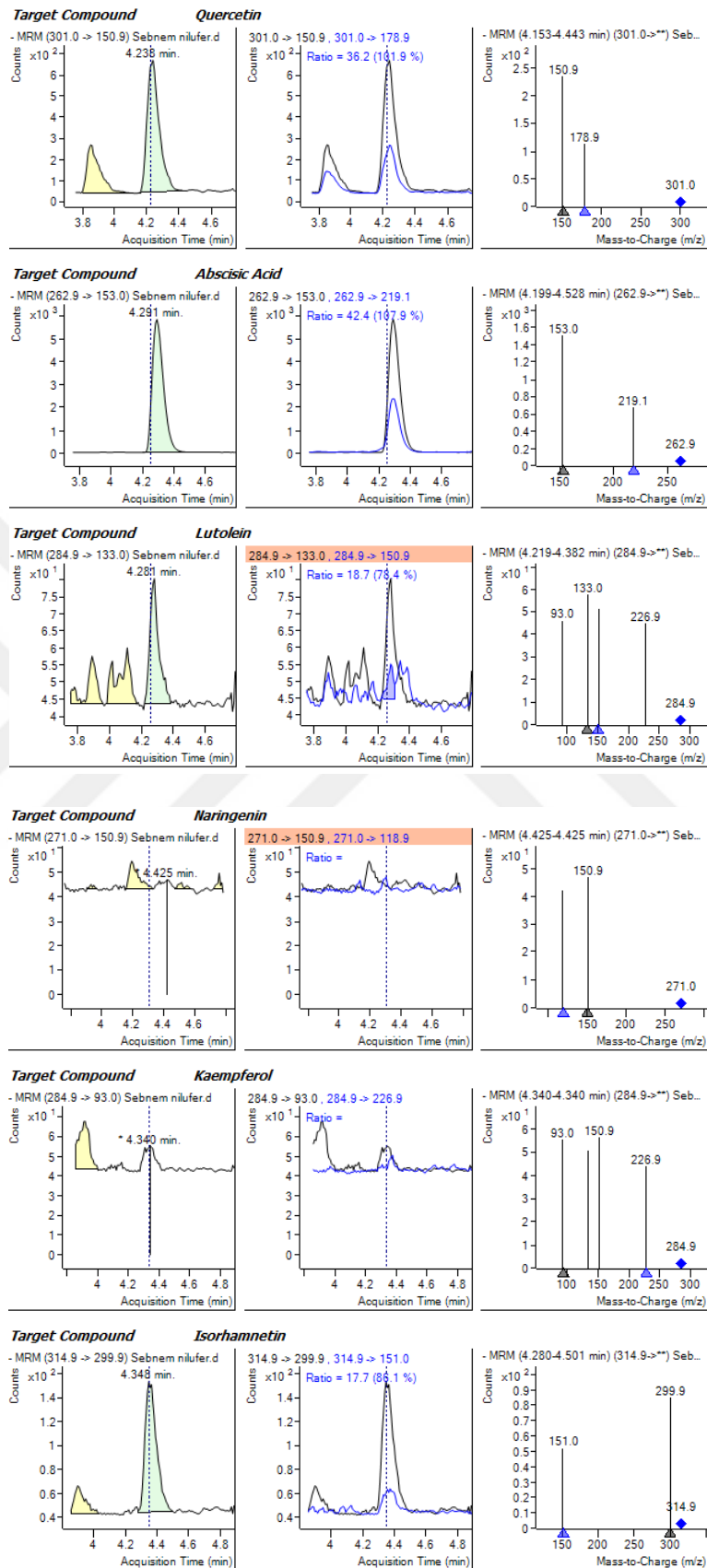


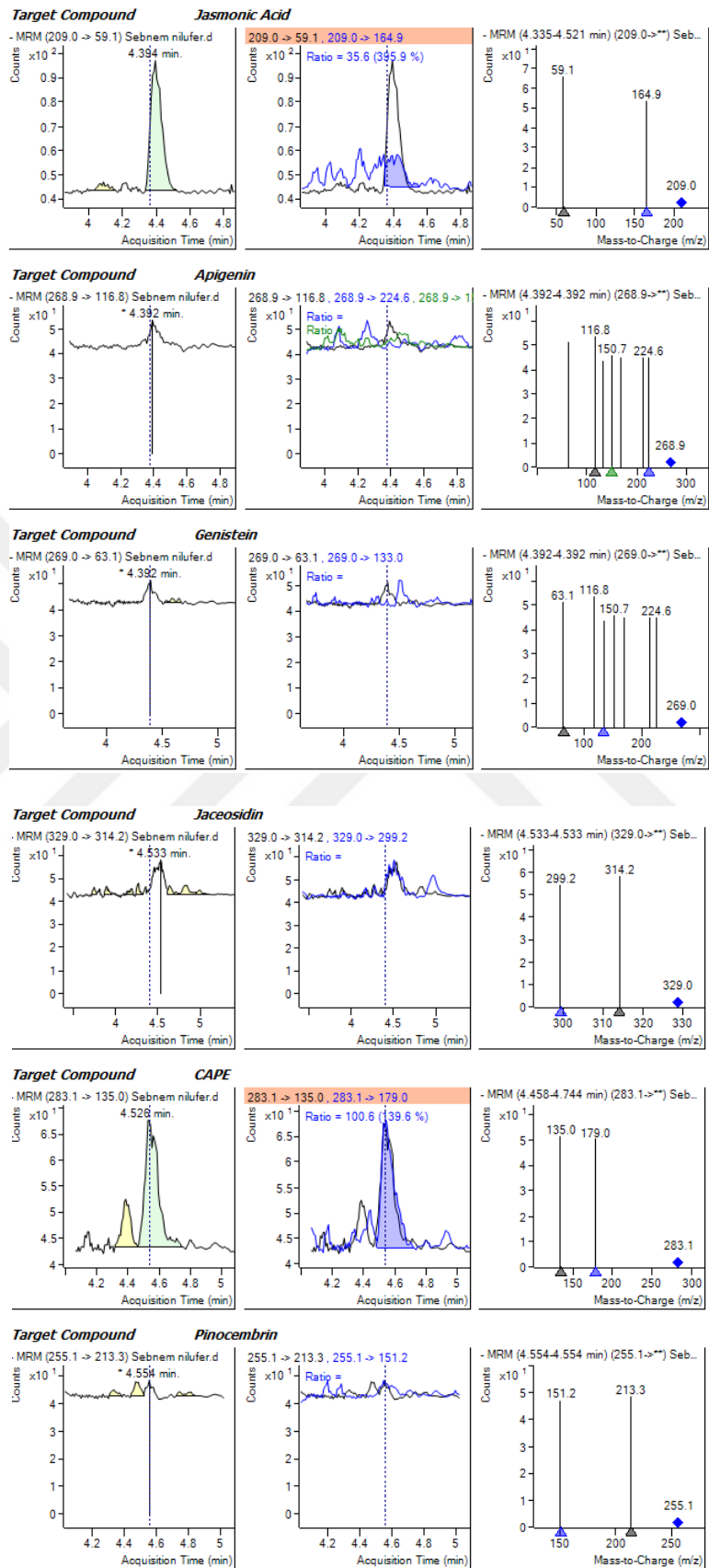


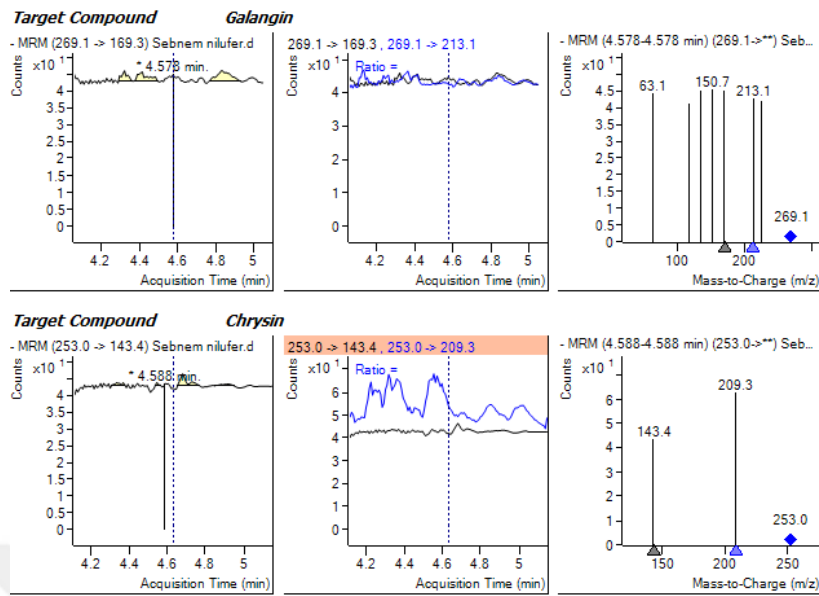




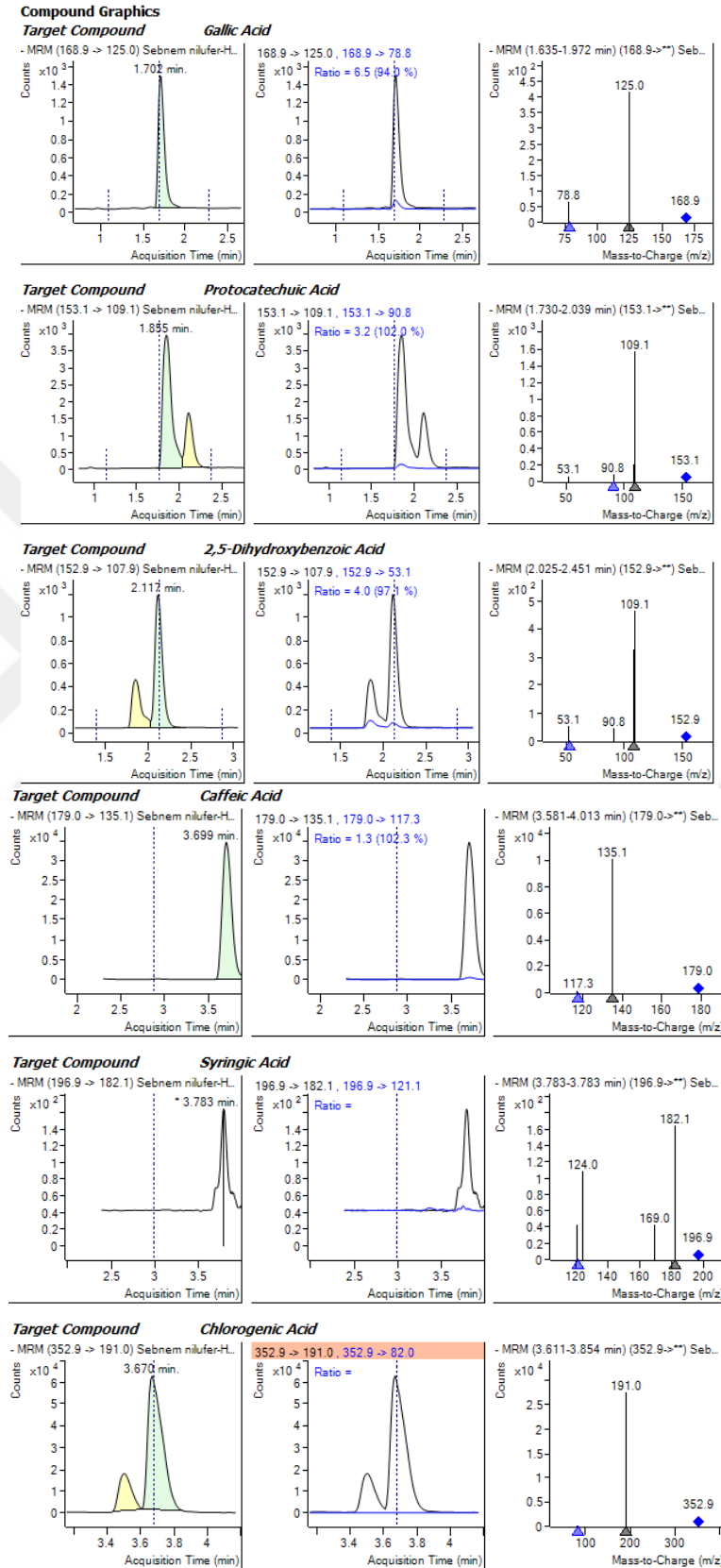


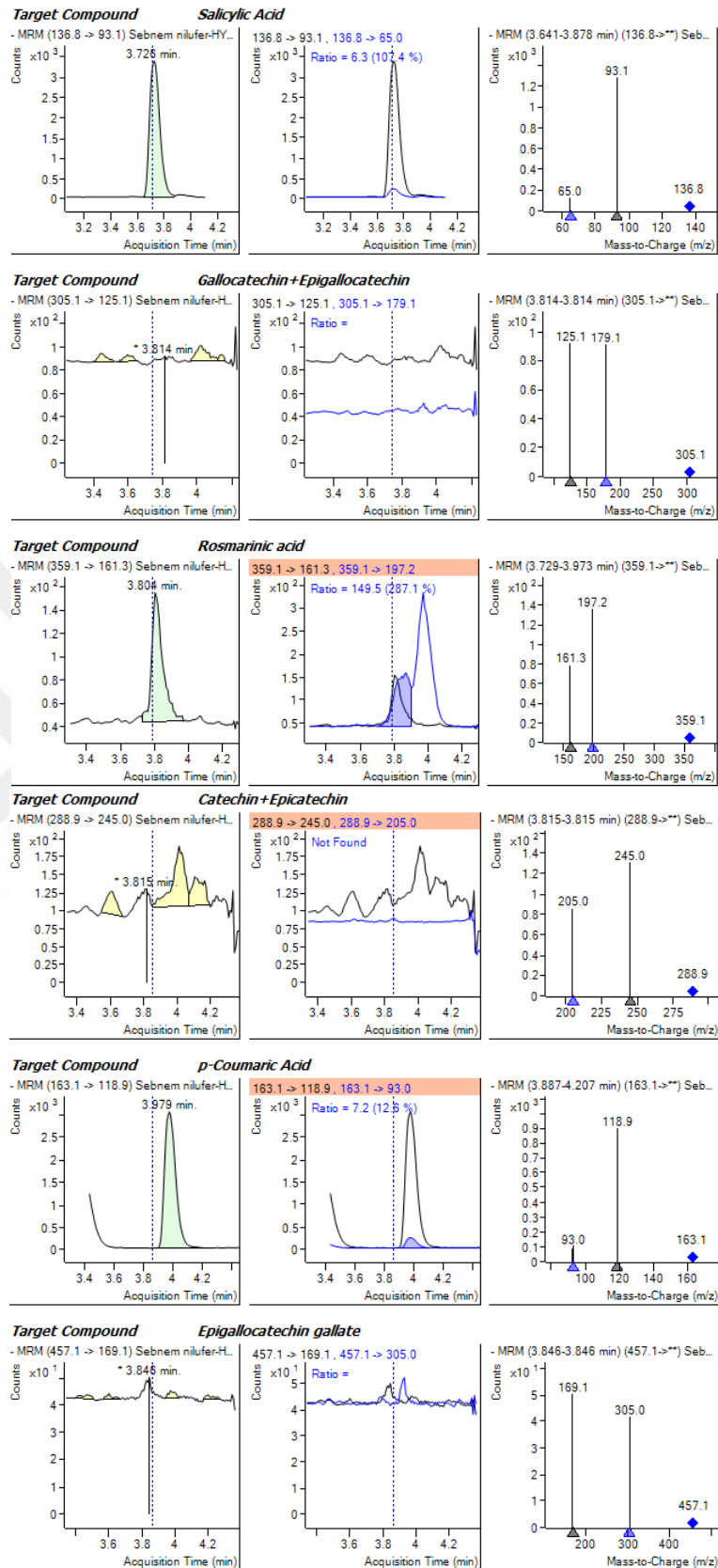


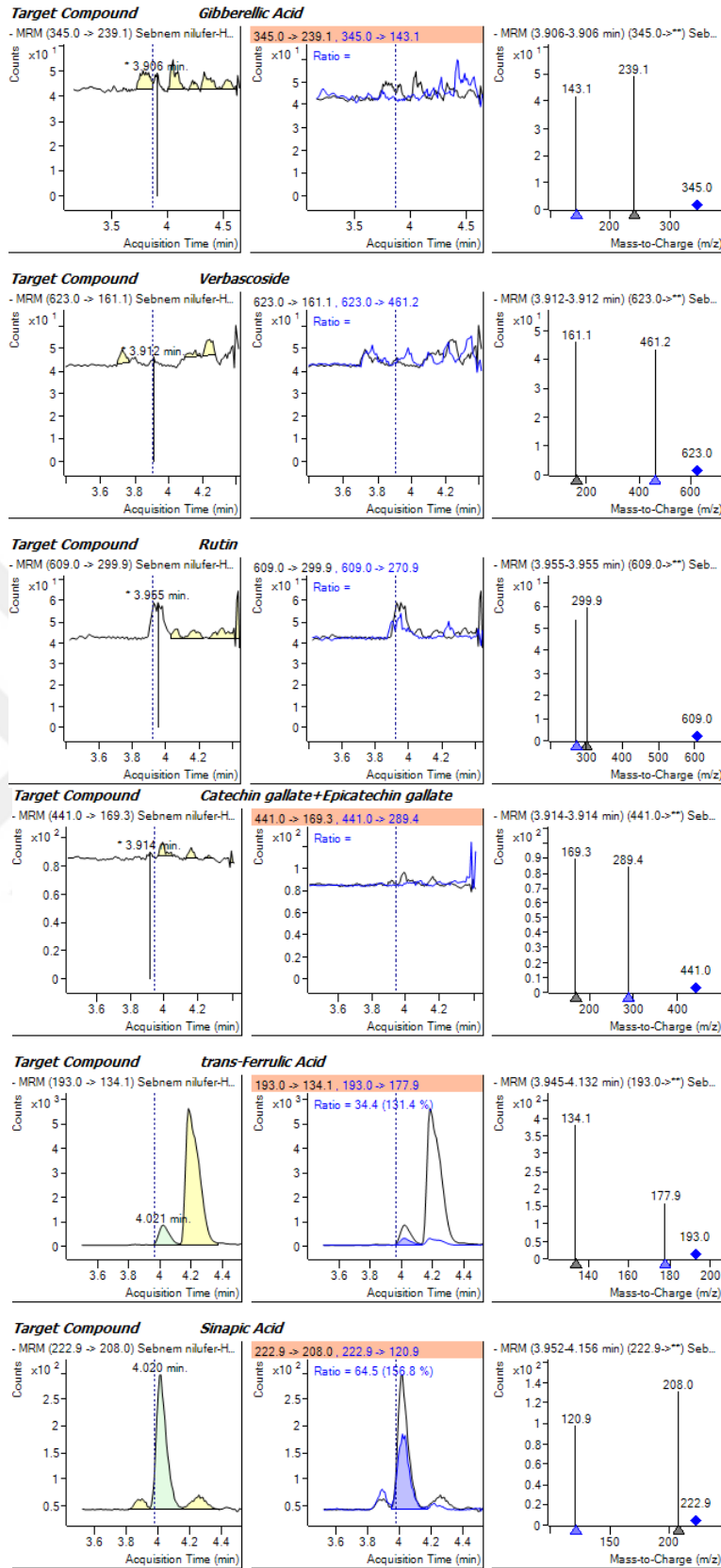




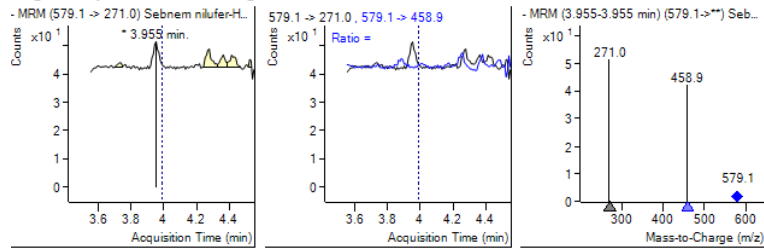
Ek 1b. Asidik hidroliz uygulanmış etanol ekstraktının fenolik bileşenlerine ait LC-MS/MS kromatogramları



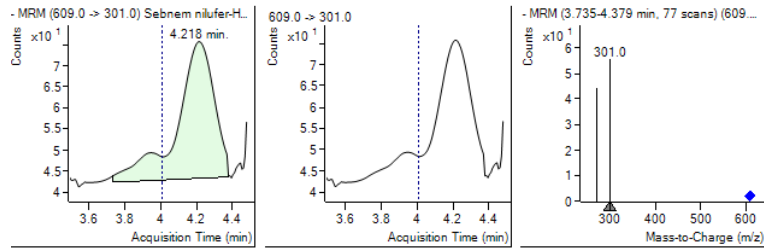




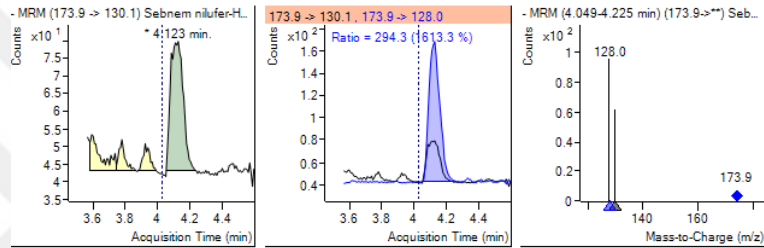
Target Compound *Naringin*



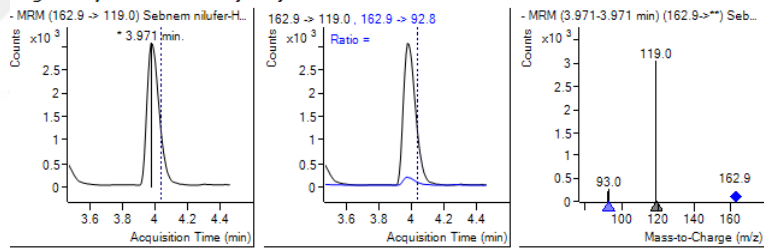
Target Compound *Hesperidin*



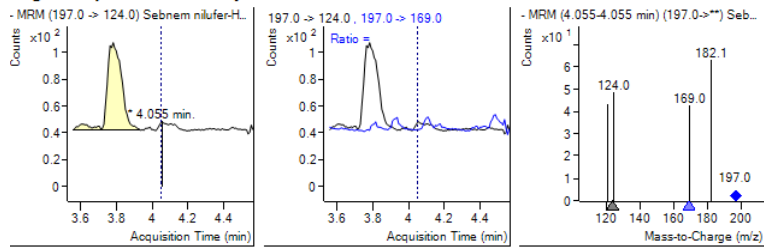
Target Compound *Indole-3-acetic Acid*



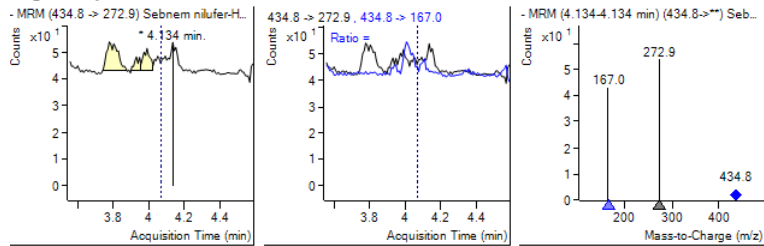
Target Compound *2-Hydroxytranscinnamic Acid*

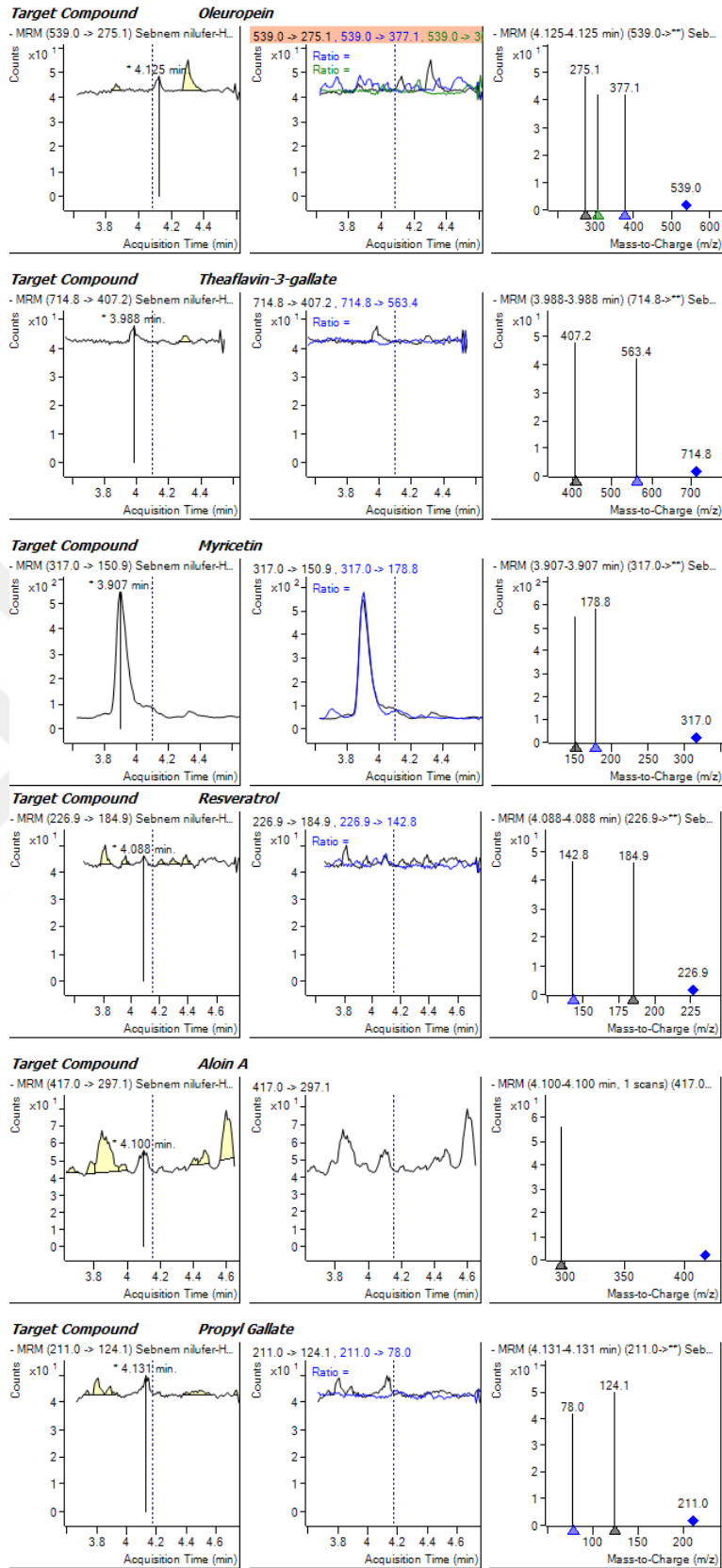


Target Compound *Ethyl Gallate*

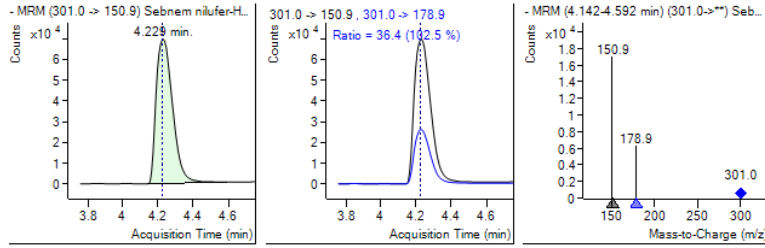


Target Compound *Phlorizin*

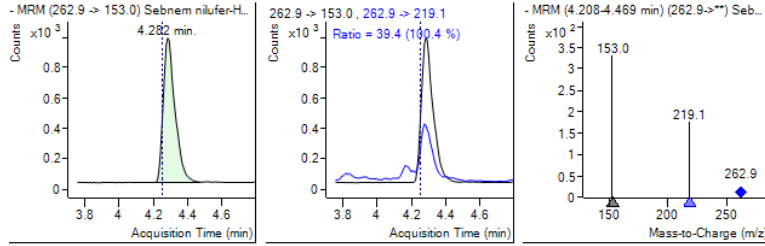




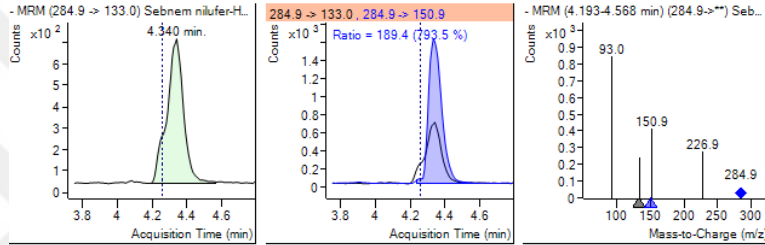
Target Compound Quercetin



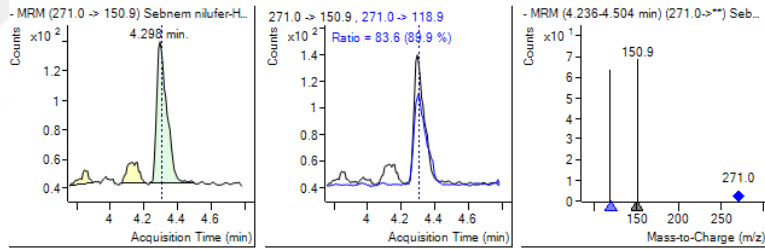
Target Compound Abscisic Acid



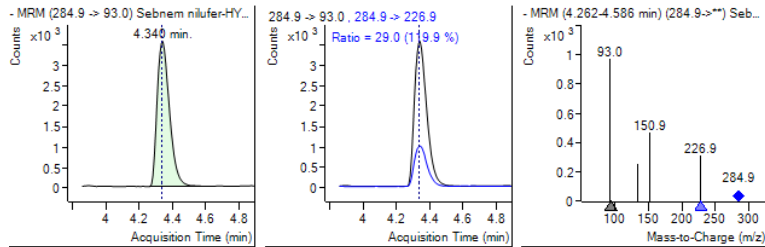
Target Compound Lutolein



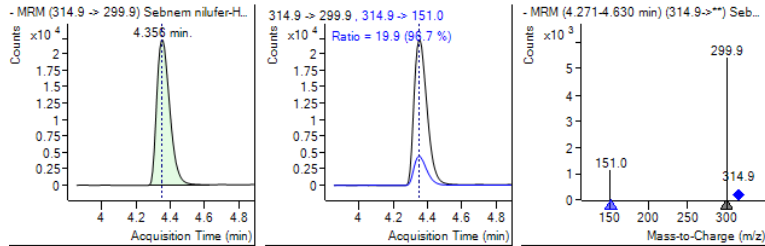
Target Compound Naringenin

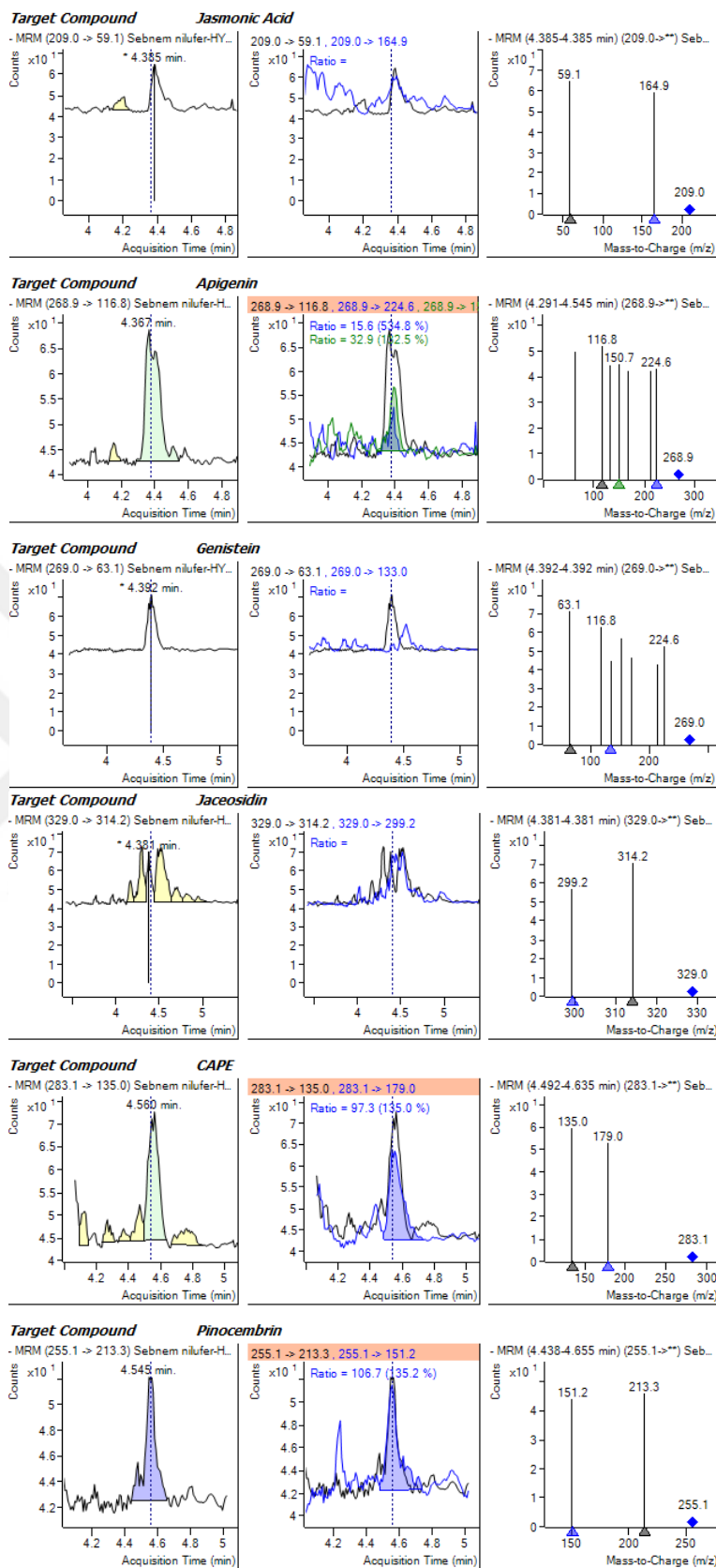


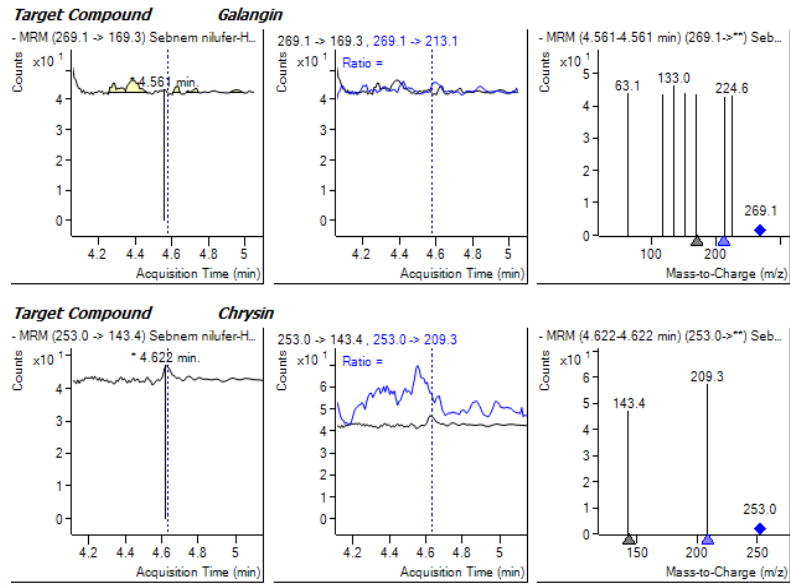
Target Compound Kaempferol



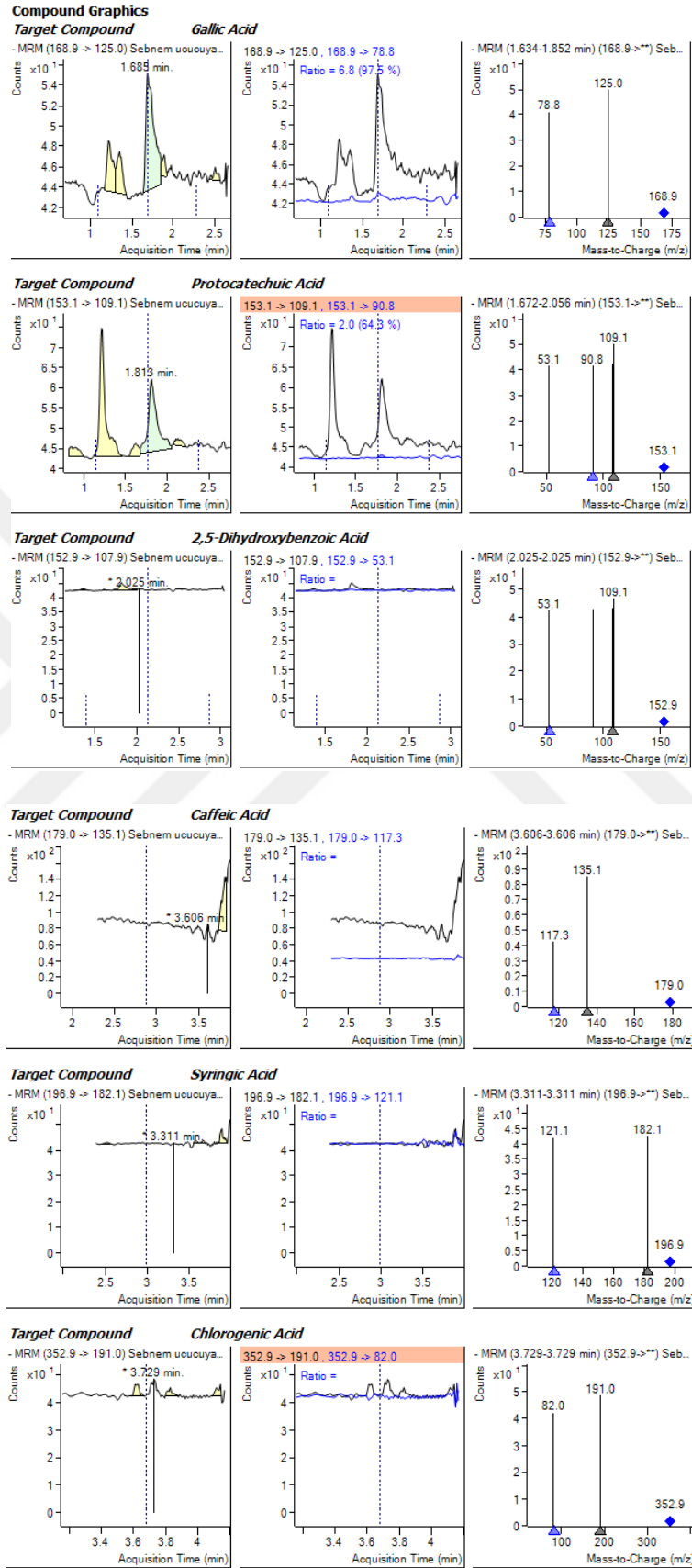
Target Compound Isorhamnetin

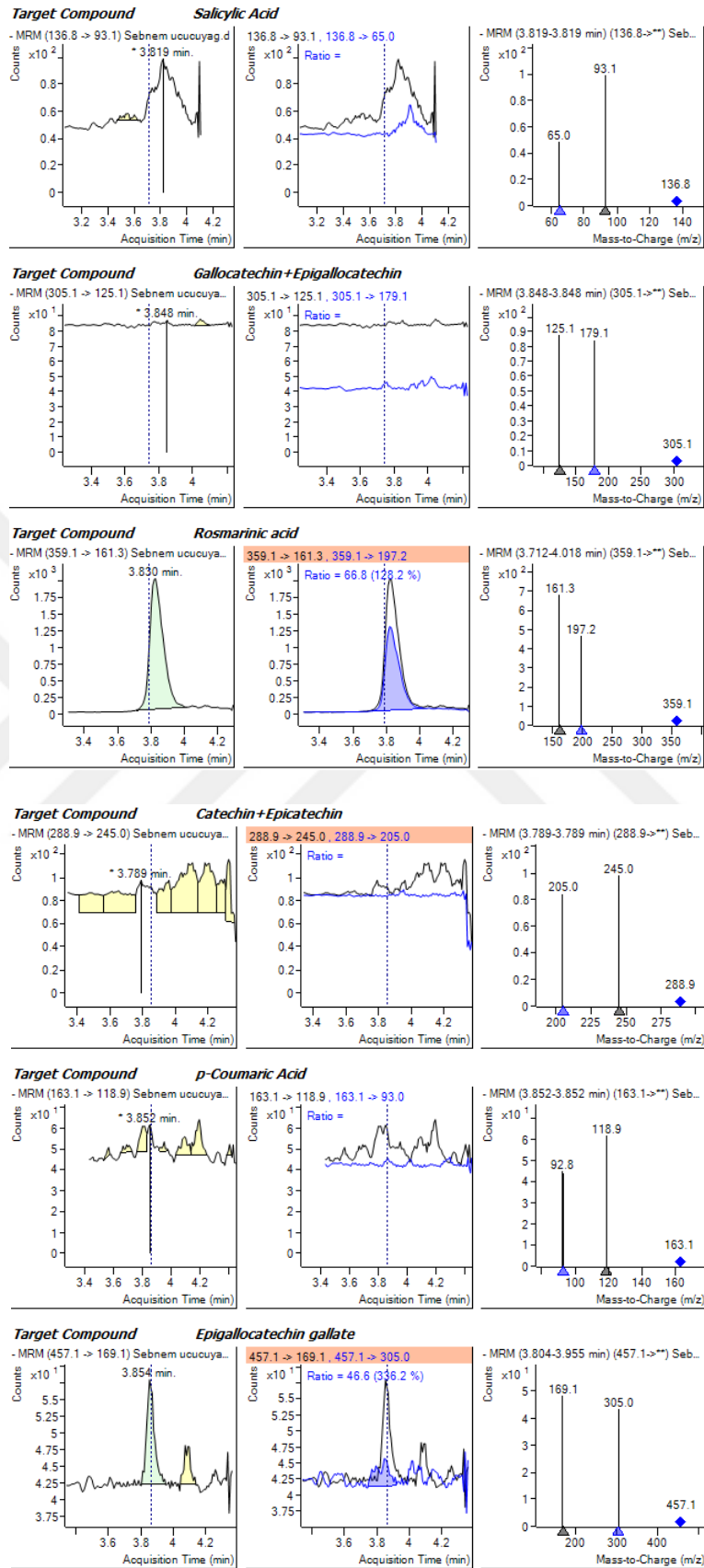


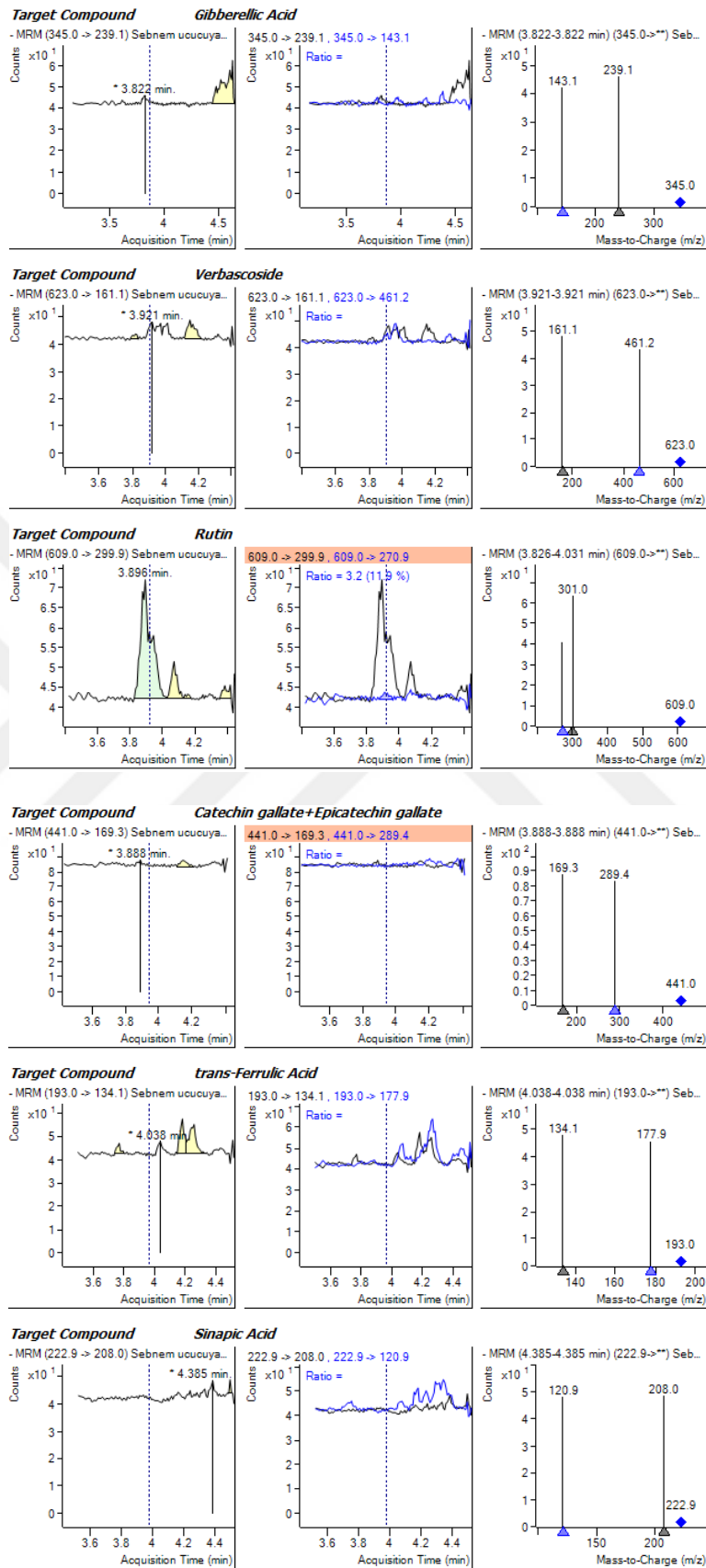




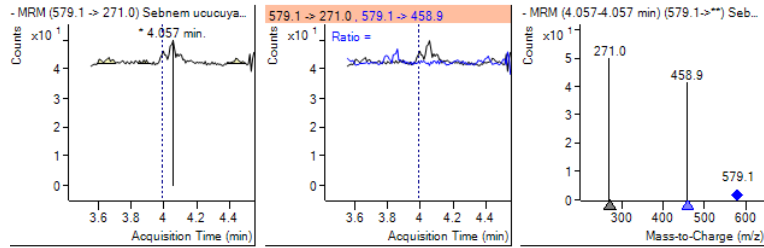
Ek 2a. Uçucu yağın fenolik bileşenlerine ait LC-MS/MS kromatogramları



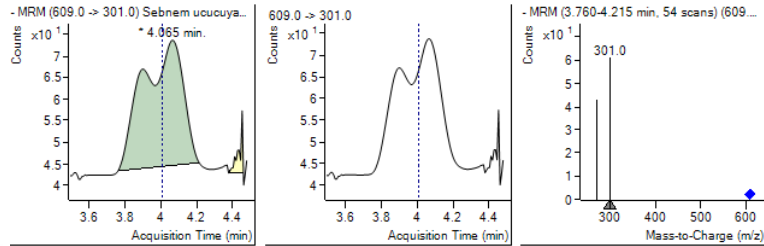




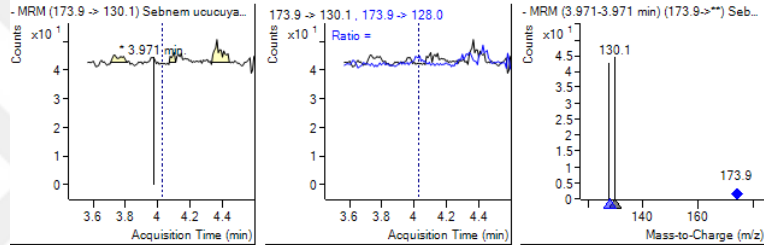
Target Compound Naringin



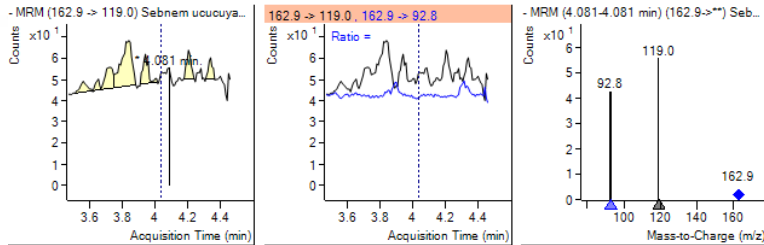
Target Compound Hesperidin



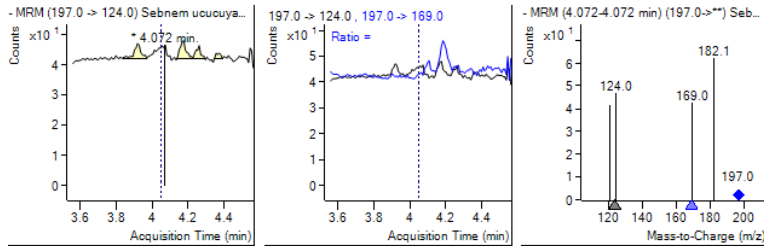
Target Compound Indole-3-acetic Acid



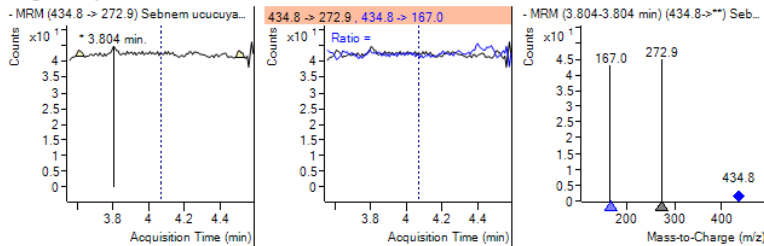
Target Compound 2-Hydroxytranscinnamic Acid

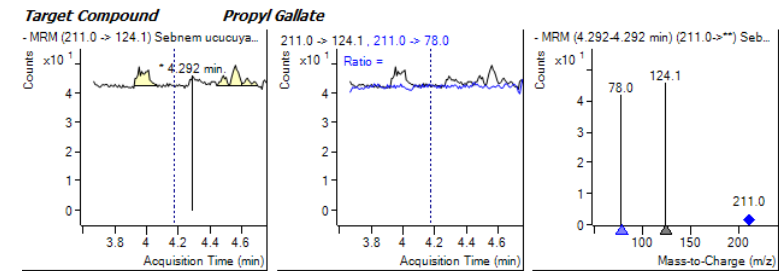
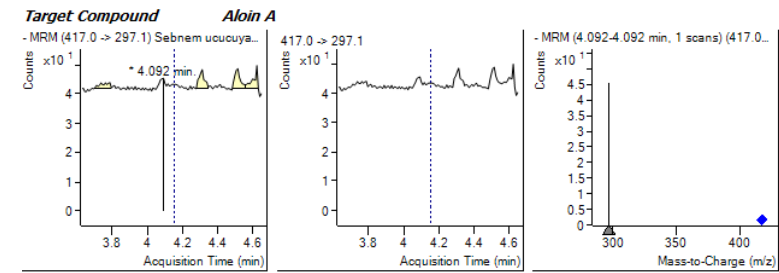
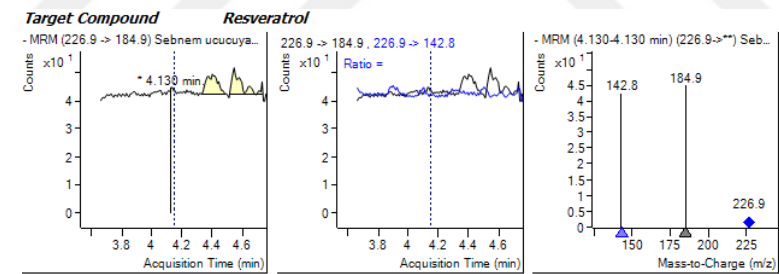
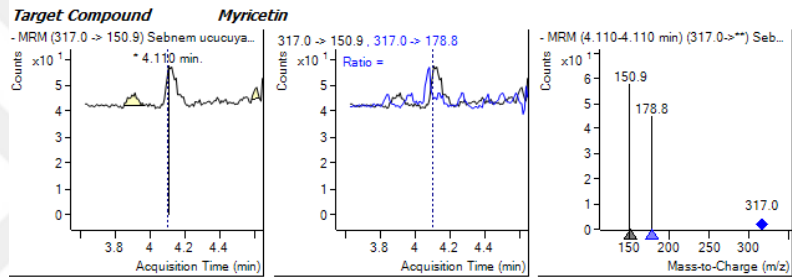
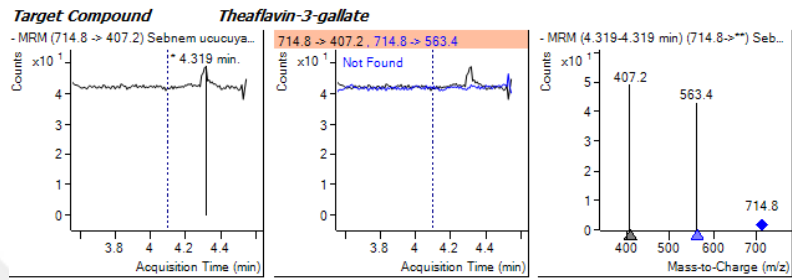
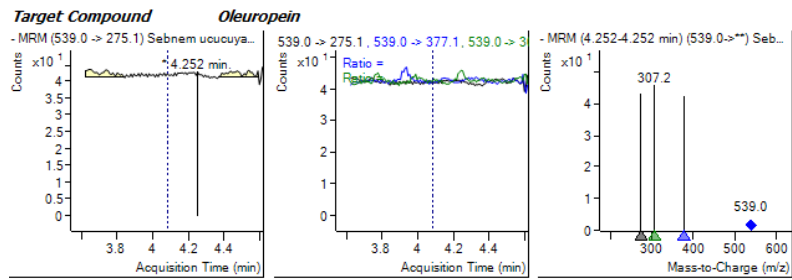


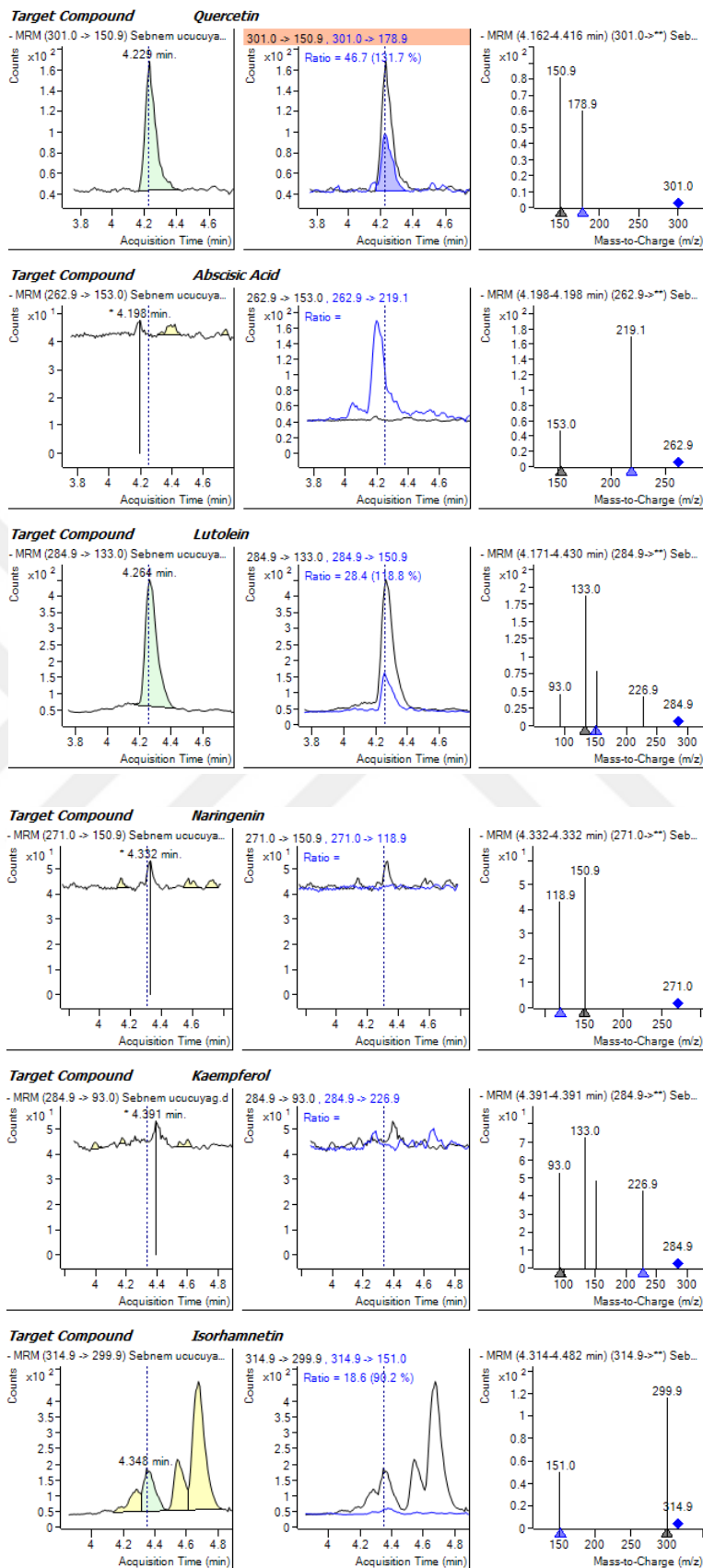
Target Compound Ethyl Gallate

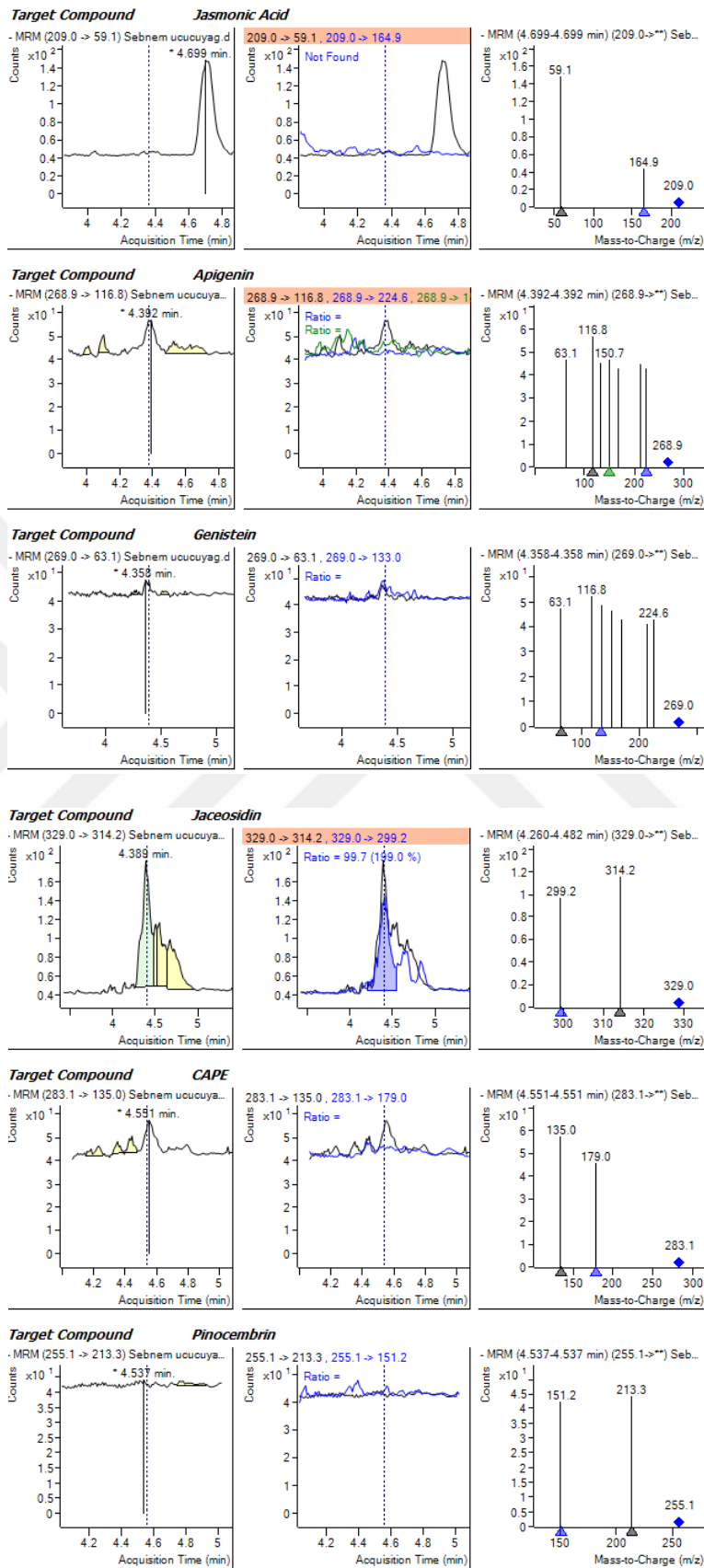


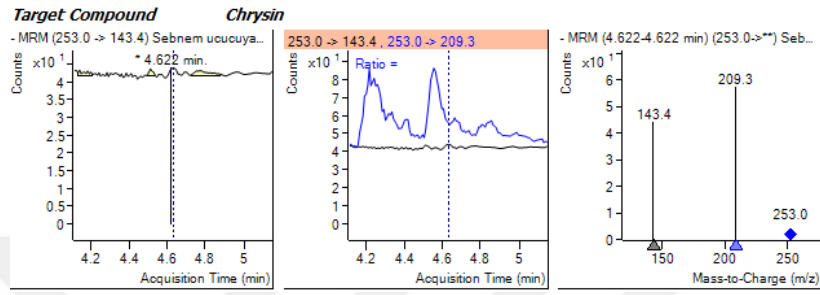
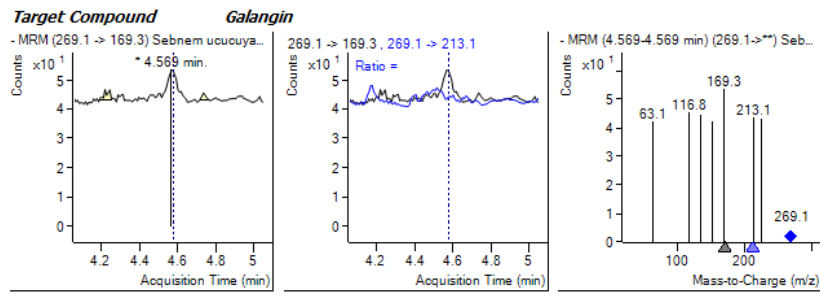
Target Compound Phlorizin



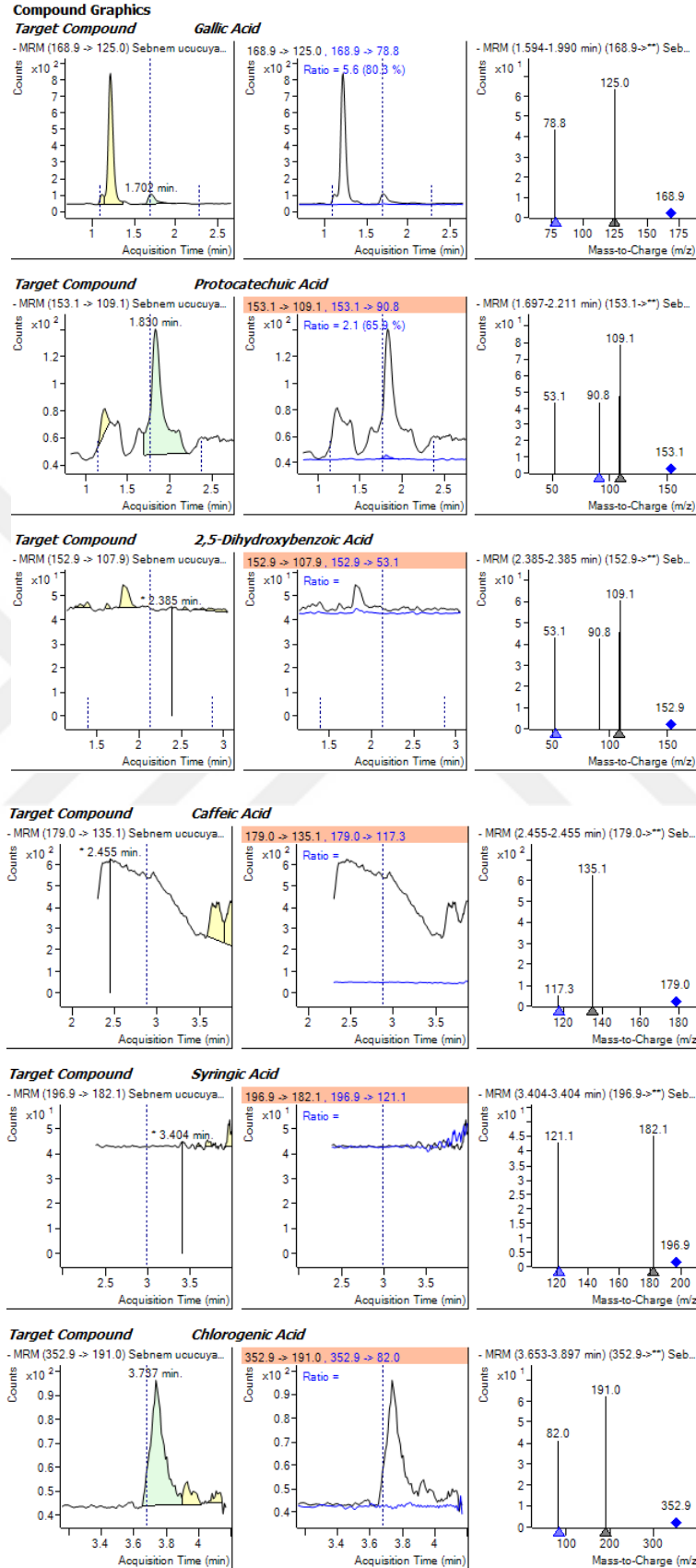


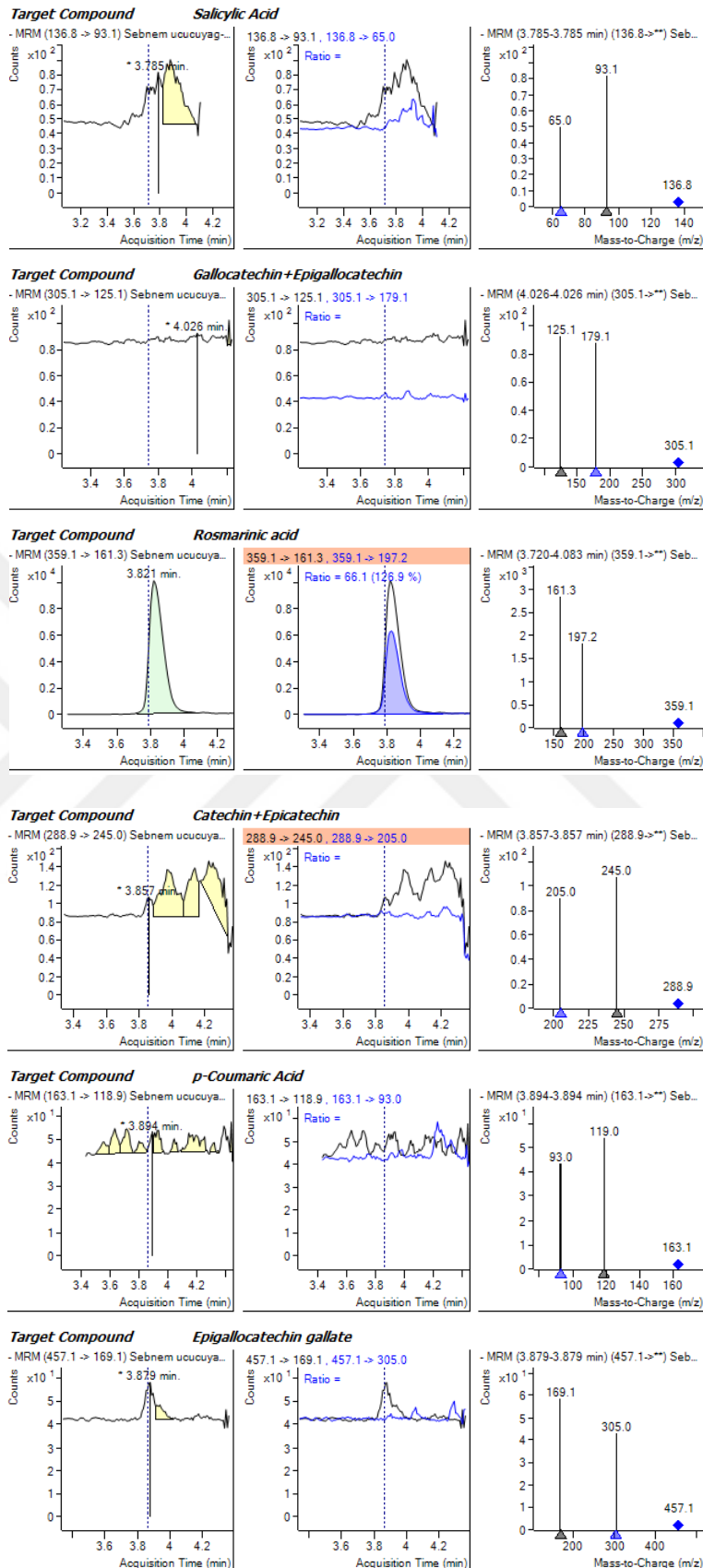


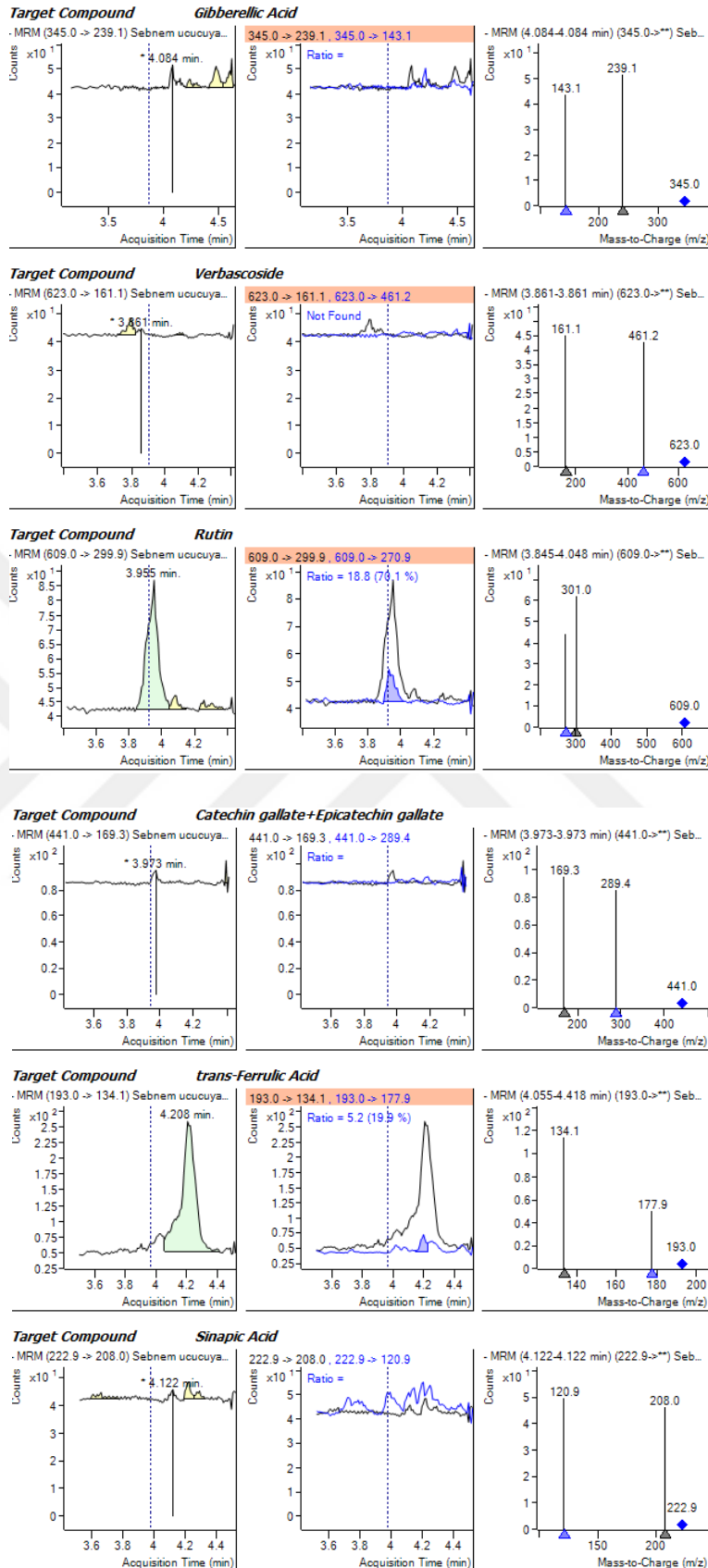




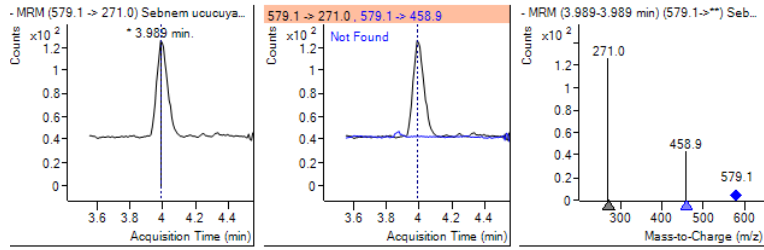
Ek 2b. Asidik hidroliz uygulanmış uçucu yağın fenolik bileşenlerine ait LC-MS/MS kromatogramları



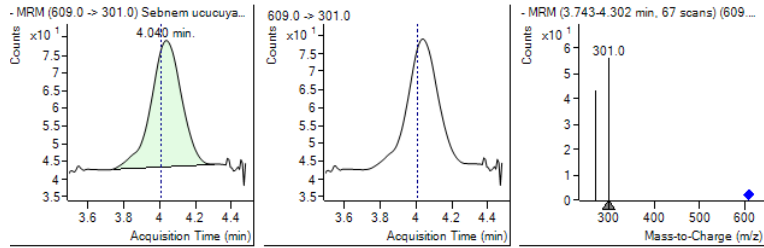




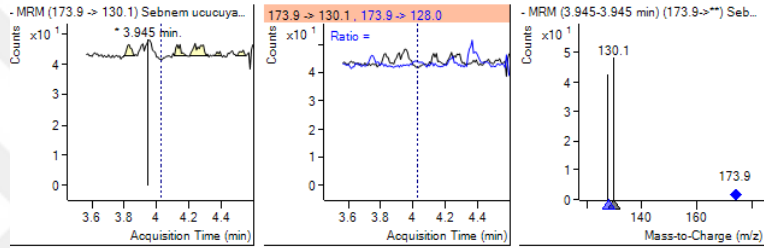
Target Compound *Naringin*



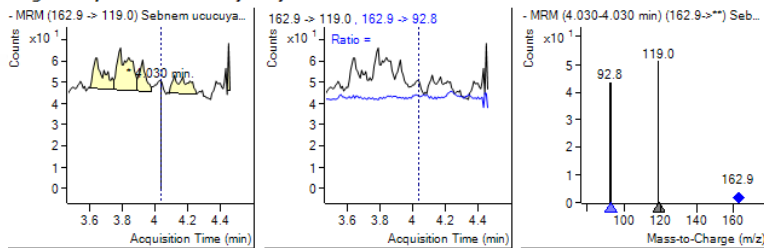
Target Compound *Hesperidin*



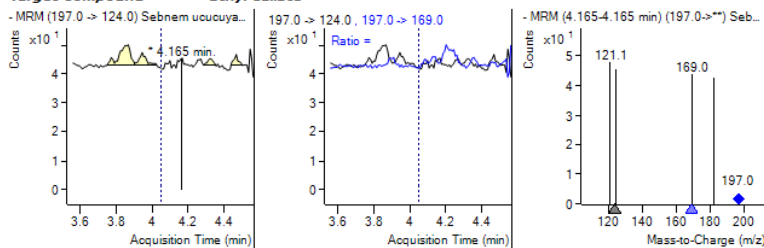
Target Compound *Indole-3-acetic Acid*



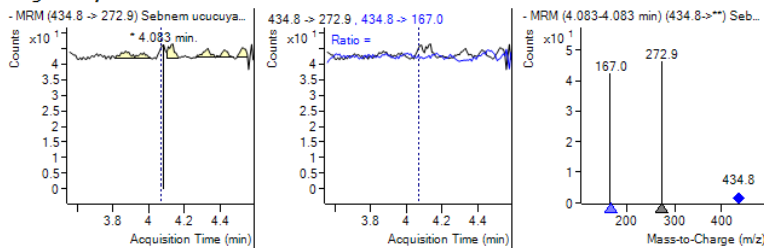
Target Compound *2-Hydroxytranscinnamic Acid*

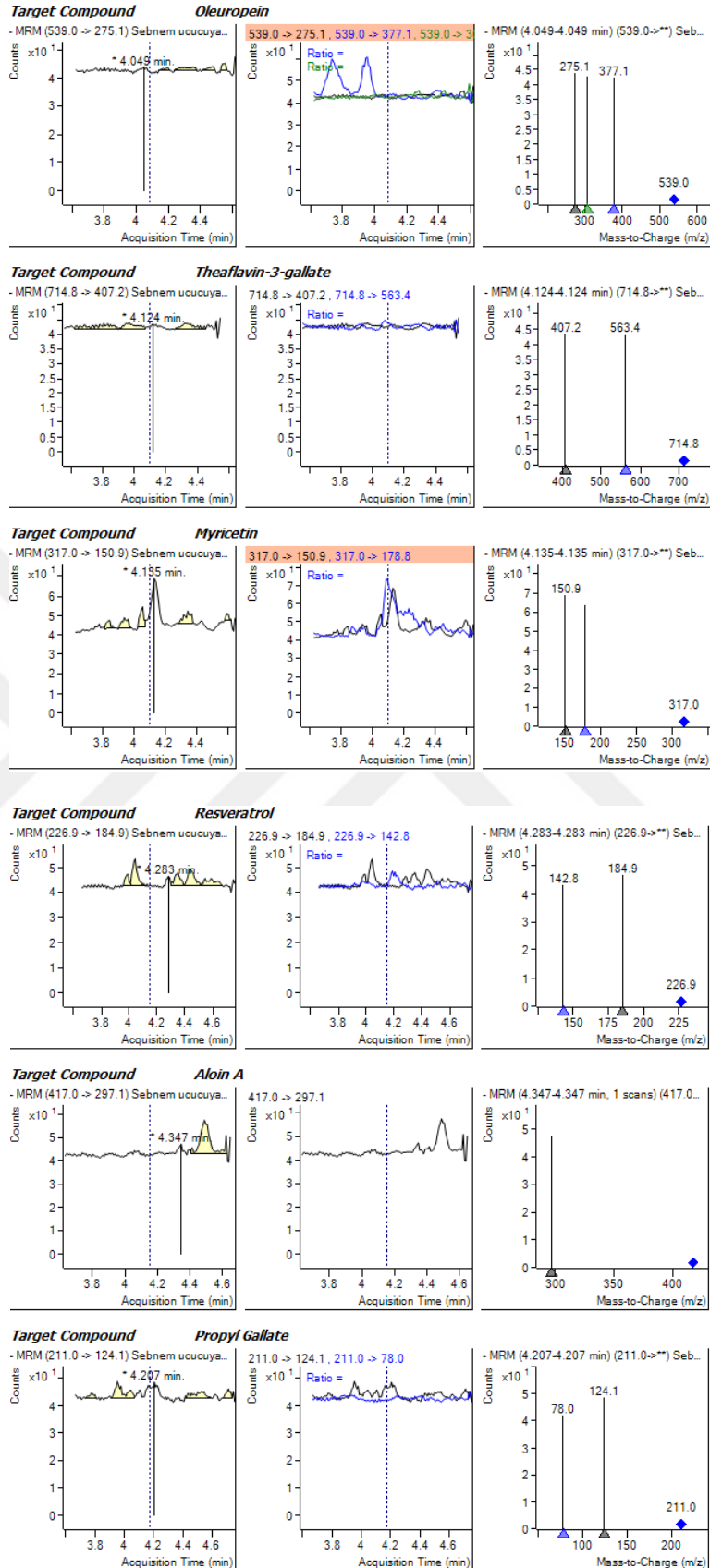


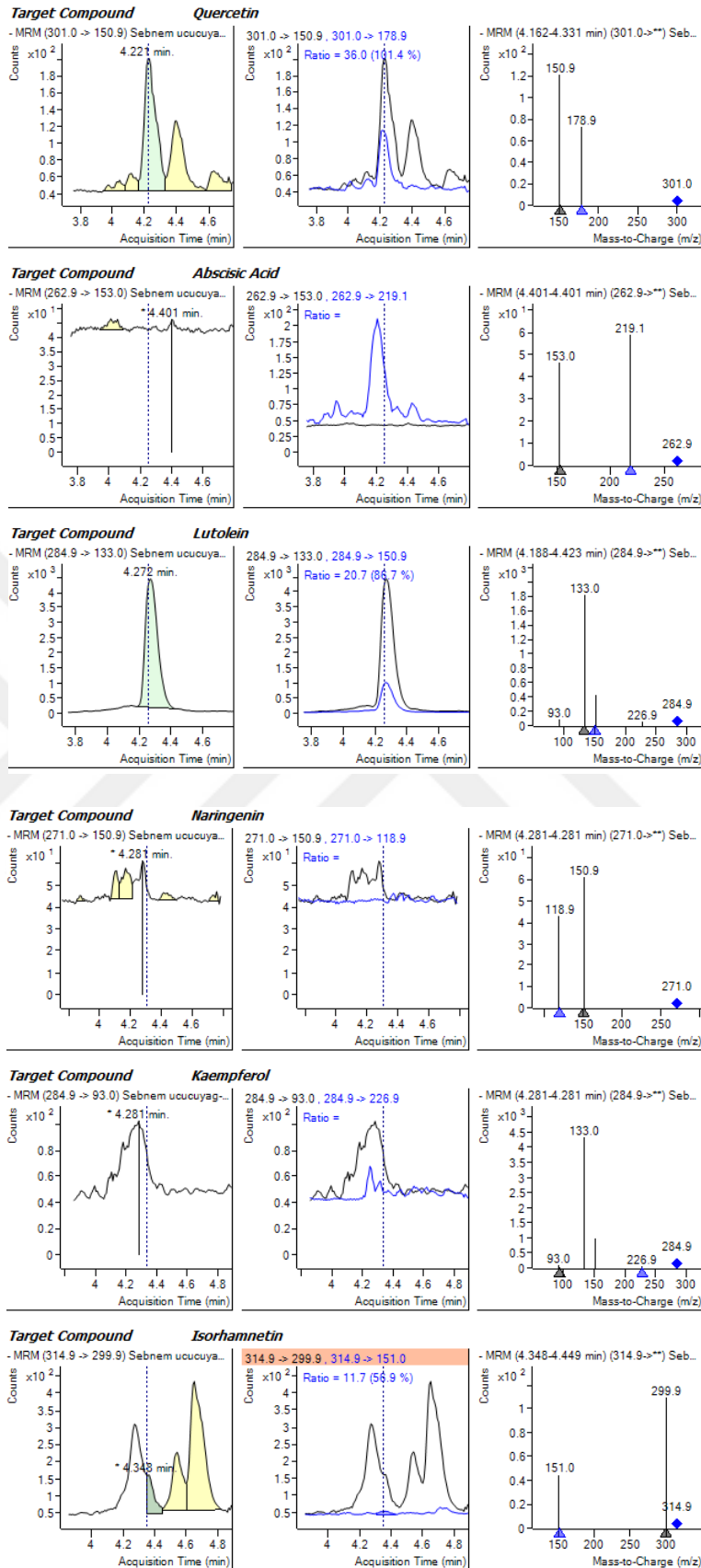
Target Compound *Ethyl Gallate*

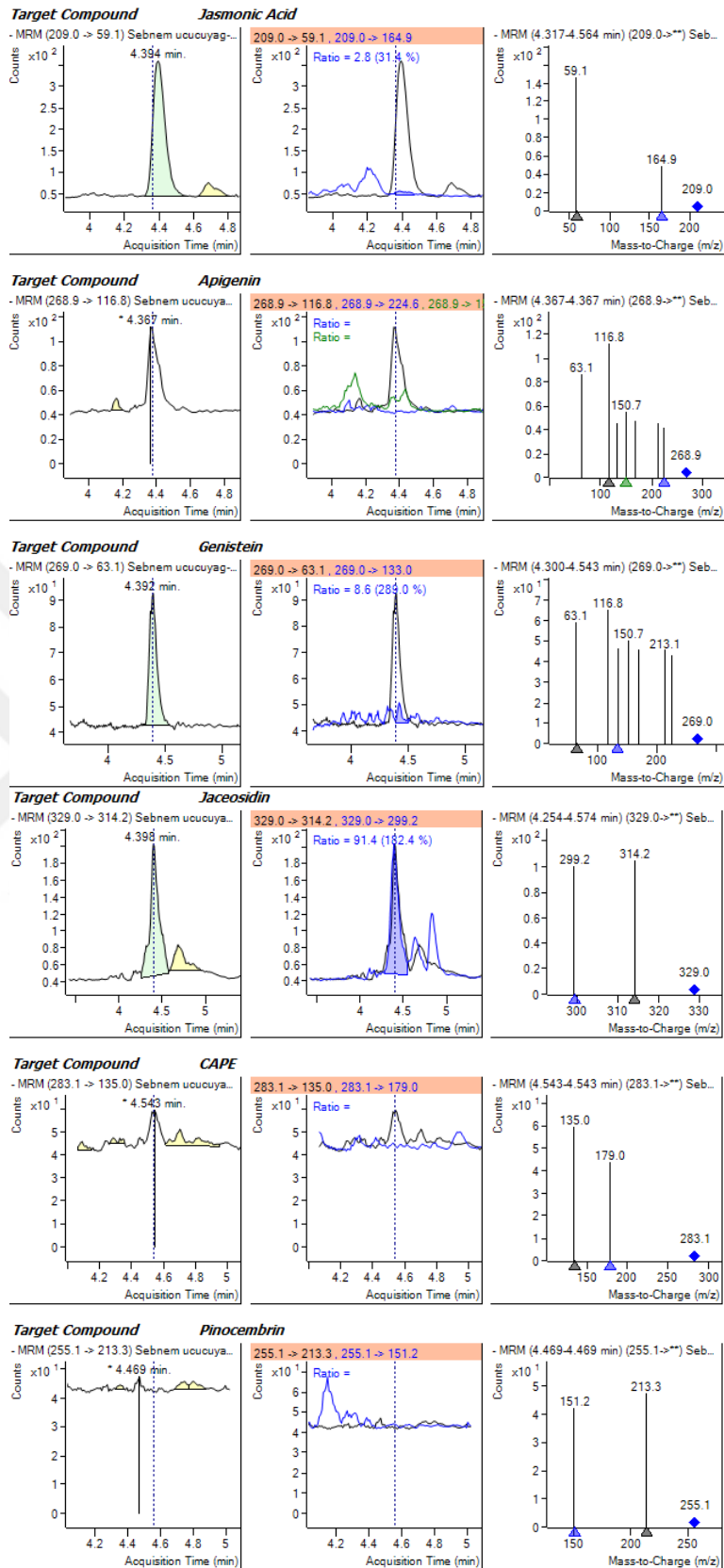


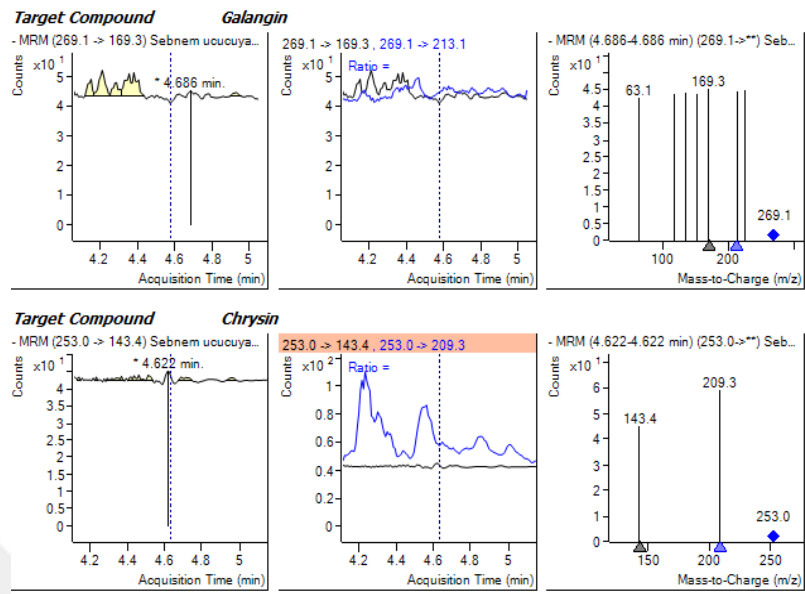
Target Compound *Phlorizin*



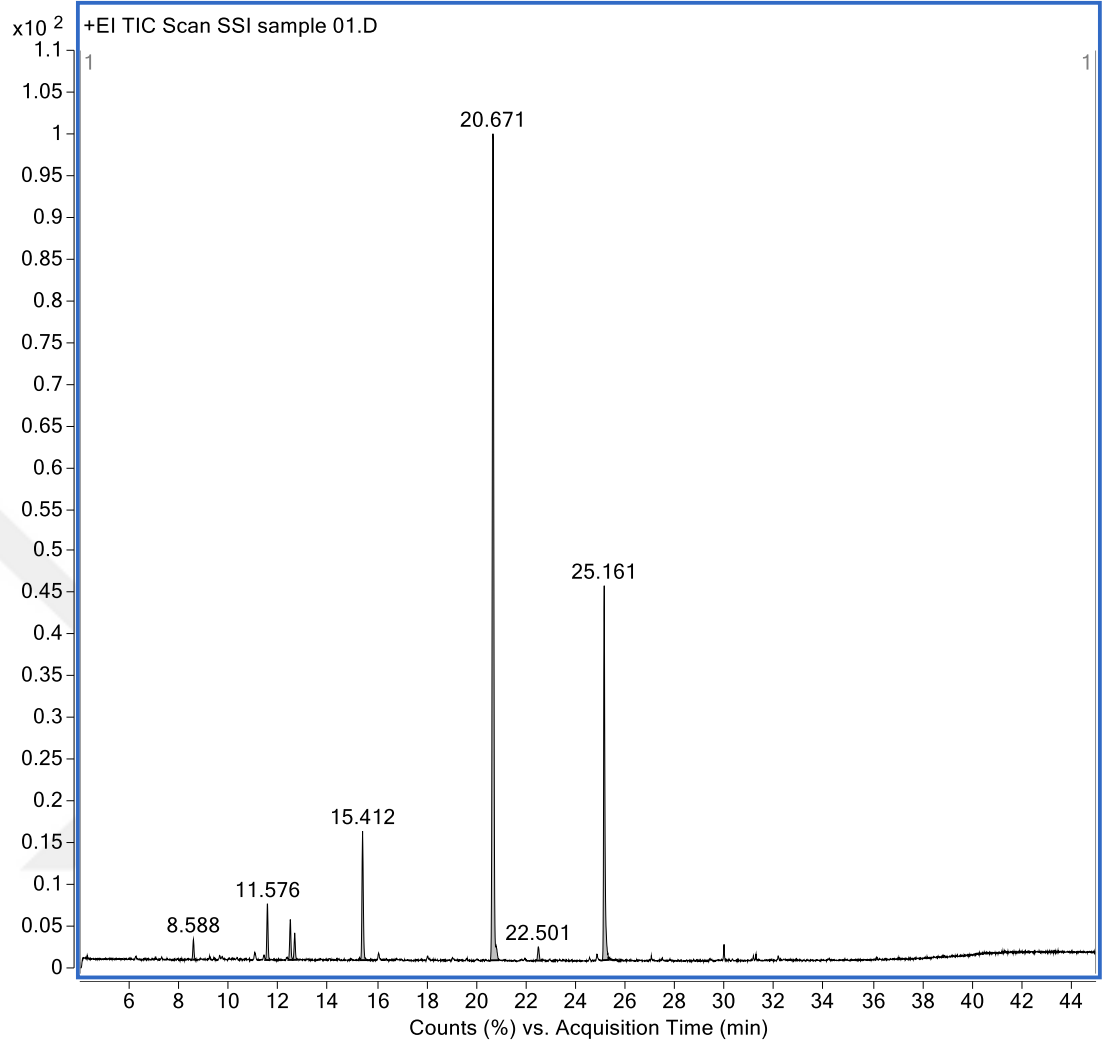








Ek 3. Uçucu yağın uçucu madde bileşenlerine ait GC-MS kromatogramı



ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta öğrenimimi Cumhuriyet İlkokulu'nda, lise öğrenimimi ise Uzunköprü Lisesi'nde tamamladım. Üniversite eğitimime Trakya Üniversitesi Kimya Bölümü'nde devam ederek 2013 yılında mezun oldum. 2014 yılında Çanakkale 18 Mart Üniversitesi'nde pedagojik formasyon eğitimi aldım.

2015 yılında Kırklareli'nin Vize ilçesine kimya öğretmeni olarak atandım ve aynı yıl evlendim. 2016 yılında Keşan Lisesi'ne atandım ve aynı yıl Eylül ayında kızım Duru dünyaya geldi. 2017 yılında Mimar Müslihiddin Lisesi'nde kimya öğretmeni olarak, 2018 yılında Uzunköprü Lisesi'nde müdür yardımcısı olarak görev yaptım. Aynı yılın Aralık ayında ikiz çocuklarım Defne ve Doruk dünyaya geldi.

2019 yılında Uzunköprü Hüseyin Çorum Sağlık Meslek Lisesi'nde müdür yardımcılığı görevine başladım. 2021 yılından itibaren Uzunköprü Kemal Unakıtan Anadolu İmam Hatip Lisesi'nde kimya öğretmeni olarak çalışıyorum. Biyokimya alanında yüksek lisans eğitimime 2021 yılında başladım.