

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***Linum mucronatum* subsp. Bertol. armenum (Bordz.) P.H.Davis BİTKİSİNİN**
FENOLİK İÇERİĞİNİN, ANTİOKSİDAN VE α -GLUKOZİDAZ ENZİM
İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS

Fatma KILIÇ

MAYIS-2022
GÜMÜŞHANE



T.C.

GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Linum mucronatum subsp. Bertol. *armenum* (Bordz.) P.H.Davis BİTKİSİNİN
FENOLİK İÇERİĞİNİN, ANTİOKSİDAN VE α -GLUKOZİDAZ ENZİM
İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF PHENOLIC CONTENT, ANTIOXIDANT AND α -
GLUCOSIDASE ENZYME INHIBITION ACTIVITIES OF *Linum mucronatum*
subsp. Bertol. *armenum* (Bordz.) P.H.Davis

YÜKSEK LİSANS

Fatma KILIÇ

MAYIS-2022
GÜMÜŞHANE



T.C.

GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Linum mucronatum subsp. Bertol *armenum* (Bordz.) P.h.Davis BİTKİSİNİN
FENOLİK İÇERİĞİNİN, ANTİOKSİDAN VE α -GLUKOZİDAZ ENZİM
İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF PHENOLIC CONTENT, ANTIOXIDANT AND α -
GLUCOSIDASE ENZYME INHIBITION ACTIVITIES OF *Linum mucronatum*
subsp. Bertol. *armenum* (Bordz.) P.H.Davis

YÜKSEK LİSANS

Fatma KILIÇ

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep AKAR

MAYIS-2022
GÜMÜŞHANE

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlamış olduğum “*Linum mucronatum subsp. Bertol armenum* (Bordz.) P.H.Davis Bitkisinin Fenolik İçeriğinin, Antioksidan ve α -Glukozidaz Enzim İnhibisyon Aktivitelerinin Araştırılması” isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmaları kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi’nin lisanslı kullanıcısı olduğu intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

18/05/2022

.....
Fatma KILIÇ

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, deneysel çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımlarını esirgemeyen Sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Zeynep AKAR'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmamda kullandığım bitkinin teşhis ve temininde yardımcı olan Doç. Dr. Mutlu GÜLTEPE ve Dr. Öğr. Üyesi Bülent AKAR'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak tüm tez çalışmam süresince beni daima destekleyen eşim Zafer KILIÇ'a tüm eğitim hayatım boyunca ellerini hep omuzlarımda hissettiğim babam Nuri KOKOĞLU ile bana hep inanan ve yanımda olan annem Emine KOKOĞLU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmamı ileride örnek olması adına oğlum Asrın Ege KILIÇ'a ithaf ediyorum.

Bu çalışma Gümüşhane Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi (GÜBAP) tarafından desteklenmiştir. Proje no: 21.E0102.07.02

Fatma KILIÇ
GÜMÜŞHANE - 2022

ÖZET

Bitkiler özellikle fenoller, flavonoidler ve karotenoidler gibi bileşenleri içermelerinden dolayı, yüksek antioksidan aktivite gösterme potansiyeline sahiptirler. İnsanlarda oksidatif stres kaynaklı hastalıkların engellenmesinde ve tedavisinde, antioksidan savunma mekanizmaları önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada, Gümüşhane ilinde yayılış gösteren *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin yaprak ve çiçek kısımları farklı polariteye sahip beş çözücü kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Bu ekstraktların antioksidan aktiviteleri, altı farklı antioksidan aktivite tayin yöntemi (DPPH Radikal Temizleme, Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç (FRAP), Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Aktivite (CUPRAC), ABTS Radikal Temizleme, Toplam Fenolik İçerik ve Toplam Flavonoid İçerik) ile belirlenmiştir. DPPH, FRAP ve CUPRAC testlerinde en yüksek antioksidan aktiviteyi bitkinin yaprak kısmının etanol ekstraktı gösterirken, çiçek kısmında ise en yüksek aktiviteyi metanol ekstraktı göstermiştir. ABTS testinde ise hem çiçek ($SC_{50}=0.287$ mg/ml) hem de yaprakta ($SC_{50}=0.163$ mg/ml) en yüksek aktivite aseton ekstraktında ölçülmüştür. Bütün testlerde en düşük aktiviteyi hekzan ekstraktı göstermiştir. Ek olarak, LC-MS/MS analizi ile bitkide tespit edilen fenolik bileşikler protocatekuik asit, kafeik asit, vanilin, p-kumarik asit, salisilik asit, p-OH benzoik asit, rutin, kuersetin ve kaempferoldür. Bitkinin yaprak ve çiçek kısımları α -glukozidaz enzim inhibisyon etkisi göstermiştir. Bitkinin yaprak kısmının ($IC_{50}=4.533$ mg/ml) çiçekten ($IC_{50}=6.096$ mg/ml) daha yüksek enzim inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Gümüşhane'de doğal yayılışı olan bu alttürün biyolojik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar bitkinin biyolojik aktivitesi üzerine yapılacak çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, α -glukozidaz, LC-MS/MS, *Linum mucronatum* subsp. *armenum*

SUMMARY

Plants have compounds such as phenols, flavonoids and carotenoids that potentially show high antioxidant activity. Antioxidant defense mechanisms in humans have an important place in the prevention and treatment of oxidative stress-induced diseases. In the study, the leaf and flower parts of *Linum mucronatum* subsp. *armenum* were extracted using five solvents of different polarity. The antioxidant activities of these extracts were measured using six antioxidant activity determination methods (DPPH radical scavenging, Iron (III) Reducing/Antioxidant Power (FRAP), Copper (II) Reducing Antioxidant Activity (CUPRAC), ABTS radical scavenging, Total Phenolic Content and Total Flavonoid Content). While, ethanol extract of leaf part of the plant for the DPPH, FRAP and CUPRAC tests showed the highest antioxidant activity, the methanol extract showed the highest activity for the flower part. The highest activity values for ABTS test was measured in acetone extract in both flower ($SC_{50}=0.287$ mg/ml) and leaf ($SC_{50}=0.163$ mg/ml). Lowest activity values for all tests were determined in hexane extracts. Phenolic compounds of the plant were analyzed using LC-MS/MS. These phenolics are protocatechuic acid, caffeic acid, vanillin, p-coumaric acid, salicylic acid, p-OH benzoic acid, rutin, quercetin and kaempferol. The leaf and flower parts showed α -glucosidase enzyme inhibition effect. It was determined that the leaf part of the plant ($IC_{50}=4.533$ mg/ml) showed higher enzyme inhibition than the flower ($IC_{50}=6.096$ mg/ml). As a result, it was determined that the subspecies, which has a natural distribution in Gümüşhane, showed biological activity. The results obtained will contribute to the studies on the biological activity of the plant.

Keywords: Antioxidant activity, α -glucosidase, LC-MS/MS, *Linum mucronatum* subsp. *armenum*

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	III
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Serbest Radikaller	2
1.2.1. Serbest Radikal Kaynakları.....	2
1.2.1.1. Oksijen.....	2
1.2.1.2. Aktive Nötrofiller	2
1.2.1.3. Nitrik Oksit.....	3
1.2.1.4. Mitokondriyal Elektron Transport Sistemi.....	3
1.2.1.5. Endoplazmik retikulum	3
1.2.1.6. Peroksizomlar	3
1.2.1.7. Plazma membranları.....	3
1.3. Antioksidanlar	3
1.3.1. Hücre İçi Antioksidanlar	4
1.3.2. Membranda Bulunan Antioksidanlar	4
1.3.3. Hücre Dışı Antioksidanlar.....	4
1.4. Sekonder Metabolitler	5
1.4.1. Terpenler	5
1.4.2. Alkaloidler.....	6
1.5. Fenolik Bileşikler	7
1.5.1. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	7
1.5.1.1. Fenolik Asitler	8
1.5.1.2. Flavonlar ve Flavonoller.....	9
1.5.1.3. Kumarinler.....	9

1.5.1.4. İzoflavonoidler	9
1.5.1.5. Antosiyaninler ve Antosiyanidinler.....	10
1.5.1.6. Lignin ve Lignanlar	10
1.5.1.7. Tanenler	11
1.6. Enzimler	11
1.6.1. α -Glukozidaz Enzimi	12
1.7. <i>Linum mucronatum</i> subsp. <i>armenum</i>	13
2. MATERYAL ve METOT	15
2.1. Kullanılan Cihazlar.....	15
2.2. Kullanılan Kimyasallar.....	15
2.3. Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışları.....	16
2.4. <i>Linum mucronatum</i> subsp. <i>armenum</i> Ekstraktlarının Hazırlanışı	16
2.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	17
2.5.1. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini	17
2.5.2. Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini	17
2.5.3. Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Aktivite (CUPRAC) Tayini	18
2.5.4. ABTS. ⁺ Radikal Temizleme Kapasitesi Tayini.....	18
2.5.5. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	18
2.5.6. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini.....	19
2.6. LC-MS/MS Cihazı ile Bitki Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi	19
2.7. In Vitro α -Glukozidaz Enzim İnhibisyonu	20
3. BULGULAR.....	21
3.1. Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	21
3.1.1. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi	21
3.1.2. Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Analizi	22
3.1.3. Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Aktivitesi (CUPRAC) Analizi	24
3.1.4. ABTS. ⁺ Radikal Temizleme Kapasitesi Analizi	25
3.1.5. Toplam Fenolik Madde İçeriği Analizi	26
3.1.6. Toplam Flavonoid Madde İçeriği Analizi	27
3.2. LC-MS/MS Analizi	29
3.3. α -Glukozidaz İnhibisyon Etkisi.....	30
4. TARTIŞMA.....	31
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKÇA.....	43
ÖZGEÇMİŞ	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Terpenlerin sınıflandırılması.....	5
Tablo 2. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılmasıdır.....	7
Tablo 3. Fenolik asitlerden a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevlerinin kimyasal yapılarıdır.	8
Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları.....	15
Tablo 5. Kimyasallar ve markaları.....	15
Tablo 6. Kullanılan bazı reaktifler ve hazırlanışları.....	16
Tablo 7. <i>Linum mucronatum</i> subsp. <i>armenum</i> bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının içerdiği fenolik bileşikler ve miktarları.....	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Flavon ve flavonollerin kimyasal yapıları (X=H → Flavon, X=OH→Flavonol)	9
Şekil 2. Kumarinlerin kimyasal yapısı	9
Şekil 3. İzoflavonoitlerin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 4. A) Antosiyaninin ve B) Antosiyanidinlerin kimyasal yapıları	10
Şekil 5. Lignin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 6. Tanenlerin kimyasal yapısı	11
Şekil 7. α - Glukozidaz enzimlerinin substratı olan nişasta ile etkileşimi.	12
Şekil 8. <i>Linum mucronatum</i> subsp. <i>armenum</i> bitkisi.....	14
Şekil 9. <i>Linum mucronatum</i> subsp. <i>armenum</i> 'un Türkiye'deki yayılışı.....	14
Şekil 10.DPPH antioksidan aktivite testi için farklı konsantrasyonlarda çalışılan troloks standart kalibrasyon grafiği	21
Şekil 11.DPPH radikal temizleme aktivitesinde çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının SC ₅₀ değerleri	22
Şekil 12.FRAP antioksidan aktivite testi için farklı konsantrasyonlarda çalışılan troloks standart kalibrasyon grafiği	23
Şekil 13.FRAP antioksidan aktivite testinde çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının μ M TEAC değerleri	23
Şekil 14.CUPRAC antioksidan aktivite testi için farklı konsantrasyonlarda çalışılan troloks standart kalibrasyon grafiği	24
Şekil 15.CUPRAC antioksidan aktivite testinde çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekkstraktlarının μ M TEAC değerleri	24
Şekil 16.ABTS antioksidan aktivite testi için farklı konsantrasyonlarda çalışılan troloks standart kalibrasyon grafiği	25
Şekil 17.ABTS radikal temizleme aktivitesinde çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının SC ₅₀ değerleri	25
Şekil 18.Toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde farklı konsantrasyonlarda çalışılan gallik asit standart kalibrasyon grafiği.....	26
Şekil 19. <i>Linum</i> bitkisinin çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriklerinin GAE (μ g/ml) cinsinden değerleri	27
Şekil 20.Toplam flavonoid madde içeriğinin belirlenmesinde farklı konsantrasyonlarda çalışılan kuarsetin standart kalibrasyon grafiği	28

Şekil 21. <i>Linum mucronatum</i> subsp. <i>armenum</i> bitkisinin çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının toplam flavonoid madde içeriklerinin KAE (mg/ml) cinsinden değerleri.....	28
Şekil 22. Akarboz ve örneklerin α -glukozidaz enzim inhibisyonunun IC ₅₀ değerleri	30



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
μ	: Mikro
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
ABTS ⁺	: [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic asit)]
Al(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	: Alüminyum Nitrat (9 sulu)
CH ₃ COONH ₄	: Amonyum Asetat
CuCl ₂	: Bakır (II) Klorür
CUPRAC	: Bakır (II) İndirgeme/ Antioksidan Güç
dk	: Dakika
DPPH•	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
FeCl ₃	: Demir (III) Klorür
FRAP	: Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Güç
GAE	: Gallik asit antioksidan eşdeğeri
gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
IC ₅₀	: Enzim aktivitesini yarıya düşüren numune konsantrasyonu
K ₂ S ₂ O ₈	: Potasyum Persülfat
KAE	: Kuarsetin antioksidan eşdeğeri
L	: Litre
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi
M	: Molar
mg	: Miligram
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Na ₂ CO ₃	: Sodyum Karbonat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
Nm	: Nanomol
°C	: Santigrat derece
pH	: Hidrojen iyonu H ⁺ ile hidroksit iyonu OH ⁻ derişimlerinin oranı
ppm	: Milyonda bir (Parts per million)

R ²	: Korelasyon katsayısı
SC ₅₀	: Radikali %50 temizleyen numune konsantrasyonu
TEAC	: Troloks Antioksidan Kapasite (Eşdeğeri)
TFC	: Toplam Flavonid Madde İçeriği
TPC	: Toplam Fenolik Madde İçeriği
TPTZ	: 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine
UV	: Ultraviyole
UV-Vis	: Ultraviyole- görünür bölge spektroskopisi



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İnsan vücudunda serbest radikallerin etkisiyle oluşabilecek oksidatif stresi engelleyebilmenin en iyi yolu antioksidanlardır. Ortaklanmamış elektron içeren bu radikaller oldukça kararsızdırlar. Bunlar başka moleküllerden elektron alarak kararlı hale gelebilmek için o molekülü okside ederler ve sonrasında başka bir serbest radikalın oluşumuna neden olurlar (Gökpınar vd., 2006). Bu şekilde gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda serbest radikallerin artışı; bağışıklığın düşmesine, erken yaşlanmaya, diyabete, kansere, kardiyovasküler ve alzheimer gibi hastalıklara sebep olmaktadır. İnsan vücudu, doğal olarak yerinde üretilen veya dışarıdan gıdalar ve takviyeler yoluyla sağlanan antioksidanları oksidatif strese karşı koymak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir (Pham-Huy vd., 2008).

Günümüzde reaktif oksijenlerin zararlarından korunmak için gıda maddelerine antioksidan özellik taşıyan sentetik bileşikler katılmaktadır. Fakat son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, bu sentetik bileşiklerin de zararlı etkilerinin olduğunu, ayrıca yüksek oranlarda alındığında çeşitli hastalıklara zemin hazırladığını göstermektedir. BHT (Bütil hidroksi toluen) ve BHA (Beta hidroksi asitler) gibi bazı sentetik antioksidanlar da vardır ve bunlar da oksidasyonu engeller. Bu sentetik antioksidanların artık insanlar için tehlikeli olduğuna yönelik bulgular rapor edildiğinden dolayı, son yıllarda toksik olmayan antioksidan bileşiklerin tespitine ve özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaşmıştır (Sindhi vd., 2013). Araştırmacılar bu sebeple özellikle antioksidan aktiviteye sahip olan bitkisel ve doğal kaynak arayışına girmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda Gümüşhane ilinde yayılış gösteren ve literatür de biyokimyasal özellikleri bakımından yeterli çalışma bulunmayan *Linum mucronatum* subsp. Bertol. *armenum* (Bordz.) P.H.Davis alt türünün çiçek ve yaprak kısımları incelenmiştir. Çalışmada farklı etki mekanizmasına sahip antioksidan aktivite testleri (DPPH) radikal temizleme aktivite, demir (III) indirgeme/ antioksidan güç (FRAP), Bakır (II) indirgeyici antioksidan aktivite (CUPRAC), ABTS.⁺ radikal temizleme kapasite, toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı testleri) uygulanarak bu alt türün farklı çözücü ekstraktlarındaki antioksidan potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Buna ek olarak hem yaprak hem de çiçek kısımlarının

fenolik madde içeriği ve α -glukozidaz enzim inhibisyonu tespit edilmesi de çalışmanın amaçları arasında yer almaktadır.

1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngede eşleşmemiş bir elektrona sahip moleküllerdir. Genellikle kararsızdırlar ve çok reaktiftirler. Serbest radikaller, yaşamın kökeninde ve biyolojik evrim sürecinde, organizmalar üzerinde yararlı etkiler göstermesi açısından önemli bir rol oynadığı muhtemeldir (Phaniendra vd., 2015) ve bu durum antioksidanların, aerobik yaşam için esas olması ile ilişkilendirilir. Serbest radikallerin aşırı yüklenmesi kademeli olarak yok edilemediğinde, vücutta birikimleri oksidatif stresi oluşturur. Bu süreç, çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkların gelişimine katkı sağlar (Halliwell, 2011).

1.2.1. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikal kaynakları; oksijen, aktive nötrofiller, nitrik oksit, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizomlar ve plazma membranları olarak sıralayabiliriz.

1.2.1.1. Oksijen

Oksijen, memelilerdeki aerobik metabolizmanın başlıca serbest radikal kaynağıdır. Oksijenin suya indirgenmesi sırasında elektron aktarımları sonucunda meydana gelen reaktif partikülleridir. Oluşan bu reaktiflerden süperoksit radikali, kuvvetli bir indirgeyici ajandır. Hızlı bir şekilde dismutasyona uğrayarak H_2O_2 (hidrojen peroksit) ve $O_2^{\cdot -}$ 'yi oluşturur. Protonlanmış şekli olan hidroperoksil radikali ($HO_2^{\cdot}$) daha kuvvetli bir oksidandır. H_2O_2 ise zayıf bir oksidoredüktandır ve katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) tarafından parçalanır (Halliwell, 2006). OH radikali ise lipid peroksidasyonunu uyaran temel radikal olup süperoksit radikalinden veya Fe iyonları etkisi ile H_2O_2 'den oluşur (Karabulut ve Gülay, 2016).

1.2.1.2. Aktive Nötrofiller

Aktive nötrofillerden üretilen hipoklorik asit (HOCl) güçlü bir oksidandır. HEM (açık hali yazılmalı) içeren bir enzim olan miyeloperoksidaz (MPO), H_2O_2 ve Cl iyonlarından hipoklorik asit oluşumunu katalize eder. Süperoksit radikali veya demir tuzları ile HOCl reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur (Rees vd., 2009).

1.2.1.3. Nitrik Oksit

Nitrik oksit ve nitrojen dioksit tek sayılı elektron taşırlar ve bundan dolayı da serbest radikaldirler. Nitrik oksit zayıf bir indirgeyici ajan olmasına rağmen endojen serbest radikallerle bir araya gelerek peroksinitrit radikalini oluşturur. Bu güçlü bir oksidan olup hidroksil radikalini kolayca oluşturabilir (Phaniendra, 2015).

1.2.1.4. Mitokondriyal Elektron Transport Sistemi

Mitokondrinin iç membranında oksijenin suya indirgenmesi sırasında elektron transport zincirinin bir kısmının otooksidasyonu ile süperoksit radikali oluşmaktadır (Zorov vd., 2014).

1.2.1.5. Endoplazmik retikulum

Endoplazmik retikulumlar sitokrom P 450 ve sitokrom b5 sistemlerini içermektedir. Doymamış yağ asitlerinin ve zenobiyotiklerin oksidasyonunda rol oynarlar. Serbest radikaller bu reaksiyonların oluşumu sırasında meydana gelir (Lu ve Cederbaum, 2008).

1.2.1.6. Peroksizomlar

Peroksizomlar yüksek oranda oksidaz bulundurdıklarından dolayı güçlü bir hücrel H_2O_2 kaynağıdır. Bu peroksizomal enzimler arasında; ürat oksidaz, açıl-KoA oksidaz ve D-aminoasit oksidaz, bulunmaktadır (Walker vd., 2018).

1.2.1.7. Plazma membranları

Plazma membran enzimleri olan siklooksijenaz ve lipooksijenaz serbest radikal üretimine yol açar. Bu plazma membran enzimlerinin katalize ettiği tepkimeler sonucunda ise tromboksanlar, prostaglandinler, lokötrienler ve anafilaksin maddesi sentezlenir (Ricciotti ve FitzGerald, 2011).

1.3. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu durdurmak ve bu sırada meydana gelen hasarı önlemek için vücutta görev yapan savunma mekanizmalarına ‘antioksidan savunma sistemleri’ veya ‘antioksidanlar’ adı verilir. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize eden ve hasarlarını onarmaya yardımcı olan yapılardır (Lobo vd., 2010).

Antioksidanlar, doğal antioksidanlar (enzimler ve enzim olmayanlar) ve yapay antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Doğal antioksidanlardan enzim olanlara

süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S transferaz ve sitokrom oksidaz örnekleri, enzimatik olmayanlara (endojen ve eksojen) glutatyon, ferritin, E vitamini (α -tokoferol) ve A vitamini (β -karoten) gibi örnekler verilebilir (Kurutas, 2016).

Sınıflandırılan bu antioksidanlar ise moleküler yerleşim bölgelerine göre hücre içi antioksidanlar, hücre dışı antioksidanlar ve membranda bulunan antioksidanlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar.

1.3.1. Hücre İçi Antioksidanlar

Hücre içinde yerleşmiş antioksidanlardan, süperoksit dismutaz (SOD) antioksidanlar süperoksit radikalini uzaklaştırmakla görevlidirler. Katalaz (CAT), yüksek konsantrasyonda meydana gelen hidrojen peroksidin detoksifikasyonunu sağlar (Buettner, 2011). Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), düşük konsantrasyonda oluşan hidrojen peroksidin detoksifikasyonunu sağlar. Sitokrom oksidaz, oksijenin suya indirgenmesi sırasında radikal oluşumunu önler. Glutatyon ise en önemli hücre içi antioksidan olup proteinlerin aktif şekilde kalmasını sağlar (Lubos vd., 2011).

1.3.2. Membranda Bulunan Antioksidanlar

Membranda bulunan antioksidanlardan E vitamini, en güçlü antioksidan vitamindir. Yağda erir ve radikal reaksiyonlar sırasında zincirleme reaksiyonları bozarak etkisini gösterir. A vitamini (β -karoten) ise radikal toplayıcı etki göstermektedir (Traber ve Atkinson, 2007). Membranın yapısal organizasyonu; kolesterol ve fosfolipid oranı radikal hasarında önemlidir. Doymamışlığın artması radikal etkisini arttırırken, fosfolipid artması da savunmayı güçlendirir (Ayala vd., 2014).

1.3.3. Hücre Dışı Antioksidanlar

Hücre dışı antioksidanlardan transferrin, metal katalizli lipid peroksidasyonuna neden olan demir iyonlarını bağlayarak serbest demir oluşumunu önlemektedir. Laktoferrin, süt proteini olup demiri bağlamada etkilidir. Haptoglobulin ve hemopeksin, serbest hemoglobin oluşumunu hemoglobini bağlayarak sınırlı tutarlar. Seruloplazmin, bakır iyonlarını bağlamak amacıyla metal katalizli reaksiyonları sınırlarlar. Ürik asit, radikal tutucu özelliği bulunmaktadır. Askorbik asit ise suda eriyen ve glutatyonla beraber E vitaminin antioksidan etkisinde rol oynayan antioksidan vitamindir. Ayrıca SOD ve GSHPx'in, plazmada çok sınırlı antioksidan etkileri bulunmaktadır (Gwozdinski vd., 2021).

1.4. Sekonder Metabolitler

Bitkiler primer bileşikler olan protein, karbohidrat ve lipitlere ek olarak büyüme ve gelişmede rol oynayan önemli sayıda organik bileşik üretirler. Bu maddeler sekonder metabolit (ikincil metabolit) olarak adlandırılır (Yang vd., 2018).

Sekonder ürünler genelde tek bir bitki türünde veya taksonomik olarak birbirleriyle ilişkili türlerde bulunurlar. Fakat primer metabolitler bitkiler aleminin tümünde bulunmaktadır. Sekonder metabolitler, önceden bitkilerin oluşturduğu işlevi olmayan maddeler olarak bilinirdi. Ancak daha sonra bunların savunma, ortama uyum sağlama ve nesillerini devam ettirmek için organizmalar tarafından geliştirilmiş mekanizmaların ürünleri olduğu anlaşılmıştır. İkincil metabolitlerin antibakteriyel ve antifungal ajanlar olarak önemli olduğu kanıtlanmıştır. Endüstriyel alanlarda, antikanser ilaçları, kolesterol düşürücüler, antibiyotik ile çok sayıda biyolojik hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde tıp alanında çok yönlü uygulamaları olmakla birlikte insektisit ve herbisit olarak ta kullanımları mevcuttur (Erb ve Kliebenstein, 2020).

Sekonder metabolitler, doğada oluşturulma biçiminden yani biyosentez şekillerine göre terpenler, alkaloidler (Azotlu bileşikler) ve fenolik bileşikler olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır.

1.4.1. Terpenler

Terpenler sekonder metabolitlerin en büyük sınıfıdır. Terpenler, son derece güçlü kokulu maddeler olup uçucu yağların temel bileşenleridirler. Terpen ismi, grubun ilk üyelerinden terebentinden gelmektedir. Terpenler hidrokarbonlar olarak bulunabilir veya oksijen içeren bileşiklere de sahip olabilir. Terpenlerin kimyasal modifikasyonundan sonra ortaya çıkan bileşiklere ‘terpenoidler’ denir (Tiring vd., 2020). Terpenler, C_5H_8 moleküler formülüne sahip izopren birimlerinden biyosentetik olarak türetilir. Tüm terpenlerin temel formülü $(C_5H_8)_n$ şeklindedir (Paduch vd., 2007). Terpenler içerdikleri beş karbonlu birim sayısına göre sınıflandırılmaktadırlar. Terpenlerin karbon sayılarına göre adlandırılmaları ve özellikleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Terpenlerin sınıflandırılması

Hemiterpenler(C_5)	Tek bir izopren birimi içerir. C_3 bitkilerinin yaprak plastitlerinde bulunur.
Monoterpenler(C_{10})	İki izopren birimden oluşur. Bazı türler de uçucu yağ olarak, bazı türlerde ise reçine olarak izole edilmiştir.
Seskitерpenler(C_{15})	Üç izopren biriminden oluşur. Monoterpenler gibi uçucu yağlarda bulunur.

Tablo 1. (Devamı)

Diterpenler(C20)	Dört izopren biriminden oluşur. En önemlileri steviol ve giberellindir.
Triterpenler(C30)	İki C ₁₅ zincirinin baş-baş bağlanmasıyla sentezlenmektedir. Saponinler, Steroller, Steroid hormonlar örnek verilebilir.
Tetraterpenler (C40=Karotenler)	Karotenoid pigmenti olan tek gruptur. Çiçek ve meyvelere renk verirler. Ayrıca fotosentezin gerçekleşmesine yardımcıdırlar.
Politerpenler (C>40)	Yüksek molekül ağırlıklı bileşikler olup en iyi bilinen üyesi kauçuktur.

1.4.2. Alkaloidler

Alkaloidler, insanlar için toksik olması ve tıbbi özellikleri ile dikkat çekmektedir. Damarlı bitkilerin %20-30'unda bulunan organik azot ihtiva eden bileşiklerdir. Alkaloidlerin kullanım alanları çok geniştir. Çok eski yıllardan beri hastalıkların tedavi edilmesinde kullanılmaktadır. Farklı alkaloid grupları antienflamatuvar, antispazmodik, antibakteriyel, analjeziklerdir. Bununla birlikte kanser tedavisinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca tıp alanı dışında zirai mücadelede insektisit olarak ta kullanımları mevcuttur (Souto vd., 2011).

Alkaloidler, aktif azot içeren adından da anlaşılacağı üzere alkalik yani bazik özellikte bileşikler olarak tanımlanmıştır. Alkaloidler pozitif yüklüdür ve genellikle suda çözünmezler. Hücre içerisinde vakuollerde bulunurlar. Ayrıca genç hücrelerde vakuoller oluşmadığından alkaloidlere rastlanmaz. Alkaloidler bitkilerde köklerde, yapraklarda, kabukta ve meyvelerde bulunurlar. Genellikle sitrik, oksalik, malik, asetik ve tartarik asit gibi çeşitli bitki asitlerinin tuzları şeklinde yer alırlar. Gerek zehirli yapıları gerekse acı tatlarıyla bitkileri koruma özelliğine sahiptirler (Halfon 2005).

Alkaloidler şekil ve orijinlerine göre, gerçek alkaloidler, protoalkaloidler ve yalancı alkaloidler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır (Aniszewski, 2007). Gerçek alkaloidler: Aminoasitten türetilen, heterosiklik azot içeren yüksek biyolojik aktiviteye sahip moleküllerdir. Katı, beyaz bir renge sahiptirler ve tatları acıdır. Örnek dopamin, kokain, morfin verilmektedir.

Protoalkaloidler: Aminoasitten türetilen fakat heterosiklik halkanın bir parçası olmayan halkasal moleküllerdir. Öncül aminoasitleri L-Tirozin ve L-Triptofan'dır. Örnek olarak adrenalin, meskalin verilmektedir.

Yalancı alkaloidler: Aminoasitten türetilmeyen ve yapısında temel karbon iskeleti bulunduran bileşiklerdir. Yalancı alkaloidlere örnek kapsaisin, efedrin, kafein, teobromin verilmektedir (Aniszewski, 2007).

1.5. Fenolik Bileşikler

Aromatik bir halka üzerinde bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren fenol grubuna sahip bileşikler Fenolik maddeler olarak adlandırılır (Shahidi ve Yeo, 2016). Yapılarında önemli antioksidan aktivite gösteren bileşikler bulundurulur. Bitki fenolikleri heterojenik gruptur. Yani bazıları sadece organik bileşiklerde çözünürken, bazıları da suda çözünmektedir. İnsanın sağlıklı yaşamında önemli olan esansiyel bileşiklerdir.

Bitkisel polifenoller, oksidatif strese bağlı hasarları önlemede etkin oldukları için insan diyetinde çok önemlidir (Noreen vd., 2017). Bitkiler yoğun stres altındayken korunma faktörüyle fenolik bileşikler üretmektedir. Kimyasal farklılıklarına bağlı olarak çeşitli rollere sahiptirler. Patojenlere karşı savunmada rol oynar. Sebze ve meyvelerin dokusunda bulunup tat ve renk verme özellikleri vardır. Bu da komşu bitkiler arasındaki etkileşimi sağlar (Atak vd., 2017).

Polifenollerin araştırılması, ilaç ve gıda endüstrileri tarafından sağlık alanındaki yararları nedeniyle büyük ilgi çekmiştir (Fang ve Bhandari, 2010). İnsan sağlığında antidiyabetik, antienflamatuar, antialerjik, antimikrobiyal, antiviral ve antipatojenik etki göstermektedir (Manach vd., 2004).

Bitki fenollerini farklı yollarla sentezlenirler. Bunlar şikimik asit ve malonik asit yoludur. Şikimik asit yolu genellikle bitki fenoliklerinin biyosentezinde kullanılırken, malonik asit yolu ise bakteri ve funguslarda fenoliklerinin önemli bir kaynağıdır (Taiz ve Zeiger, 2008).

1.5.1. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Fenolik bileşikler temel olarak basit fenoller ve polifenoller olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Karbon sayılarına göre fenolik bileşiklerin sınıflandırılması Tablo 2’de verilmiştir (Harborne ve Simmonds, 1964).

Tablo 2. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılmasıdır (Harborne ve Simmonds, 1964).

Yapı	Sınıf
C ₆	Basit fenolikler
C ₆ -C ₁	Fenolik asitler
C ₆ -C ₂	Asetofenonlar ve fenilasetik asit
C ₆ -C ₃	Sinamik asitler, sinamil aldehytler, sinamil alkoller Kumarinler, izokumarinler
C ₁₅	Kalkonlar, auronlar, dihidrokolonlar, Flavanlar, Flovonlar, Flavanonlar, Antosiyanidin, Antosiyanin
C ₃₀	Biflavonil
C ₆ -C ₁ -C ₆ , C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonlar, ksanton, stilbenler
C ₆ , C ₁₀ , C ₁₄	Kinon

Tablo 2.(Devamı)

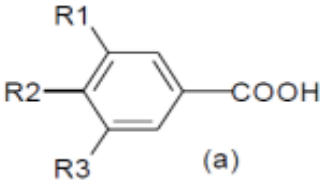
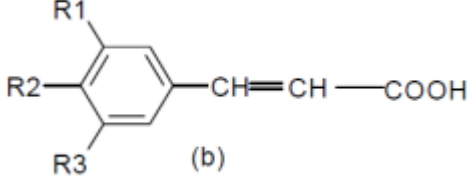
C ₁₈	Betasiyanin
Lignanlar ve neolignanlar	Dimer veya oligomerler
Lignin	Polimerler
Tanenler	Oligomer veya Polimerler
Filobafenler	Polimerler

1.5.1.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler kimyasal olarak hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olmak üzere iki temel karbon iskeleti içerirler ve gıdalarda bol miktarda bulunurlar. Ayrıca temel iskelet yapısının değişmemesine rağmen, aromatik zincirdeki hidroksil grubunun sayı ve konumunun değişmesi farklılıklar oluşturmaktadır (Robbins, 2003). Hidroksisinamik asitler hidroksibenzoik asitlerden daha yaygındır. Örnek olarak p-kumarik asit, kafeik asit ve onların türevleri olan (ferulik asit ve sinapik asit). Hidroksibenzoik asite örnek olarak vanilik asit ve gallik asit verilebilir (Pandey ve Rizvi, 2009).

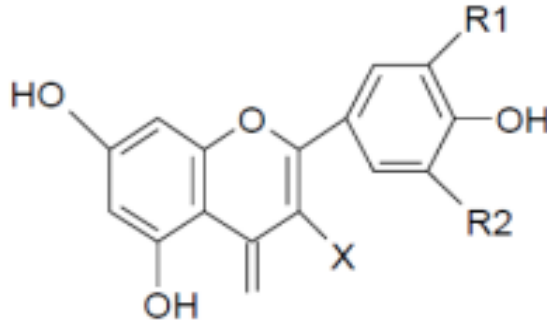
Bitkilerin çürüyen kısımlarından, köklerinden ve yapraklarından çevrelerine birçok primer (birincil) ve sekonder (ikincil) ürün serbest bırakabilirler. Bitkilerden yayılan bu bileşiklerin ortamdaki diğer bitkiler ve canlılar üzerindeki etkilerine "allelopati" denir. Genelde bu terim bitkilerin çevrelerine zararlı etkileri için kullanılsa da bu etkiler bazen yararlı da olabilir. Örneğin ferulik asit ve kafeik asit gibi bileşiklerin toprakta belirli miktarlarda bulunması bu bileşiklerin bitkilerin çimlenmesini ve büyümesini önlediği deneysel olarak gösterilmiştir (Tiring, 2021).

Tablo 3. Fenolik asitlerden a) Benzoik asit türevleri b) Sinnamik asit türevlerinin kimyasal yapılarıdır (Nizamlioğlu ve Nas, 2010).

							
Hidroksibenzoik	R₁	R₂	R₃	Hidroksisinamik	R₁	R₂	R₃
p-hidroksibenzoik	H	OH	H	Sinapik asit	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Siringik asit	CH ₃ O	OH	CH ₃ O	p-kumarik asit	H	OH	H
Vanilik asit	CH ₃ O	OH	H	Ferulik asit	CH ₃	OH	H
Gallik asit	OH	OH	OH	Kafeik asit	H	OH	OH

1.5.1.2. Flavonlar ve Flavonoller

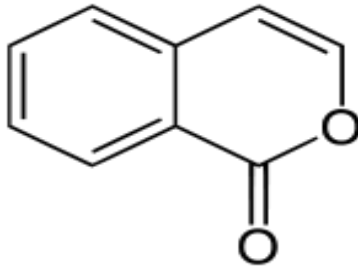
Çiçeklerde bulunan bu iki flavonoid grubu, yeşil bitkilerin yapraklarında da bulunur. Bu flavonoidler, özellikle hücreleri UV radyasyonundan korumaktadırlar (Tiring, 2021).



Şekil 1. Flavon ve flavonollerin kimyasal yapıları (X=H → Flavon, X=OH→Flavonol)

1.5.1.3. Kumarinler

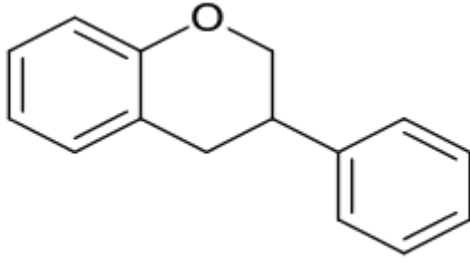
Kumarinler bazı uçucu yağlarda yüksek seviyelerde bulunurlar. Bitkinin tüm kısımlarına dağılmış olmakla birlikte en yüksek oranda meyvelerde olup bunu kök, gövde ve yapraklar izler. Bu bileşikler özellikle fizyolojik ve antitümör aktivitesi ile ilgi görmektedir (Jain ve Joshi, 2012).



Şekil 2. Kumarinlerin kimyasal yapısı

1.5.1.4. İzoflavonoitler

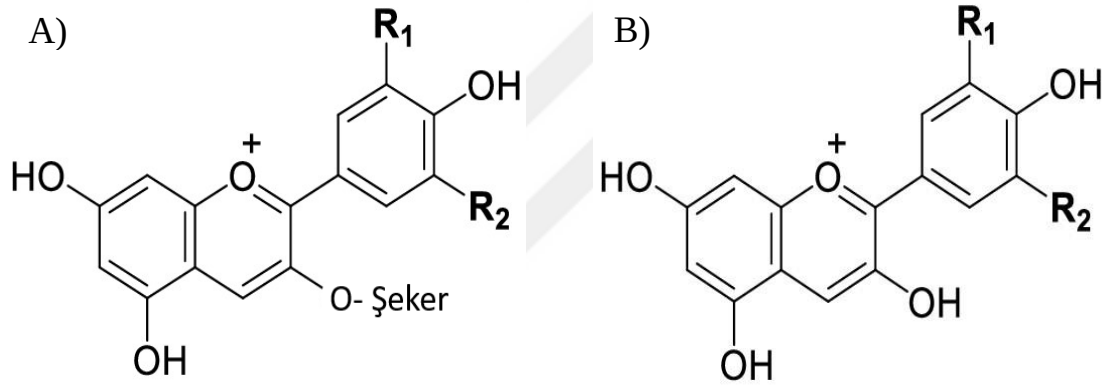
Bir flavonoid grubu olarak antifungal ve antibakteriyal özellikte olup bitki gelişiminde ve savunmasında önemli bir rol oynar. Bu maddeler "fitoaleksinler" olarak da adlandırılmaktadır. Fitoaleksinler fonksiyon olarak hayvanlardaki antikorlara benzemektedir (Boue vd., 2009).



Şekil 3. İzoflavonoitlerin kimyasal yapısı

1.5.1.5. Antosiyaninler ve Antosiyanidinler

Antosiyaninler, çiçek ve meyvelerdeki pigmentli en geniş flavonoit grubudur. Tozlaşma ve tohumları yaymak için böceklerin cezbedilmesinde önemli rol oynar. Şeker içeren glikozitlerdir. Şekersiz antosiyaninlere "antosiyanidin" denir. En yaygın antosiyanidin, cyanidindir (Mattioli vd., 2020).

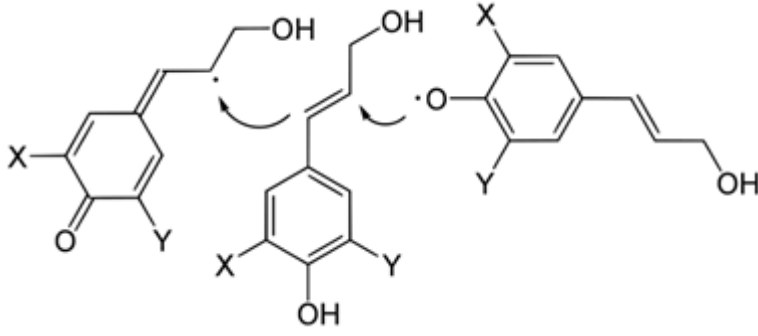


Şekil 4. A) Antosiyaninin ve B) Antosiyanidinlerin kimyasal yapıları

Antosiyanidinlerde renk oluşumu R_1 ve R_2 gruplarına bağlıdır. ($R_1 \rightarrow OH$, $R_2 \rightarrow H$, Antosiyanin: Cyanidin $\rightarrow$ Renk: Portakal-kırmızı)

1.5.1.6. Lignin ve Lignanlar

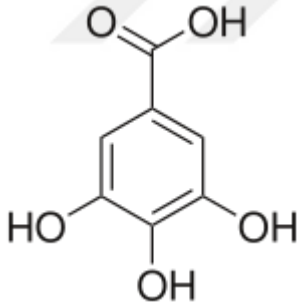
Selülozdan sonra bitkilerde en fazla bulunan kompleks bir fenolik makromoleküldür. Lignin mekanik etkisi ile önemli koruyucu fonksiyonlara sahiptir. Odunsu saplarda, tohumlarda bulunurlar ve haşere caydırıcı olarak rol oynarlar. Bu bileşiklerin bazıları tıbbi özelliklere sahiptir (Breitmaier, 2006).



Şekil 5. Lignin kimyasal yapısı

1.5.1.7. Tanenler

Ligninlerden sonra savunma özelliklerine sahip bir başka bitki fenolik polimeri de tanenlerdir. Bitkileri herbivorlara (bitkisel organizmaları besin olarak kullanan hayvanlar) karşı korur. Proteinleri bağlama ve parçalama özellikleri vardır. Kondense tanenler (proantosiyanidinler) ve hidrolize olabilen tanenler olmak üzere iki gruba ayrılır. Kondense tanenlere göre hidrolize tanenler bitkilerde daha az miktarda bulunurlar. Kondanse tanenlere kateşin, epikateşin; hidrolize olabilen tanenlere gallik asit, elarjik asit örnek olarak verilebilir (Hassanpour vd., 2011).



Şekil 6. Tanenlerin kimyasal yapısı

1.6. Enzimler

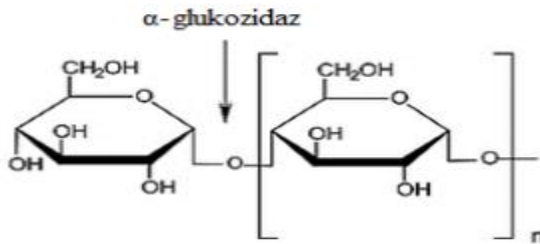
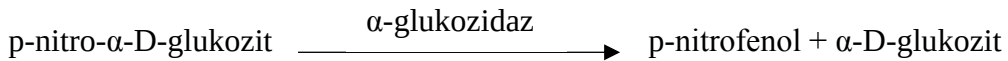
Enzimler, canlı organizmalarda biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hücrelerden ekstrakte edilebilen daha sonra çok çeşitli ticari açıdan önemli süreçleri katalize etmek için kullanılabilen biyolojik katalizörlerdir. Son derece güçlü katalizörler olmanın yanı sıra, genellikle sadece bir tip substrat molekülünün ürün moleküllerine dönüşümünü katalize etmeleri bakımından önemli ölçüde özgüllüğe sahiptir (Robinson, 2015).

1.6.1. α -Glukozidaz Enzimi

Enzimlerin substrat haricinde etkileşime uğradığı moleküller vardır. Bu moleküllerin etkileşimi sonucunda ürün oluşmaz ve enzim katalitik görevini gerçekleştiremez. Enzim etkisini azaltan ya da durduran bu moleküllere Enzim inhibitörleri adı verilir (Sabory, 2009).

Protein bağlama işlevlerinden dolayı, fenolik bileşiklerin sindirim enzimlerinin aktivitelerini kısıtlama özelliği vardır. Birçok bitki polifenolünün farklı in vitro denemelerinde karbohidrat yıkımında görevli enzimleri inhibe ettiğini kanıtlamıştır (Mai vd., 2007). Karbonhidratlar çeşitli enzimler tarafından glukozla dönüştürülür. Bunlardan α -glukozidaz (EC 3.2.1.20), bağırsak hücreleri veya dokuları tarafından üretilir ve hidrolizin son basamağında oligosakkaritlerdeki glikozidik bağları parçalar (Li vd., 2019). Glukoz, kan şekerinin ana bileşenidir. Bu nedenle α -glukozidaz, tip 2 diabetes mellitus tedavisi için ideal bir hedef olabilir (Seo vd., 2007). Antidiyabetik özellikleri araştırmak için, bu enzim, α -glukozidaz inhibitörü, diğer oral glukoz düşürücü ajanlara kıyasla daha az hipoglisemik semptomlara neden olduğundan, in vitro deneyler için bir belirteç olarak kullanılabilir (Osonoi vd., 2010). α -Glukozidaz inhibitörü (GI), α -glukozidaz ve şeker bağlama bölgelerini geri dönüşümlü olarak işgal ederek α -glukozidaz aktivitesini inhibe eder, böylece polisakkarit bozulmasını azaltır. Karbohidratların bağırsak emilimini geciktirir. GI'lerin en belirgin özelliği, α -glukozidazın bağırsak karbohidrat ayrışma hızı üzerindeki inhibisyonudur (Larr, 2008).

α -Glukozidazlar spesifik olarak α -glukopiranosidik bağı hidrolize eder, böylece şekerin indirgeyici olmayan ucundan bir α -D-glukoz serbest bırakır. Bu aşamada oluşan reaksiyon aşağıdaki gibidir (Taslimi ve Gülçin, 2017). α -glukozidaz enziminin etki ettiği bağ yapısı Şekil 7’de verilmiştir.



Şekil 7. α - Glukozidaz enzimlerinin substratı olan nişasta ile etkileşimi (Taslimi ve Gülçin, 2017).

α -Glukozidaz enzim inhibitörlerinin enzimler üzerindeki etkileri farklılık göstermektedir. Bitkilerden elde edilen doğal glukozidaz inhibitörleri, daha az yan etkileri ve etkinlikleri nedeniyle diyabet tedavisinde çok önemli hale gelmiştir.

1.7. *Linum mucronatum* subsp. *armenum*

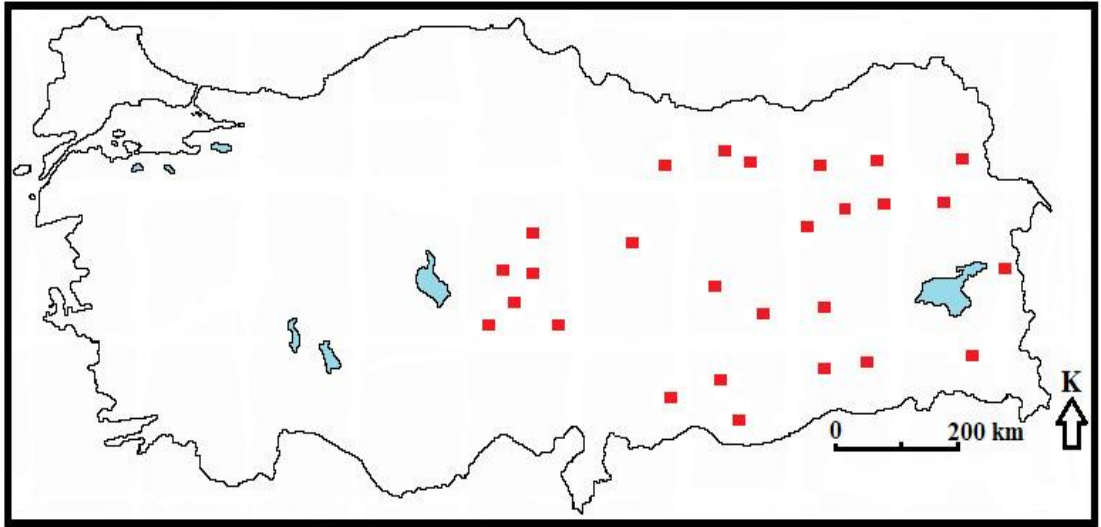
Linum cinsi içerdiği tür sayısı bakımından Linaceae (Ketengiller) familyasında yer alan en büyük cinstir ve 200 civarında taksona sahiptir (Melchior, 1964). *Linum* çoğunlukla Akdeniz havzası olmak üzere, Amerika'nın güneybatısı ve kuzeyinde, Asya'nın subtropikal ve ılıman bölgelerinde yayılış göstermektedir (Rendle, 1937; Cronquist, 1968; Hickey ve King, 1981). Ancak *Linum* cinsinin asıl yayılış alanları Kuzey Amerika Kıtası, Balkan Yarımadası ve Anadolu'dur (Robertson, 1971). *Linum* cinsi Türkiye'de 43 tür (67 takson) ile temsil edilmektedir (Bizim Bitkiler, 2022). Toplam 67 taksondan 26'sı endemiktir (Bizim Bitkiler, 2022) ve endemizm oranı yaklaşık olarak % 38.80'dir. *Linum* cinsinin ülkemizde takson sayısının fazla ve endemizm oranının yüksek olması, bu cinsin gen merkezlerinden birinin Anadolu olabileceğini gösterir (Yılmaz vd., 2011).

Çalışma materyalimiz olan *Linum mucronatum* subsp. *armenum* (Şekil 8) bitkisinin Yılmaz (2009)'a göre takson tanımlaması aşağıdaki gibidir: Yarı çalimsı olmayan, otsu çok yıllıklar olup dallanma tabandadır. Çiçekli gövdeler dik veya yükselici, 10 – 35 cm uzunluğundadır. Bu gövdeler omurgalı, omurga düz ve taban yaprakları taşımaz. Gövde yaprakları oblong veya oblanseolat, akuminat, 1 – 3 damarlı, 9 – 35 × 3 – 8 mm, yaprak tabanında stipulalıdır. Çiçek durumu simoz, 7 – ve daha çok çiçeklidirler. Çiçekler heterostilik yapıda, Sepaller lanseolat, 9 – 11 × 1.5 – 2.5 mm olup omurgalıdır. Uçta zarımsı kenarlı ve sillidir. Petalleri sarı ve tabanı mor lekeli, obovat, 19 – 33 × 8 – 11 mm olup akut veya obtustur. Filament tübü 3 – 4 mm ve filamentler en çok 8 – 11 mm uzunluğundadır. Anterler oblong 2 – 3 mm uzunluğunda, sarı renklidir. Staminod linear, en çok 1 mmdir. Ovaryum küremsi, stigma lineardır. Kapsül 4 – 5 mmdir.



Şekil 8. *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisi

Bu alt türün Dünya'daki Yayılışı: Kafkasya, İran ve Irak, Türkiye'deki yayılışı; İç Anadolu (Kayseri, Kırşehir, Nevşehir, Niğde, Sivas), Doğu Karadeniz (Bayburt, Giresun ve Gümüşhane) Doğu Anadolu (Elazığ, Erzincan, Erzurum, Malatya, Van) ve Güneydoğu Anadolu (Diyarbakır, Tunceli, Siirt, Şanlıurfa) bölgeleridir (Yılmaz, 2009). *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin Türkiye'deki bölgelere göre yayılışı (Şekil 9)'da gösterilmiştir.



Şekil 9. *Linum mucronatum* subsp. *armenum*'un Türkiye'deki yayılışı

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Kullanılan Cihazlar

Deneyisel çalışmalarda Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarında mevcut malzemeler ve cihazlar kullanılmıştır. Kullanılan cihazlar ve cihazların markaları Tablo 4’ de verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

CİHAZ ADI	MARKASI
Mikropipet	Eppendorf (100-1000 µl)/(1000-5000 µl)
Mikropipet	Transferpette (10-100 µl)/(100-1000 µl)
Buzdolabı (+4 °C)	Beko
pH metre	HANNA instruments
Analitik Terazı	KERN ABJ-NM/ABS-N
Vorteks Karıştırıcı	Heidolph
Magnetik Karıştırıcı	İKA® RH Basic 2
UV-Vis Spektrofotometre	SHIMADZU
Öğütücü (Blender)	Waring Commercial
Evaporatör	Heidolph

2.2. Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasallar ve kimyasalların satın alındıkları firmaların ticari isimleri Tablo 5’ de gösterilmiştir.

Tablo 5. Kimyasallar ve markaları

MADDE ADI	MARKASI
Etanol	ISO-Lab
Metanol	ISO-Lab
Aseton	Sigma-Aldrich
Asetonitril	LiChrosolv®
n-Hekzan	ISO-Lab
DPPH	Aldrich
TPTZ	Sigma
FeCl ₃	Merck
CuCl ₂	Emsure®
Alkolik Neocuproine	Aldrich
Amonyum Asetat	Merck
Alüminyum Nitrat	Sigma Aldrich
Potasyum Persülfat	Sigma Aldrich

Tablo 5. (Devamı)

Folin-Ciocalteu	Merck
Na ₂ CO ₃	Sigma Aldrich
α -glukozidaz	Sigma Aldrich
4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	Biosynth Carbosynth
Troloks	Acros Organics
Gallik Asit	Sigma Aldrich
Kuarsetin	Merck

2.3. Kullanılan Reaktifler ve Hazırlanışları

Özellikle antioksidan aktivite testlerinde kullanılan reaktif çözeltiler ve bu çözeltilerin hazırlanışları Tablo 6’ da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan bazı reaktifler ve hazırlanışları

ÇÖZELTİ	HAZIRLANIŞI
100 μ M DPPH reaktifi	1.97 mg DPPH 50 ml Metanol’de çözünür.
(A) 300 mM Asetat Tamponu	2.586 ml der. (%99.5) Asetik asite 40 ml saf su ve 90 ml metanol ilave edilir. 0.5 M NaOH çözeltisi ile pH=3.6’ya ayarlanır. Son olarak hacim 150 ml’ye saf su ile tamamlanır.
(B) 10 mM TPTZ	0.0468 g TPTZ 6 ml 100 mM HCl’de çözünür. Sonra üzerine metanol ilave edilir.
(C) 20 mM FeCl ₃	0.0486 g FeCl ₃ 6 ml saf suda çözünür. Üzerine metanol ilave edilir.
FRAP Reaktifi	A, B ve C çözeltileri sırasıyla; 10:1:1 oranında karıştırılır. Toplam hacim A+B+C= 180 ml
0.2 N Folin-Ciocalteu Reaktifi	0.2 N reaktif saf su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanır.
7.5 mM Neokuproin	390.5 mg neokuproin etanolle 250 ml’ye tamamlanır.
10 mM CuCl ₂	336.25 mg CuCl ₂ saf su ile 250 ml’ye tamamlanır.
7 mM ABTS (A)	0.038 g ABTS [C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₆ S ₄ (NH ₃) ₂] tartılıp 1 ml saf su ve etanolde çözülerek hazırlanır.
2.45 mM Potasyum persülfat (B)	0.0066 g K ₂ S ₂ O ₈ tartılıp 3 ml saf su ve etanolde çözülerek hazırlanır.
ABTS reaktifi	A ve B karıştırılıp karanlık ortamda 18 saat bekletilir.

2.4. *Linum mucronatum* subsp. *armenum* Ekstraktlarının Hazırlanışı

Gümüşhane’nin Merkez ilçesine bağlı, Bağlarbaşı mahallesinden *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisi 30 Temmuz 2021 tarihinde toplandı. Bitki, üzerindeki toz ve topraktan arındırıldıktan sonra çiçek ve yaprak kısımları ayrılarak gölgede kurutulmaya bırakıldı. Kuruyan çiçek ve yapraklar blenderdan geçirilerek toz haline getirildi.

Ekstraksiyon çözücüsü olarak birbirlerinden farklı polaritelere sahip metanol, etanol, aseton, asetonitril ve hekzan olmak üzere 5 çözücü ile çalışıldı. Ekstraksiyon işleminde her bir çözücü için toz haline getirilen çiçek ve yaprak 5'er gr tartıldı. Üzerlerine 50'er ml çözücü eklendi ve 2 saat magnetik karıştırıcıyla ekstrakte edildi (Akar, 2021). Ekstraksiyon sonunda önce adi süzgeç kağıdından sonra mavi banttan süzülerek berrak çözeltiler elde edildi. Daha sonra bu ekstraktlar darası alınan balonlara konularak evaporatörde çözücüleri uçuruldu. Her biri kendi çözücüleri eklenerek konsantrasyonları belirlendi. Hazırlanan ekstraktlar çalışmalar tamamlanana kadar +4 °C' de ağzı kapalı şekilde bekletildi.

2.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

2.5.1. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

Antioksidan aktivite belirlemede yaygın olarak kullanılan, DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali ticari olarak satın alınabilen bir serbest radikal olup bu radikal 517 nm'de maksimum absorbans göstermektedir (Brand-Williams vd., 1995). Antioksidanlarla muamele de, DPPH•'tan kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbansın düşüşüne sebep olmaktadır. Çalışmada üç paralel olarak, 750 µl numune çözeltileri üzerine aynı hacimde 100 µM'lık metanolik DPPH radikal çözeltisi ilave edildi. Karışım vortekslendikten sonra 60 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bekleme sonunda spektrofotometre ile 517 nm'de absorbansları belirlendi. Karşılaştırma için aynı koşullarda farklı konsantrasyonlarda troloks antioksidan standardı (0.005 mg/ml'den başlayarak) da çalışıldı.

Farklı numune konsantrasyonu ile muamele edilen DPPH radikalinin absorbansındaki değişim ölçülerek, absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizildi. $y=ax+b$ denkleminde DPPH• konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı µg/ml cinsinden belirlendi ve sonuçlar SC₅₀ değeri olarak ifade edildi. Düşük SC₅₀ değerleri daha yüksek radikal temizleme potansiyelini gösterir.

2.5.2. Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

Benzie ve Strain (1996) tarafından geliştirilen FRAP yönteminde *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının farklı çözücü ekstraktları ile antioksidan standart olan troloks farklı konsantrasyonlarda seyreltilerek (1000-500-250-125-62.5 µM) çalışıldı. Öncelikle üç paralel olacak şekilde 50'er µl numune ve standart çözeltileri tüplere aktarıldı. Reaktif körü tüplerine 50'er µl numune

çözücüleri ve numune körü tüplerine ise numune çözeltilerinden 50'şer µl aktarıldıktan sonra FRAP çözücüsünden 1,5 ml eklendi. Daha sonra numune körü tüpleri dışındaki tüplere 1,5 ml taze olarak hazırlanmış FRAP reaktifi eklendi. Tüpler vorteksenerek 20 dakika bekletildi. 20 dakika sonunda absorbans değerleri 595 nm'de okundu. Sonuçlar standart antioksidan madde olan troloks ile karşılaştırılarak µM TEAC cinsinden hesaplandı.

2.5.3. Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Aktivite (CUPRAC) Tayini

Çalışmada Apak vd. (2004)'nin geliştirdiği yöntem modifiye edilerek uygulandı. Bu yöntemde, sırasıyla eşit hacimde Cu (II) klorür çözeltisi, %96'lık etil alkol ile hazırlanmış neokuproin çözeltisi, amonyum asetat tamponu (pH=7) ve analiz çözeltileri eklendi. Sonrasında son çözelti hacmi 4.1 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tüpler ağzı kapalı olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve 30 dakika sonrasında 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

Aynı şekilde 6 farklı konsantrasyonda (0.1 µM'dan başlayarak) çalışılan standart antioksidan troloks grafiğinden elde edilen değer kullanılarak, numunelerin troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri µM TEAC olarak hesaplandı.

2.5.4. ABTS.⁺ Radikal Temizleme Kapasitesi Tayini

Re vd. (1999). tarafından geliştirilmiş olan ABTS.⁺ radikal temizleme kapasitesi tayini yöntemi antioksidan aktivite belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Öncelikle 7 mM ABTS stok çözeltisi hazırlamak için ABTS etanol: su (5: 1) çözücü karışımı içinde çözüldü. Sonra ABTS çözeltisi, etanol: su (1: 3) içinde hazırlanan 2.45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi ile karıştırıldı. Bu karışım ABTS radikal katyonunu (ABTS.⁺) hazırlamak için oda sıcaklığında ve karanlıkta 18 saat bekletildi. Beklemenin sonunda yaklaşık 1/40 oranında seyreltilerek, 734 nm'de absorbansı 0.07'ye ayarlandı.

Farklı konsantrasyondaki numune ekstraktları ile karşılaştırma için kullanılan standart antioksidan troloks çözeltisi üç paralel, reaktif ve numune körü olacak şekilde pipetlenerek 20 dk bekletildi. Bekleme sonunda her birinin absorbans değerleri 734 nm de ölçüldü. Son olarak ABTS• konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı mg/ml olarak hesaplandı ve sonuçlar SC₅₀ olarak ifade edildi.

2.5.5. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Linum mucronatum subsp. *armenum* bitkisinin farklı çözücüler kullanılarak ekstrakte edilen çiçek ve yaprak kısımlarının fenolik içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi

kullanılarak, Slinkard ve Singleton (1977) yöntemine göre bazı modifikasyonlar yapılarak belirlendi. Öncelikle 50 µl numune çözeltisi 2.5 ml saf su ile seyreltildi ve üzerine 250 µl, 0.2 N Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi. Daha sonra karışıma 750 µl Na₂CO₃ (%7.5) ilave edildi ve vortekslendi. Hazırlanan tüpler 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 765 nm’de absorbans değerleri belirlendi.

Beş farklı konsantrasyonda hazırlanan gallik asit (1000-500-250-125-62.5 µg/ml) standart kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğrunun fonksiyonu kullanılarak numunelerdeki fenolik bileşik miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE µg/ml) cinsinden hesaplandı.

2.5.6. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini

Linum mucronatum subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının flavonoid içeriği Fukumoto ve Mazza (2000) yöntemine göre yapıldı. Diğer testlerde de olduğu gibi çalışma üç paralel olacak şekilde çalışıldı. Ayrıca numune ve reaktif körü de yapıldı. Öncelikle 250’şer µl eşit miktarda numuneler tüplere pipetlendi, daha sonra bütün tüplere 2.1 ml metanol eklendi. Son olarak numune körü hariç tüplere sırasıyla, 50’ şer µl, 1M amonyum asetat (CH₃COONH₄) ve %10’luk alüminyum nitrat (Al(NO₃)₃.9H₂O) ilave edildi. Pipetleme sonunda karışımlar vortekslendi. Tüplerin, 40 dk inkübasyon süresi sonunda 415 nm’ de absorbans değerleri okundu.

Antioksidan standart olarak aynı anda ve aynı şekilde kuarsetin antioksidan standardı çalışıldı. Kuarsetin (0.25 mg/ml) antioksidan standardı altı farklı konsantrasyonda hazırlandı ve absorbans değerleri okundu. Daha sonra konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri ile standart kalibrasyon grafiği çizildi. Çizilen grafiğe göre ekstraktların toplam flavonoid madde miktarları kuarsetin antioksidan eşdeğeri (KAE mg/ml) olarak belirlendi.

2.6. LC-MS/MS Cihazı ile Bitki Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesi

LC-MS/MS ile fenolik içeriğin belirlenmesi Hitit Üniversitesi, Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından hizmet alımı şeklinde yapıldı. Çalışmada LC-MS/MS Thermo Scientific/Dionex Ultimate 3000-TSQ Quantum cihazı kullanıldı. Analiz için *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının etanol ekstraktları kullanıldı. Analizler ODS Hypersil 4,6*250 mm, 5µm kolon kullanılarak ve formik asit, su ve metanolle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi. A rezervuarında % 0.1 formik asit (saf suda) ve B rezervuarında %100 metanol bulunan gradient programı uygulandı. Ayrıca numune ve standartların

enjeksiyon hacmi 20 µl'ye mobil faz akışı 0.7 ml/dk'ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 °C'ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı. Gradient program 0-1 dakikada A rezervuarında %100, 22 dakikada 3 dakika boyunca %5 A, 26 dakikada 8 dakika boyunca %100 B rezervuarından geçirilerek optimize edildi.

2.7. In Vitro α -Glukozidaz Enzim İnhibisyonu

Linum mucronatum subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının etanolik ekstraktlarının α -glukozidaz enzim aktivitesi, modifiye edilerek (Yu vd., 2012) tarafından geliştirilen metoda göre çalışıldı. Çalışmada öncelikle test tüplerine 650 µl fosfat tamponu (pH:6.8 ve 0.1 M) eklendi. Daha sonra 20 µl numune ve fosfat tamponunda hazırlanan 30 µl α -glukozidaz enzimi (*Saccharomyces cerevisiae*, lyophilized powder, ≥ 10 units/mg protein) eklendi. Karışım 37 °C'de 10 dk bekletildikten sonra 75 µl substrat (4-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) ilave edildi. Karışım tekrar 37 °C'de 20 dk bekletildikten sonra bütün tüplere 650 µl 1M'lık Na₂CO₃ eklendi ve reaksiyon durduruldu. Absorbans değerleri 405 nm'de UV/VIS spektrofotometrede ölçüldü.

Standart inhibitör olarak farklı konsantrasyonlarda akarboz (pozitif kontrol) çalışıldı. Çalışma üç paralel olacak şekilde ve reaktif - numune körleri de yapıldı. Akarbozun ve numunelerin IC₅₀ değerleri (ortamda var olan enzim aktivitesini yarıya düşüren numune konsantrasyonu) hesaplandı. Numunenin IC₅₀ değeri ne kadar düşük ise enzim inhibisyonunda daha etkili olduğu anlamına gelmektedir.

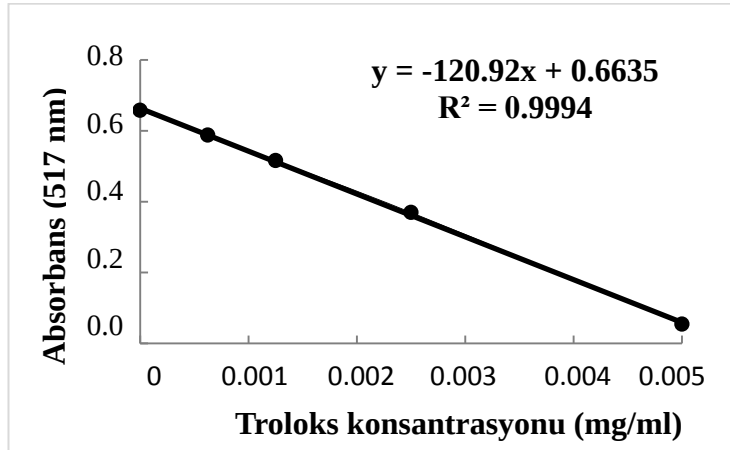
3. BULGULAR

3.1. Antioksidan Aktivite Sonuçları

Linum mucronatum subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yapraklarının 5 farklı çözücü (metanol, etanol, aseton, asetonitril, hekzan) ile hazırlanan ekstraktlarının, antioksidan aktiviteleri 6 farklı antioksidan aktivite tayin yöntemi (DPPH radikal temizleme aktivite, demir (III) indirgeme/ antioksidan güç (FRAP), Bakır (II) indirgeyici antioksidan aktivite (CUPRAC), ABTS.⁺ radikal temizleme kapasite, toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı testleri) kullanılarak belirlendi.

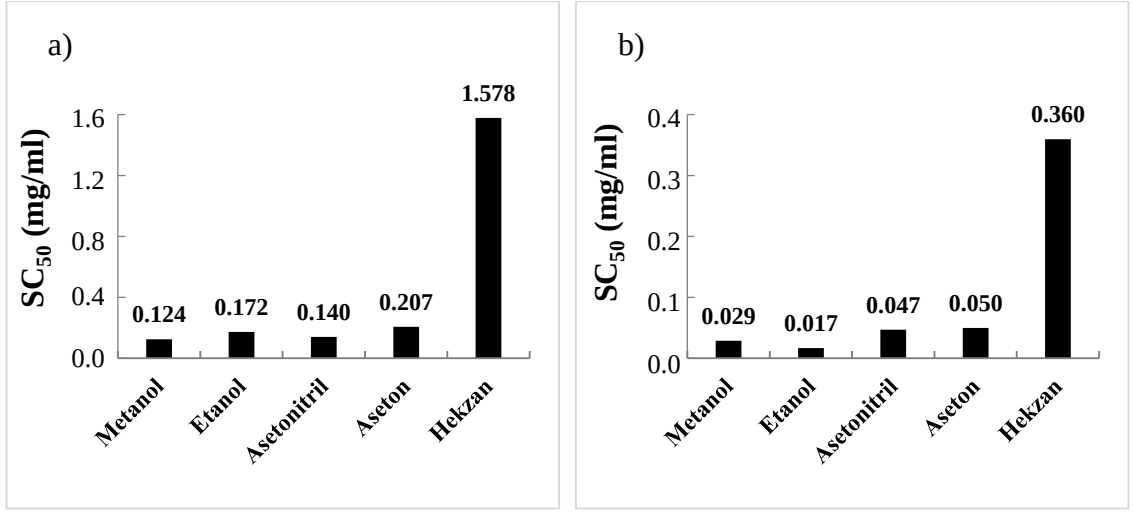
3.1.1. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

Numunelerin DPPH radikal temizleme aktivitesi belirlenirken standart kalibrasyon grafiği için troloks antioksidan standardı 5 farklı konsantrasyonda (başlangıç konsantrasyonu 0.005 mg/ml) çalışıldı. Elde edilen standart kalibrasyon grafiği de Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. DPPH antioksidan aktivite testi için farklı konsantrasyonlarda çalışılan troloks standart kalibrasyon grafiği

Elde edilen troloks standart kalibrasyon grafiğinin değerleri kullanılarak, troloks antioksidan standardının SC₅₀ değeri 0.0027 mg/ml olarak bulundu.



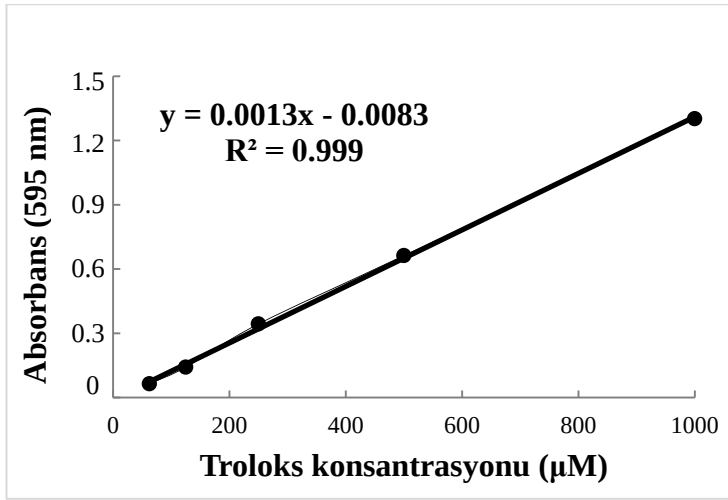
Şekil 11. DPPH radikal temizleme aktivitesinde çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

DPPH radikal temizleme aktivitesinde, düşük SC₅₀ değerleri daha yüksek radikal temizleme potansiyelini gösterdiği için en yüksek antioksidan aktiviteye çiçek kısmında metanol ekstraktının (0.124 mg/ml), yaprak kısmında ise etanol ekstraktının (0.017 mg/ml) sahip olduğu görülmektedir. Hem çiçek hem de yaprak kısımların da en düşük aktivite gösteren hekzan ekstraktı olmuştur. Her iki kısmın hekzan ekstraktı karşılaştırıldığında ise yaprak kısmının (0.360 mg/ml) çiçek kısmından (1.578 mg/ml) 4 kattan daha fazla aktif çıktığı görülmektedir. Ayrıca çiçek ve yaprak genel olarak değerlendirildiğinde, yaprak kısmının DPPH radikal temizleme aktivitesinin bütün çözücülerde çiçeğe göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çiçek: M>ACN>E>A>H ve Yaprak: E>M>ACN>A>H

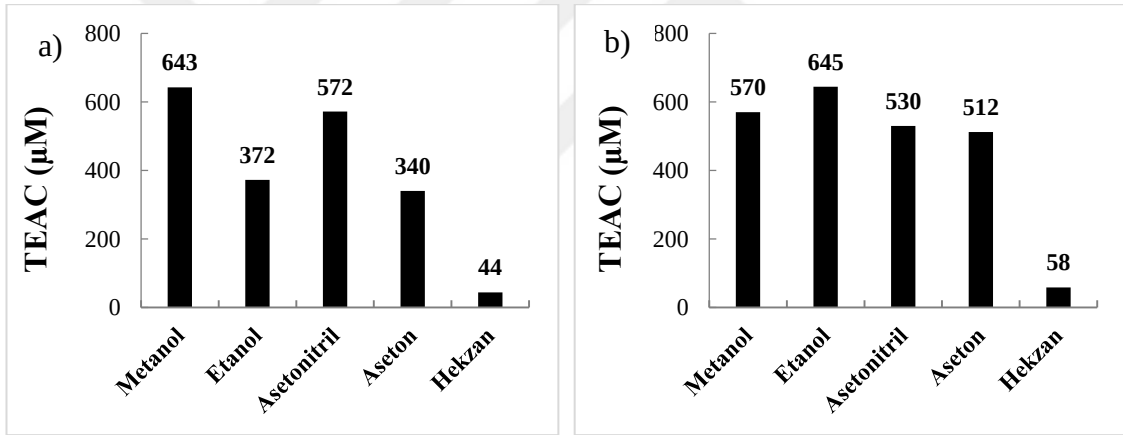
3.1.2. Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini Analizi

FRAP antioksidan aktivite testinde standart kalibrasyon grafiği için troloks antioksidan standardı 5 farklı konsantrasyonda (1000-500-250-125-62.5 µM) çalışıldı. Troloks için elde edilen standart kalibrasyon grafiği Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. FRAP antioksidan aktivite testi için farklı konsantrasyonlarda çalışılan troloks standart kalibrasyon grafiği

Troloks standart kalibrasyon grafiğinde elde edilen değerler kullanılarak her bir ekstraktın µM TEAC değerleri hesaplandı.



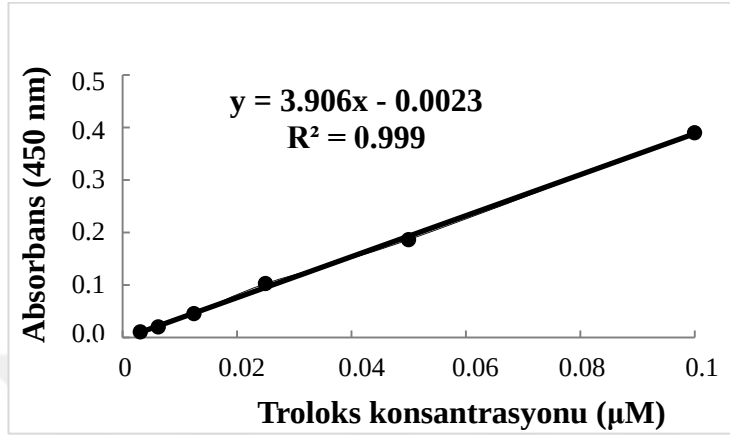
Şekil 13. FRAP antioksidan aktivite testinde çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının µM TEAC değerleri

FRAP antioksidan aktivite testinde, çiçek kısmında en yüksek antioksidan aktiviteyi metanol ekstraktı gösterirken (643 µM TEAC) en düşük aktiviteyi hekzan ekstraktı (44 µM TEAC) göstermiştir. Yaprak kısmında ise en yüksek antioksidan aktiviteyi etanol ekstraktı (645 µM TEAC) gösterirken, en düşük aktiviteyi hekzan ekstraktı (58 µM TEAC) göstermiştir. Aynı zamanda FRAP testindeki aktivite sıralaması DPPH test sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir.

Çiçek: M>ACN>E>A>H ve Yaprak: E>M>ACN>A>H

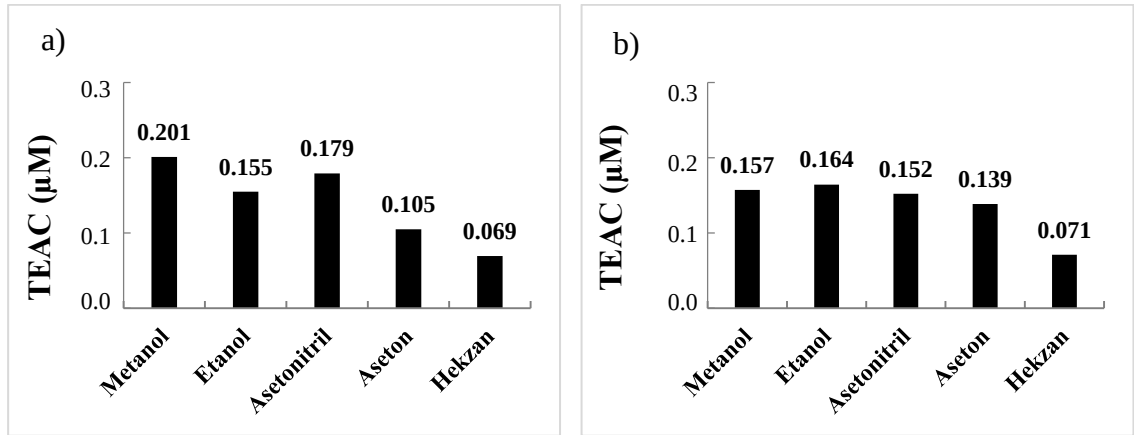
3.1.3. Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Aktivitesi (CUPRAC) Analizi

Numunelerin CUPRAC antioksidan aktivite testinde standart kalibrasyon grafiği için troloks antioksidan standardı 6 farklı konsantrasyonda (0.1 µM'dan başlayarak) çalışıldı. Elde edilen standart kalibrasyon grafiği de Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 14. CUPRAC antioksidan aktivite testi için farklı konsantrasyonlarda çalışılan troloks standart kalibrasyon grafiği

CUPRAC antioksidan aktivite testi için elde edilen troloks antioksidan standart kalibrasyon grafiğindeki değerler kullanılarak her bir ekstraktın µM TEAC değerleri hesaplandı.



Şekil 15. CUPRAC antioksidan aktivite testinde çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekkstraktlarının µM TEAC değerleri

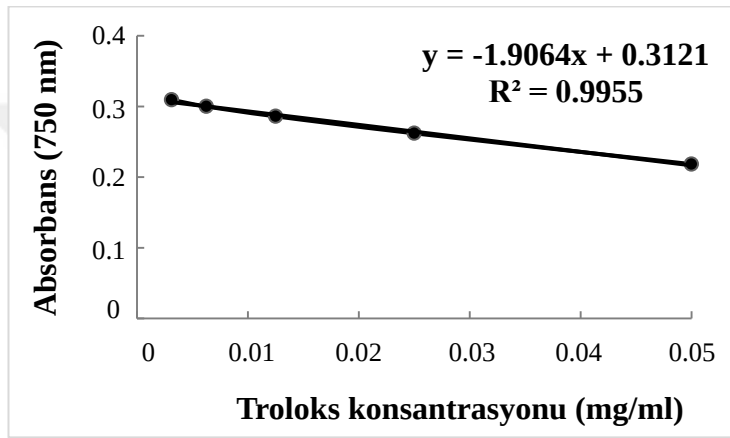
CUPRAC antioksidan aktivite testinde, çiçek kısmında en yüksek antioksidan aktiviteyi metanol ekstraktı gösterirken (0.201 µM TEAC), yaprak kısmında etanol ekstraktı (0.164 µM TEAC) göstermiştir. Çiçek kısmında metanolden sonra en yüksek antioksidan aktiviteyi asetonitril ekstraktı gösterirken, yaprak kısmında etanolden sonra

en yüksek aktiviteyi metanol ekstraktı göstermiştir. Diğer testlerde olduğu gibi hem çiçek (0.069 μ M TEAC) hem de yaprak (0.071 μ M TEAC) kısmında, en düşük antioksidan aktiviteyi hekzan ekstraktı göstermiştir.

Çiçek: M>ACN>E>A>H ve Yaprak: E>M>ACN>A>H

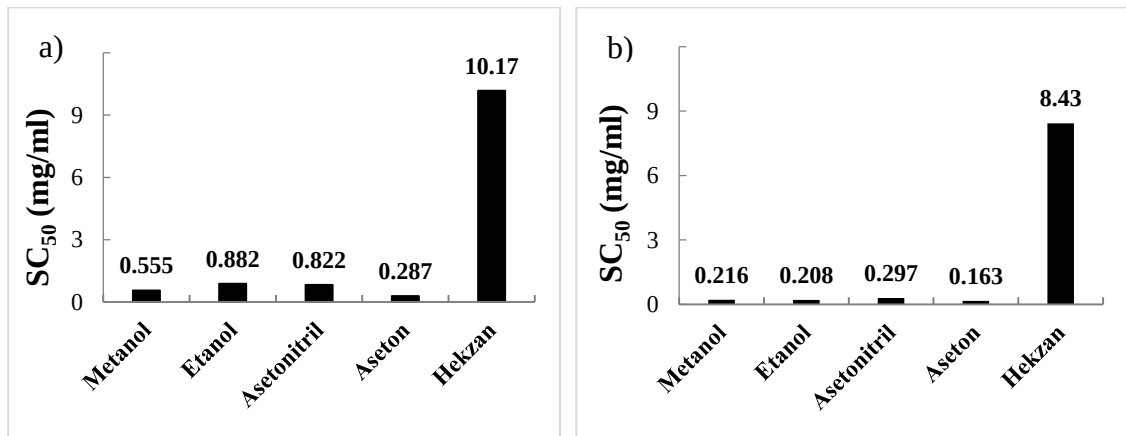
3.1.4. ABTS.⁺ Radikal Temizleme Kapasitesi Analizi

ABTS radikal temizleme aktivite testinde standart kalibrasyon grafiği için troloks antioksidan standardı 5 farklı konsantrasyonda (başlangıç konsantrasyonu 0.005 mg/ml) çalışıldı. Elde edilen standart kalibrasyon grafiği de Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16. ABTS antioksidan aktivite testi için farklı konsantrasyonlarda çalışılan troloks standart kalibrasyon grafiği

Elde edilen troloks standart kalibrasyon grafiğinin değerleri kullanılarak, troloks antioksidan standardının SC₅₀ değeri 0.082 mg/ml olarak bulundu.



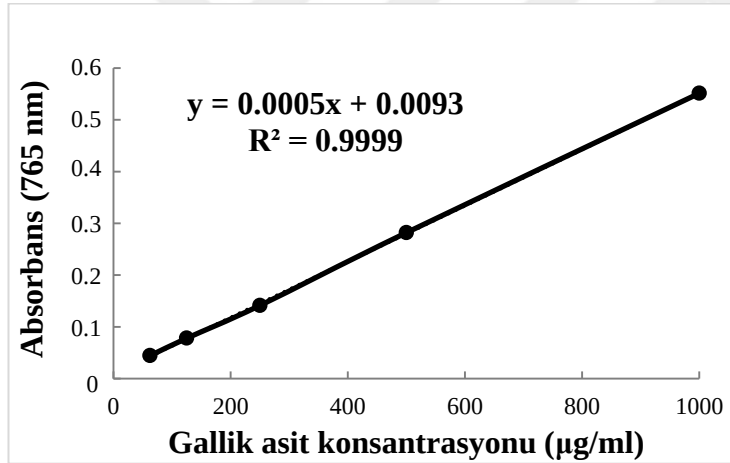
Şekil 17. ABTS radikal temizleme aktivitesinde çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının SC₅₀ değerleri

ABTS radikal temizleme aktivitesinde, düşük SC₅₀ değerleri daha yüksek radikal temizleme potansiyelini göstermektedir. Dolayısıyla grafikler değerlendirildiğinde diğer testlerden farklı olarak çiçek (0.287 mg/ml) ve yaprak (0.163 mg/ml) kısımlarında en yüksek antioksidan aktiviteye aseton ekstraktının sahip olduğu görülmektedir. Aynı zamanda çiçek ve yaprak kısımlarının diğer testlerde yüksek aktivite gösteren metanol ve etanol ekstraktlarına bakıldığında yaprak kısmının çiçek kısmından daha aktif olduğu da görülmektedir. Ayrıca hem çiçek (10.17 mg/ml) hem de yaprak (8.43 mg/ml) kısmında en düşük antioksidan aktiviteyi hekzan ekstraktı göstermiştir.

Çiçek: A>M>ACN>E>H ve Yaprak: A>E>M>ACN>H

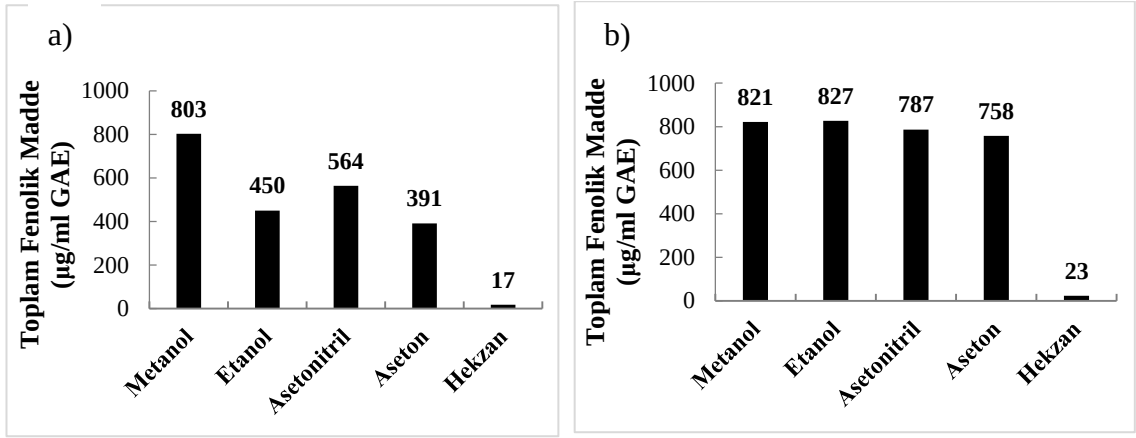
3.1.5. Toplam Fenolik Madde İçeriği Analizi

Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için gallik asit antioksidan standardı 5 farklı konsantrasyonda (1000-500-250-125-62.5-31.25 µg/ml) çalışıldı ve gallik asit standart kalibrasyon grafiği elde edildi (Şekil 18).



Şekil 18. Toplam fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde farklı konsantrasyonlarda çalışılan gallik asit standart kalibrasyon grafiği

Gallik asit standart kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğrunun fonksiyonu kullanılarak numunelerdeki fenolik bileşik miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE µg/ml) cinsinden hesaplandı (Şekil 19).



Şekil 19. *Linum* bitkisinin çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriklerinin GAE (µg/ml) cinsinden değerleri

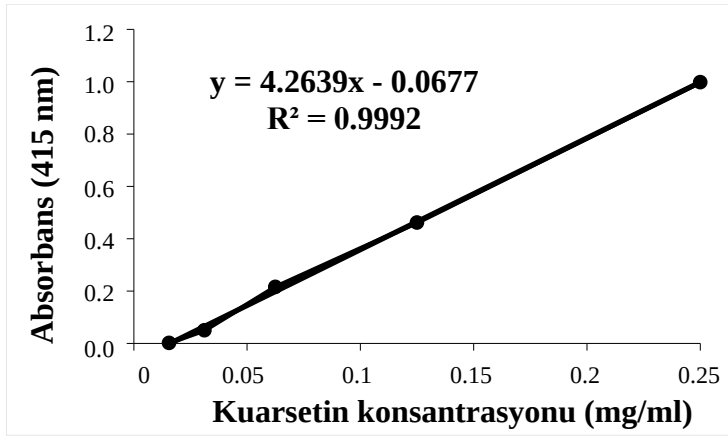
Numunelerin toplam fenolik madde içerikleri değerlendirildiğinde çiçek kısmında en yüksek aktiviteye metanol ekstraktının (803 µg/ml GAE) sahip olduğu görülmektedir. Yaprak kısmında ise en yüksek aktivite etanol ekstraktına (821 µg/ml GAE) aittir. Aseton ekstraktlarına bakıldığında yaprağın (758 µg/ml GAE) çiçekten (391 µg/ml GAE) neredeyse iki kat daha yüksek çıktığı tespit edilmiştir.

Aynı zamanda yaprak kısmının etanol (827 µg/ml GAE) ve metanol (803 µg/ml GAE) ekstraktlarının aktiviteleri birbirine yakın çıkmıştır. Ayrıca diğer testlerde olduğu gibi hem çiçek (17 µg/ml GAE) hem de yaprak (23 µg/ml GAE) kısmında fenolik madde miktarı en düşük olan hekzan ekstraktıdır. Genel olarak değerlendirildiğinde bütün ekstraktlarda yaprak kısmının çiçek kısmına göre fenolik içerik bakımından daha zengin olduğu söylenebilir.

Çiçek: M>ACN>E>A>H ve Yaprak: E>M>ACN>A>H

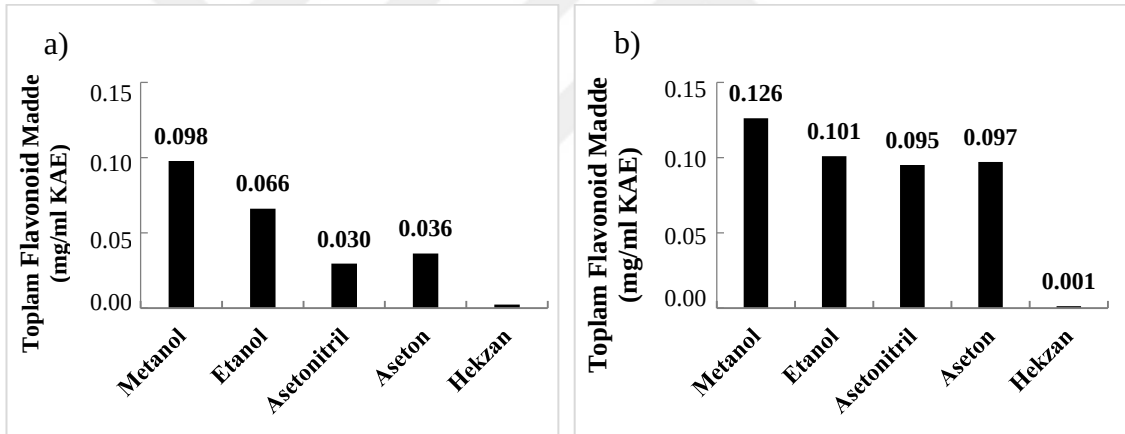
3.1.6. Toplam Flavonoid Madde İçeriği Analizi

Örneklerin toplam flavonoid içeriklerinin belirlenmesinde kuarsetin antioksidan standardı 5 farklı konsantrasyonda (başlangıç konsantrasyonu 0.25 mg/ml) çalışıldı ve Şekil 20’de gösterilen standart kalibrasyon grafiği elde edildi.



Şekil 20. Toplam flavonoid madde içeriğinin belirlenmesinde farklı konsantrasyonlarda çalışılan kuarsetin standart kalibrasyon grafiği

Kuarsetin standart kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğrunun fonksiyonu kullanılarak numunelerdeki flavonoid bileşik miktarları kuarsetin antioksidan eşdeğeri (KAE mg/ml) cinsinden hesaplandı (Şekil 21).



Şekil 21. *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin çiçek (a) ve yaprak (b) kısımlarının farklı çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının toplam flavonoid madde içeriklerinin KAE (mg/ml) cinsinden değerleri

Grafikler değerlendirildiğinde toplam flavonoid madde miktarı bakımından hem çiçek (0.098 mg/ml KAE) hem de yaprak (0.126 mg/ml KAE) kısmında en yüksek aktiviteye metanol ekstraktının sahip olduğu görülmektedir. En düşük aktiviteye ise çiçekte 0.002 mg/ml KAE ve yaprakta 0.001 mg/ml KAE değerlerine sahip hekzan ekstraktıdır. Hem çiçek hem de yaprak kısmının flavonoid madde miktarı bütün çözücüler için değerlendirildiğinde genel olarak yaprak kısmının çiçek kısmından daha zengin flavonoid içeriğe sahip olduğu görülmektedir.

Çiçek: M>E>A>ACN>H ve Yaprak: M>E>A>ACN>H

3.2. LC-MS/MS Analizi

LC-MS/MS ile fenolik içeriğin belirlenmesinde numunelerden çiçek ve yaprak kısımlarının etanol ekstraktları çalışıldı. Örneklerin fenolik bileşik içeriği kantitatif olarak belirlendi. Çalışmada; protokatekuik asit, protekatekuik aldehit, kafeik asit, vanilin, p-kumarik asit, salisilik asit, p-OH benzoik asit, rutin, kuersetin, kaemferol, oleuropein, ellajik asit, gallik asit, taksifolin, rezveratrol, kateşin, epikateşin, rozmarinik asit, şiringik asit ve ferulik asit olmak üzere toplamda 20 tane standart fenolik maddeye bakıldı. Bunlardan var olan fenolik bileşikler ve miktarları ppm ($\mu\text{g/ml}$) cinsinden Tablo 7’de verildi.

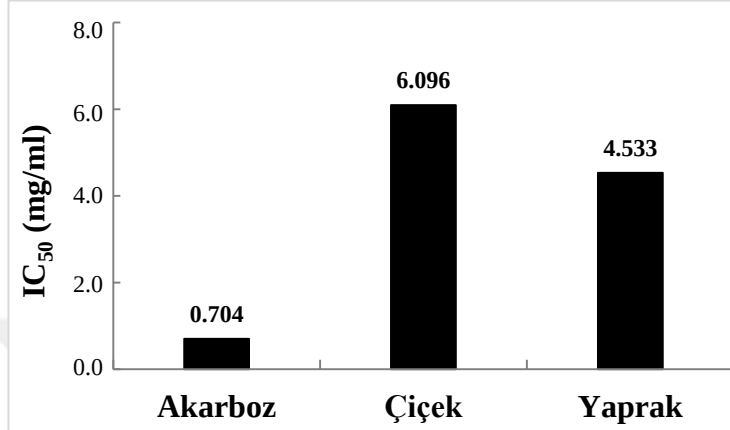
Tablo 7. *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının içerdiği fenolik bileşikler ve miktarları

Fenolik Bileşikler	Çiçek ($\mu\text{g/ml}$)	Yaprak ($\mu\text{g/ml}$)
Protekatekuik Asit	0.409	-
Kafeik Asit	0.857	0.223
Vanilin	0.341	0.444
P-Kumarik Asit	1.410	1.923
Salisilik Asit	0.445	-
P-OH Benzoik Asit	0.394	-
Rutin	1.189	0.420
Kuersetin	0.451	0.018
Kaemferol	0.256	-
TOPLAM	5.496	3.028

LC-MS/MS cihazı ile bakılan 20 çeşit fenolik bileşikten, çiçek kısmında 9 tanesi (protekatekuik asit, kafeik asit, vanilin, p-kumarik asit, salisilik asit, p-OH benzoik asit, rutin, kuersetin ve kaemferol) ve yaprak kısmında ise 5 tanesi (kafeik asit, vanilin, p-kumarik asit, rutin ve kuersetin) tespit edilmiştir. Fenolik içerek bakımından çiçeğin daha zengin (hem fenolik bileşik çeşitliliği hem de miktar açısından) olduğu görülmektedir. Bitkinin çiçek kısmında protekatekuik asit, salisilik asit, p-OH benzoik asit, kaemferol gibi fenolik bileşikler bulunurken yaprak ekstraktında bu fenolik bileşikler bulunmamaktadır. Miktar olarak çiçekte en fazla p-kumarik asit ($1.410 \mu\text{g/ml}$) ve rutin ($1.189 \mu\text{g/ml}$), yaprakta ise p-kumarik asit ($1.923 \mu\text{g/ml}$) bulunmuştur. Hem çiçek hem de yaprak kısmında en fazla miktara sahip fenolik bileşik ise p-kumarik asittir. Ayrıca tespit edilen fenolik bileşiklerin toplam miktarları incelendiğinde bitkinin çiçek kısmının toplam fenolik içeriği $5.496 \mu\text{g/ml}$ ’ iken yaprak kısmının $3.028 \mu\text{g/ml}$ olduğu belirlenmiştir.

3.3. α -Glukozidaz İnhibisyon Etkisi

α -Glukozidaz enzim inhibisyonu için akarboz pozitif kontrolü ve *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının etanol ekstraktları farklı konsantrasyonlarda çalışıldı ve her birinin IC_{50} değerleri mg/ml cinsinden hesaplandı. Elde edilen grafik Şekil 22’de verilmiştir.



Şekil 22. Akarboz ve örneklerin α -glukozidaz enzim inhibisyonunun IC_{50} değerleri

Linum mucronatum subsp. *armenum* bitkisinin yaprak (4.533 ± 0.12) ve çiçek (6.096 ± 0.21) kısımlarının etanol ekstraktlarının ve akarbozun (0.704 ± 0.06) α -glukozidaz inhibisyon aktiviteleri hesaplanmıştır. Şekil 22’de örnekler ile karşılaştırma yapabilmek için standart olarak kullanılan akarboz aynı grafikte gösterilmiştir. Elde edilen verilerde IC_{50} değeri ne kadar düşük ise enzim inhibisyonunda daha etkili olduğu anlamına gelmektedir. Dolayısıyla yaprağın çiçeğe göre enzim inhibisyonunun daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

4. TARTIŞMA

Bitkiler, dünyanın her yerinde olduğu gibi ülkemizde de gıda ve sağlıkta tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ülkemizde çok sayıda doğal bitki türü bulunmakta olup bunlar arasında endemik bitkiler de yer almaktadır.

Şifalı bitkiler çok eski zamanlardan beri sağlık alanında kullanılmaktadır. Etkinliklerini doğrulamak için küresel olarak çalışmalar yapılmıştır ve bulguların bazıları bitki bazlı ilaçların üretilmesine yol açmıştır (Sofowora vd., 2013). Bu anlamda Türkiye zengin bir floraya sahiptir. Yaklaşık olarak 11000 civarında bitki taksonu vardır ve bunlardan 500 kadarı alternatif tıp için kullanılmaktadır (Göktaş ve Gıdık, 2019). Tıbbi aromatik bitkilerden elde edilen bitkisel ilaçlar işlenmemiş, işlenmiş ve herbal (şifalı ot) ürünler olmak üzere üç çeşittir. Kullanım alanları oldukça geniş olan bu bitkileri, familyalarına, içeriğinde bulunan etken maddelerine, kullanımlarına ve farmakolojik etkilerine göre sınıflandırabiliriz (Göktaş ve Gıdık, 2019). Bitkisel ilaçların ve bitkisel besinlerin nutrasötiklerin kullanımı, birçok insanın farklı ulusal sağlık ortamlarında çeşitli sağlık sorunlarının tedavisi için bu ürünlere başvurmasıyla dünya çapında hızla genişlemeye devam etmektedir (Ekor, 2014).

Bazı bitkilerin antioksidan açıdan zengin olmaları, onların sağlık alanındaki araştırmalardaki önemini daha da artırmıştır. Doğal antioksidanların aktiviteleri, onların işlevleriyle yakından ilgilidir. Özellikle antioksidan aktivite gösteren bitkilerin gıda ve beslenme alanlarındaki kullanımlarına yönelik çok sayıda uygulama bulunmaktadır. Bu uygulamalardaki tercih edilme nedenleri organizmalar üzerinde sağlık açısından başta antioksidan aktivite olmak üzere antimikrobiyal, antikanser vb olumlu etkiler oluşturan karotenoid, flavonoid ve fenolik bileşikler yüksek oranda içermeleridir. Bu durumda bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi önem kazanmaktadır. Bitkilerden saflaştırılan etken maddelerin biyolojik aktivitelerinin aydınlatılması ve özellikle de antioksidan aktivitenin belirlenmesinde farklı mekanizmalara sahip çok sayıda metot kullanılmaktadır (Bursal ve Köksal, 2011).

Çalışmamızda kullanılan alt türün de içerisinde yer aldığı *Linum* cinsi üzerine yapılan çalışmalar keten tohumu olarak adlandırılan ve *Linum* cinsinin tip türü olan *Linum usitatissimum* L. üzerine yoğunlaşmıştır (Fedeniuk ve Biliaderis, 1994; Picur vd., 2006; Jhala ve Hall, 2010; Gruia vd., 2012; Herchi vd., 2016; Li vd., 2019). Bunun sebebi, bu türün ekonomik değerinin olması, yüksek antioksidan göstermesi, vücudumuz tarafından üretilmeyen bazı faydalı maddelerin bu türün tohumlarında

tespit edilmesi ve önemli miktarda fenolik bileşik içermesidir (Kajla vd., 2015). Bu bitkinin en çok kullanılan kısmı, α -linoleik asit (gıda ve kozmetik sanayinde kullanılan) bakımından zengin olması nedeniyle tohumudur (Fliniaux vd., 2014). Tohumdan elde edilen yağ gıda olarak tüketildiğinden dolayı etkilerinin ne derecede olduğunun belirlenmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır (Yang vd., 2021). Çalışmalardan elde edilen sonuçlar, tohum özelliklerinin belirlenmesine ve iklim ve coğrafi koşullarının keten tohumunun yağ asidi bileşimini, fenolik asitleri, lignanları ve antioksidan aktivitesini ne derecede etkilediğini ortaya koymuştur. Keten tohumu yağı ve fraksiyonları, antioksidan, anti-inflamatuar, antikanser ve antiviral özellikler dahil olmak üzere önemli tıbbi aktivitelere sahiptir (Halligudi, 2012). Keten tohumlarından elde edilen fitokimyasalların sağlık açısından yararları biyolojik aktiviteleri üzerine yapılan araştırmaların çoğu, bağlı olan lignan makromolekül kompleksi üzerine odaklanmıştır (Westcott ve Muir, 2003; Hano vd., 2013; Ramsay vd., 2017; Hano vd., 2017).

Linum mucronatum türünün bazı alt türleri üzerine biyokimyasal ve biyoaktivite içerikli çalışmalar yapılmış olmasına rağmen (Kartal vd., 2004; Zare vd., 2014; Koulman vd., 2005; Samadi vd., 2012; Malik vd., 2014) *Linum mucronatum* subsp. *armenum* ile ilgili herhangi bir biyoaktivite belirlenmesine yönelik çalışma yapılmamıştır. Bu durum onun biyokimyasal açıdan değerlendirilerek literatüre katkı sunulmasında mevcut çalışmanın yapılması için belirleyici olmuştur. Bu çalışmanın temel amacı çalışmadaki bitkinin antioksidan aktivitesinin belirlenerek doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilirliğinin, fenolik içerik ve enzimatik aktivitesinin belirlenerek gıda ve sağlık alanında biyoteknolojik bir ürün olarak faydalanabilirliğinin ön plana çıkarılmasının araştırılmasıdır. Literatürde *Linum mucronatum* subsp. *armenum* alt türü ile ilgili fenolik içerik analizi, antioksidan aktivite tayini ve enzimatik aktivite çalışmalarına rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmada elde edilen bulgular literatüre katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızda *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yapraklarının farklı polaritedeki metanol, etanol, asetonitril, aseton ve hekzan gibi çözücü ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri belirlenmiş ve etanol ekstraktı kullanılarak fenolik içeriği ile α -glukozidaz inhibisyon aktivite değerleri ölçülmüştür. Genel olarak, çiçekte en yüksek antioksidan aktiviteyi metanol ekstraktı gösterirken, yaprakta ise en yüksek aktiviteyi etanol ekstraktı göstermiştir. Aynı aktivite testlerinde çözücü farklılığına göre farklı sonuçların elde edilmesinde çözücülerin polariteleri de etkilidir (Kang vd., 2003).

Nitekim çalışmamızda aynı testlerde farklı polariteye sahip çözücüler için farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Yıldız vd. (2019) *Linum arboreum* L. türünün metanolik ekstraktlarının DPPH, ABTS, toplam antioksidan içeriği toplam fenol ve flavonoid içerikleri belirlenmiştir. Her iki özütün antioksidan içeriğini değerlendirmek için DPPH ve ABTS testlerinde IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar sırasıyla yaprak ve meyve için DPPH analizinde IC_{50} değerleri $106.55 \pm 1.20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $108.56 \pm 2.65 \mu\text{g ml}^{-1}$ iken, ABTS analizinde $1144.8 \pm 38.44 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve $1114.7 \pm 37.09 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Aynı çalışmada *Linum arboreum* yaprak kısmında toplam fenol $56.96 \pm \mu\text{g GA mg}^{-1}$ ve toplam flavonoid $426.49 \pm 12.20 \mu\text{g kateşin mg}^{-1}$ olarak ölçülmüştür.

Linum mucronatum subsp. *armenum* alt türünde DPPH için metanolik ekstraktlarda IC_{50} değerleri yaprak için $124 \mu\text{g ml}^{-1}$ ve çiçek için $29 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Her iki çalışmada da ortak olarak bakılan yaprak kısmındaki DPPH değerleri birbirine oldukça yakın çıkmıştır. Aynı şeyi ABTS, toplam fenolik içerik ve toplam flavonoid içerik testlerinde yaprak kısmı için elde edilen değerler için söyleyemeyiz. Mevcut çalışmamızda *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin yaprağının metanol ekstraktlarında ölçülen ABTS ve toplam fenolik içerik değerleri sırası ile ($555 \mu\text{g ml}^{-1}$, $803 \mu\text{g GAE ml}^{-1}$) *Linum arboreum*'da ölçülen değerlerden oldukça yüksek çıkmışken, toplam flavonoid içerik değeri ($98 \mu\text{g ml}^{-1}$ KAE) ise bu kıyasta tam tersi olarak oldukça düşük çıkmıştır. Bu değerlere göre alt türün yaprak kısmının daha aktif olduğu görülmektedir. Mevcut çalışmamızda çiçek ve yaprak kısmında tüm ekstraktlar için elde edilen FRAP, CUPRAC, toplam fenolik içerik ve toplam flavonoid içerik değerleri üzerine bir karşılaştırma değerlendirmesi yapıldığında elde edilen değerlerin birbirlerine yakın olduğu görülmektedir. Ancak hem DPPH hem de ABTS değerleri açısından çiçek ve yaprak kısımları için aynı durum söz konusu olmamıştır; çiçek kısmı oldukça yüksek değerlere sahiptir. Yaprak etanol ekstraktlarında DPPH değeri 0.172 mg/ml iken bu değer çiçekte 0.017 mg/ml 'dir. Yine etanol ekstraktlarında ABTS değeri yaprakta 0.882 mg/ml iken, bu değer çiçekte 0.208 mg/ml olarak ölçülmüştür. Özellikle çiçek kısmında renk oluşumuna katkı sağlayan bileşikler antioksidan aktivite bakımından oldukça aktiftirler. Yine *Linum arboreum* türü üzerine Sultan (2020) tarafından yapılan çalışmada bitkinin herba kısmının metanol ekstraktlarında DPPH (IC_{50}), toplam fenol ve flavonoid içerikleri sırasıyla $85.1 \mu\text{g/ml}$, 40.7 ve $55.4 \mu\text{g/mg}$ olarak ölçülmüş. DPPH sonuçları çalışmamızda elde edilen sonuçlar

ile uyumlu iken. Toplam fenolik ve flavonoid içerik açısından çalışmamızda yüksek değerler elde edilmiştir.

Aynı bitkinin farklı kısımları arasında aktivite değerleri bakımından ortaya çıkan farklılıklar kimyasal bileşimlerdeki değişkenliğe bağlıdır. Bitkilerin kimyasal bileşimi farklı gelişim evreleri, genetik çeşitlilik, bitki kısımları arasındaki gösterdikleri fonksiyonlara bağlı yapısal farklılıklar ve lokasyona bağlı çevresel etki değişiklikleri gibi birçok faktör tarafından etkilenmektedir (Akar, 2021). Bu da doğal olarak aktivite değerlerinin kısımlara göre değişkenlik göstermesine neden olmaktadır. Ek olarak, aynı kısımlarda farklı aktivite testlerinde sonuçların birbirleri ile uyumsuz olmaları ise aktivite testlerinin farklı mekanizmalara sahip olması ile açıklanabilir (Sahahidi ve Zhong, 2015).

Linum mucronatum subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının içerdiği fenolik bileşik kompozisyonu ve miktarlarının belirlenmesine yönelik etanolik ekstraktlarla yapılan LC-MS/MS analiz sonucunda çiçeğin toplam fenolik maddede içeriğinin (5.496 µg/ml) yapraktan (3.028 µg/ml) daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Tablo 7). Her iki bitki kısmında da en yüksek miktara sahip fenolik bileşiğin p-kumarik asit olduğu görülmüştür. P-kumarik asit hidroksisinnamik asit sınıfına ait bir organik bileşiktir (Schultheiss vd., 2011). P-kumarik asit esterleşmiş veya serbest asit formunda daha çok buğdaygillerin hücre duvarında, meyvelerde ve sebzelerde bulunmaktadır (Lou vd., 2012; Boz, 2015). Tedavisi zor hastalıklara çözüm olabilecek ilaçlar geliştirilirken, çevreye, insanlara ve diğer tüm canlılara karşı zararı ve yan etkilerinin olmadığı bilinen, doğal ve organik bileşiklerin kullanılması çoğu araştırma gruplarının temel amacı olmaktadır. Çok çeşitli biyolojik aktivitelerinin yanı sıra geniş spektrumlu antioksidan aktiviteye sahip olan, sinamik asit ve p-kumarik asitin de içerisinde yer aldığı türevleri, ilaç geliştirmek için yüksek potansiyelli bir bileşiktir (Matejczyk vd., 2017). Yapılan bir çalışmada p-kumarik asidin çalışmada kullanılan bakteriyel patojenlerinin büyümesini 10 ila 80 µg/ml arasında değişen MİK değerlerinde etkili bir şekilde inhibe ettiği ve p-kumarik asitin, mikroorganizma dış ve plazma zarı geçirgenliğini önemli ölçüde artırarak böylelikle bu fenoliğin plazma zarının bariyer oluşturma fonksiyonunda bir kayba neden olduğu rapor edilmiştir (Lou vd., 2012). Ayrıca kozmetikte deri pigmenti hastalıklarının özellikle de hiperpigmentasyonun önlenmesinde ve tedavi edilmesinde kullanılan cerrahi tedavi (kimyasal uygulama ve lazer tedavisi), farmakoterapi ve kozmetik kamuflaj gibi yöntemler cilt tahrişi alerji, mutasyonlar ve kanser gibi yan etkilere neden olabilir. Bu nedenle önlenmesinde doğal bir kaynak olarak bitkilerden elde edilen p-kumarik asitin

antimelanojenik etkileri (doğal cilt aydınlatıcı), insan çalışmaları da dahil olmak üzere çeşitli deneysel ortamlarda gösterilmiştir (Boo, 2019). *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının fenolik içeriğinde p-kumarik asitin yanı sıra kafeik asit, vanilin, rutin ve kuarsetin de tespit edilmiştir (Tablo 7). Rutin, vitamin P ve kuarsetin-3-O-rutinosit olarak ta bilinen ve birçok gıda maddesi, sebze ve içecekte bulunan bir flavonoiddir ve anti-inflamatuar, antioksidan, anti-diyabetik, nöroprotektif, nefroprotektif, gastroprotektif ve hepatoprotektif gibi biyolojik aktivite etkilerine sahiptir (Hosseinzadeh ve Nassiri-Asl 2014; Ghorbani, 2017). Kafeik asit (3,4-dihidroksisinnamik), bitki dokularında daha yaygın olarak bulunan hidroksisinnamat ve fenilpropanoid metabolitlerinden birisi olup ve kahve içecekleri, yaban mersini, elma ve elma şarabı dahil olmak üzere birçok gıda kaynağında mevcuttur (Magnani, 2014). Aynı zamanda, antioksidan, antiinflamatuar, antikanserojenik, antibakteriyel ve immünomodülatör etkiler gösteren bir dizi biyolojik ve farmakolojik özelliğe sahiptir (Armutcu vd., 2015). Mevcut çalışmamızdaki bitkinin her iki kısmında da tespit edilen vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehit) dünyada yaygın bir şekilde besinlerde tat ve aroma artırıcı olarak kullanılan doğal vanilyanın ana bileşenidir (Walton vd. 2003). Buna ek olarak, antioksidan ve antitümör potansiyele sahip olan vanilin bir biyoantimutajen olarak sınıflandırılmıştır ve çeşitli hücre sistemlerinde kimyasal ve fiziksel mutajenler tarafından indüklenen mutajenezi inhibe edebilme potansiyeline sahiptir (Makni, 2012; Bazerra, 2016). Çünkü DNA replikasyonu ve onarımı gibi hücresel süreçleri modüle ederek kanserleşmeyi engelleyebilir (King vd., 2007). Bununla birlikte özellikle bitkinin yaprak kısmında çiçek kısmına göre daha yüksek miktara tespit edilen kuarsetin tohum çimlenmesi, polen büyümesi, antioksidan mekanizma ve fotosentez gibi çeşitli bitki fizyolojik süreçlerinde rol oynamakla birlikte biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı bitkiyi koruyan güçlü bir antioksidandır (Singh vd., 2021).

Han vd. (2018) yapılan çalışmada *Linum usitatissimum* kabuğunun antioksidan aktivitesi ve polifenol içeriklerinin LC-MS/MS ile analizinde keten tohumu kabuğunun liyofilize sulu ekstrakt (AEF) ve buharlaştırılmış etanolik ekstraktının (EEF) etkilerini tespit etmek amacıyla DPPH, ABTS temizleme etkileri ve ferrik tiyosiyanat yöntemi ile toplam antioksidan aktivite incelenmiştir. Sonuç olarak etkili antioksidan kaynağı olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir. Aynı çalışmada yapılan LC-MS/MS analizlerinde p-hidroksibenzoik, vanilin, p-kumarik asit, askorbik asit, ferulik asit ve ellajik asit fenolikleri tespit edilmiş ve p-hidroksibenzoik asit hem AEF hem de EEF’de

en yüksek miktarda ölçülmüştür. P-hidroksibenzoik asit bitkimizin sadece çiçek ekstraktında tespit edilip yaprak ekstraktında bulunmamıştır.

Havuç, palmiye yağı, üzüm, ve muşmula gibi bitkilerden doğal yollar ile elde edilebilen p-hidroksibenzoik asit (Manuja vd., 2013) son zamanlarda gıda, kozmetik, ilaç, mantar öldürücüler olarak biyoteknolojik uygulamalarda umut verici bir ara madde olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Wang vd., 2018). Ayrıca çalışmamızda *Linum mucronatum* subsp. *armenum*'un LC-MS/MS analizinde hem çiçek hem de yaprak etanolik ekstraktlarının her ikisinde de en bol bulunan fenolik bileşikler olan p-kumarik asit ile vanilin de p-hidroksibenzoik asitin yanı sıra *Linum usitatissimum*'da (Han vd. 2018) yer alan ortak fenolikler arasında yer almaktadır.

Enzimler organizma kaynaklı protein tabiatında peptit bağları ile birleştirilen uzun bir aminoasit zincirinden oluşan her canlı türünün hücrelerinde meydana gelen çok sayıda biyokimyasal reaksiyondan sorumlu biyolojik katalizörlerdir (Kermesha ve Eskin, 2021; Uçak ve Afreen, 2022). Dolayısıyla enzimler organizmaların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için mutlaka gerekli olan bileşiklerdir. Bunlar, substratın spesifik bölgesine bağlanarak herhangi bir reaksiyonu aktive etmek için kullanılır. Enzimler, hareketlerinde özeldir ve aktiviteleri, substratın konsantrasyonuna, sıcaklık ve pH gibi diğer fiziksel koşullara bağlı olarak değişim göstermektedir (Blanco ve Blanco, 2017; Uçak ve Afreen, 2022). Enzimler mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilir. Enzimler yalnızca canlı hücrelerde oluşsa da birçoğu hücrelerden ayrılıp ve in vitro koşullarda da fonksiyonlarını sürdürebilirler. Enzimlerin özel kimyasal dönüşümlerini izolasyon içinde gerçekleştirme konusundaki bu eşsiz yeteneği, enzimlerin endüstriyel ve gıda üretim süreçlerinde, biyoremediasyonda ve tıpta giderek artan bir şekilde biyoteknoloji olarak kullanımlarına yol açmıştır ve bunların üretimi “enzim teknolojisi” olarak adlandırılmaktadır. Enzim teknolojisi, yeni teknolojilerin, temel biyoloji ve biyoinformatiğin gelişimine, yeni enzim uygulamalarına yol açmakta ve enzimlerin biyoteknolojik ürünler olarak endüstrideki kullanımlarının etkisini artırmaktadır (Smith vd., 2004).

Literatürde çalışmamızda kullandığımız *Linum mucronatum* subsp. *armenum* alt türüyle ilgili α -glukozidaz enzim inhibisyonu tayini ile ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bununla birlikte *Linum* cinsinin en yaygın olarak bilinen, kültürü yapılan ve en fazla enzim aktivitesi belirlenmiş türü *Linum usitatissimum* türüdür. Bu türün üzerinde çalışılan bazı enzimler şöyledir: Alkalaz (Wei vd., 2018), hidrojen peroksit (Amin ve Thakur., 2014), hidrosinitril liyaz (HNL) enzimi (Roberge vd.,

2007), β -glukozidaz (Linamaraz) enzimi (Fieldes ve Gerhardt, 2001), α -amilaz ve α -glukozidaz (Bhat vd., 2011), katalaz ve süperoksit dismutaz (Bozdemir, 2007).

Çalışmamızda in vitro α -glukozidaz enzim inhibisyonu araştırılmıştır. Yaprığın (IC_{50} : 4.533 mg/ml) çiçeğe (IC_{50} : 6.096 mg/ml) göre enzim inhibisyonunun daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Alfa glukozidaz inhibitörleri (AGI'ler), benzersiz bir anti-diyabetik ilaç sınıfıdır. Bakterilerden elde edilen bu oral ilaçlar, pankreas merkezli etki mekanizmasına sahip olmayan enzim inhibitörleridir (Kalra, 2014). Alfa-glukozidaz inhibitörleri, bir oral ilaç sınıfıdır. Tip 2 diyabette karbohidratların bağırsaktan emilimini azaltıp, sonuçta, tokluk durumunda kandaki glukoz seviyesinde daha yavaş ve daha düşük bir miktarda artış sağlar (Benella vd., 2010). Bu tür inhibitörler, bitki ve mikrobiyal kaynaklardan rapor edilmiştir (Ganesan, 2011). Bitkiler α -glukozidaz enzim inhibisyonu göstermeleri bakımından tüm organizmalar içerisinde önemli bir yere sahiptirler. Benella vd. (2010) son on yılda alfa glukozidazı inhibe eden tıbbi bitkilerden izole edilen doğal ürünlerin (alkaloidler, stilbenoidler (polifenol), triterpen, asitler (klorojenik asit, betulinik asit, siringik asit, vanillik asit, bartojenik asit, oleanolik asit, dehidrotrametenolik asit, korosolik asit, ellajik asit, ursolik asit, gallik asit, fitosterol, miyoinositol, flavonoidler, flavonolignanlar, antrakınonlar, antronlar ve ksantonlar, feruloylglucosides, flavanon glikozitler, asetofenon glikozitler, glukopiranozit türevleri, genin türevleri, flavonol, antosiyaninler) güçlü bir şekilde aktivite gösterdiğini vurgulamıştır. Assefa vd. (2020) doğal alfa-glukozidaz inhibitör bileşiklerini literatürden elde ettiği verilere göre sınıflandırmış ve IC_{50} değerlerini vermiştir. Assefa vd. (2020), *Linum mucronatum* subsp. *armenum*'un LC-MS/MS analizinde çiçek ve yaprak etanolik ekstraktlarından elde edilen bileşikler arasında yer alan kuarsetin için IC_{50} değerini 7 μ M, protekatekuik asit için 85.1 μ g/ml (pozitif kontrol: 230.4 μ g/ml) olarak vermiştir. *Linum mucronatum* subsp. *armenum*'un LC-MS/MS analizinde hem çiçek ve hem de yaprak kısmında en yüksek miktarlarda tespit edilmiş olan p-kumarik asit Pei vd. (2016) belirtğine göre konjugatları ile birlikte alfa glukozidazı inhibe ederek diyet karbohidratının bağırsak emilimini geciktirir ve p-kumarik asit, α -amilaz ve α -glukozidaz veya β -glukovidaz üzerinde orta derecede ($IC_{50} > 30\ 000\ \mu$ mol l^{-1}) bir inhibitör etki gösterir. Yine üzerine çalışma gerçekleştirdiğimiz bitkinin her iki kısmında da tespit edilen kafeik asitin kayda değer bir biçimde α -glukozidaz üzerine enzim inhibisyonu gösterdiğine dair bulgular ($IC_{50} = 4.98\ \mu$ g/ml) mevcuttur (Obob vd., 2015). Benzer şekilde *Linum mucronatum* subsp. *armenum*'un her iki kısmında tespit edilen vanilinin alfa glukozidaza karşı inhibitör etkisi Liu vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada IC_{50} değeri 28.34 ± 0.89 mg/ml olarak rapor edilmiştir. Dubey vd. (2017)

tarafından rutin fenoliğinin alfa glukozidaz ($p < 0.001$; %52.56) için önemli bir inhibisyon düzeyine sahip olduğu belirtilmiştir.

Bitkilerin α -glukozidaz enzim inhibisyonu belirlemeye yönelik birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Benella vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada 29 bitki familyasına ait 47 tür α -glukozidaz enzim inhibisyonu açısından değerlendirilmiş olup, IC_{50} değerleri 0.9 μ g/ml ve 17 mg/ml arasında değişim göstermiş olduğu belirtilmiştir. Lawag vd. (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise 6 bitki türünün aynı enzim için inhibitör aktiviteleri IC_{50} (0.08 ± 1.82 ve 519.86 ± 3) şeklinde rapor edilmiştir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Linum mucronatum subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yapraklarının beş farklı çözücü ile hazırlanan ekstraktlarının altı farklı antioksidan aktivite testi ile belirlenen antioksidan aktivite sonuçları;

DPPH radikal temizleme aktivitesinde, troloks standart kalibrasyon grafiği oluşturularak karşılaştırma yapıldı. Elde edilen verilere göre en yüksek antioksidan aktiviteye çiçek kısmında metanol ekstraktının (0.124 mg/ml), yaprak kısmında ise etanol ekstraktının (0.017 mg/ml) sahip olduğu görüldü. Hem çiçek (1.578 mg/ml) hem de yaprak (0.360 mg/ml) kısımların da en düşük aktivite gösteren ekstrak hekzan ekstraktı oldu. Ayrıca çiçek ve yaprak genel olarak değerlendirildiğinde, yaprak kısmının DPPH radikal temizleme aktivitesinin bütün çözücülerde çiçeğe göre daha yüksek olduğu belirlendi.

FRAP antioksidan aktivite testinde, troloks standart kalibrasyon grafiğinden elde edilen değerler kullanılarak her bir ekstraktın μM TEAC değerleri hesaplandı. Analizler sonucunda en yüksek FRAP antioksidan aktiviteyi çiçek kısmında metanol ekstraktı gösterirken (643 μM TEAC) en düşük aktiviteyi hekzan ekstraktı (44 μM TEAC) gösterdi. Yaprak kısmında ise en yüksek antioksidan aktiviteyi etanol ekstraktı (645 μM TEAC) gösterirken, en düşük aktiviteyi hekzan ekstraktı (58 μM TEAC) gösterdi. Aynı zamanda FRAP testindeki aktivite sıralaması DPPH test sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir.

CUPRAC antioksidan aktivite testinde, troloks antioksidan standart kalibrasyon grafiğindeki değerler kullanılarak her bir ekstraktın μM TEAC değerleri hesaplandı. Çiçek kısmında en yüksek antioksidan aktiviteyi metanol ekstraktı gösterirken (0.201 μM TEAC), yaprak kısmında etanol ekstraktı (0.164 μM TEAC) gösterdi. Çiçek kısmında metanolden sonra en yüksek antioksidan aktiviteyi asetonitril ekstraktı gösterirken, yaprak kısmında etanolden sonra en yüksek aktiviteyi metanol ekstraktı gösterdi. Diğer testlerde olduğu gibi hem çiçek (0.069 μM TEAC) hem de yaprak (0.071 μM TEAC) kısmında, en düşük antioksidan aktiviteyi hekzan ekstraktı göstermiştir.

ABTS radikal temizleme aktivitesinde, antioksidan standart olan troloks kalibrasyon grafiği oluşturuldu ve karşılaştırma yapıldı. ABTS testinde diğer testlerden farklı olarak çiçek (0.287 mg/ml) ve yaprak (0.163 mg/ml) kısımlarında en yüksek

antioksidan aktiviteye aseton ekstraktının sahip olduğu görüldü. Ayrıca hem çiçek (10.17 mg/ml) hem de yaprak (8.43 mg/ml) kısmında en düşük antioksidan aktiviteyi diğer testlerde olduğu gibi hekzan ekstraktı göstermiştir.

Antioksidan aktivite testlerinin çeşitli mekanizmalara sahip olması ve farklı polariteye sahip çözücülerin bitkilerdeki etken maddelerle etkileşimlerinin farklı olması aktivite sonuçlarının farklılık göstermesini sağlamıştır.

Toplam fenolik madde içerikleri, gallik asit standart kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğrunun fonksiyonu kullanılarak, fenolik bileşik miktarları gallik asit antioksidan eşdeğeri (GAE $\mu\text{g/ml}$) olarak hesaplandı. Toplam fenolik madde içeriği bakımından çiçek kısmında en yüksek aktiviteye metanol ekstraktının (803 $\mu\text{g/ml}$ GAE) sahip olduğu görüldü. Yaprak kısmında ise en yüksek aktiviteyi etanol ekstraktı (821 $\mu\text{g/ml}$ GAE) gösterdi. Aseton ekstraktlarına bakıldığında yaprağın (758 $\mu\text{g/ml}$ GAE) çiçekten (391 $\mu\text{g/ml}$ GAE) neredeyse iki kat daha yüksek çıktığı tespit edildi. Aynı zamanda yaprak kısmının etanol (827 $\mu\text{g/ml}$ GAE) ve metanol (803 $\mu\text{g/ml}$ GAE) ekstraktlarının aktiviteleri birbirine yakın çıktı. Ayrıca diğer testlerde olduğu gibi hem çiçek (17 $\mu\text{g/ml}$ GAE) hem de yaprak (23 $\mu\text{g/ml}$ GAE) kısmında fenolik madde miktarı en düşük olan hekzan ekstraktı oldu. Genel olarak değerlendirildiğinde bütün ekstraktlarda yaprak kısmının çiçek kısmına göre fenolik içerik bakımından daha zengin olduğu söylenebilir.

Toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesinde, kuersetin standart kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğrunun fonksiyonu kullanılarak numunelerdeki flavonoid bileşik miktarları kuersetin antioksidan eşdeğeri (KAE mg/ml) cinsinden hesaplandı. Toplam flavonoid madde miktarı açısından hem çiçek (0.098 mg/ml KAE) hem de yaprak (0.126 mg/ml KAE) kısmında en yüksek aktiviteye metanol ekstraktının sahip olduğu belirlendi. En düşük aktiviteyi ise diğer testlerde de olduğu gibi çiçek (0.002 mg/ml KAE) ve yaprakta (0.001 mg/ml KAE) hekzan ekstraktı gösterdi. Genel olarak toplam flavonoid madde miktarı bütün çözücüler için değerlendirildiğinde yaprak kısmının çiçek kısmından daha zengin flavonoid içeriğe sahip olduğu görüldü.

Linum mucronatum subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının etanol ekstraktlarının LC-MS/MS ile fenolik içeriklerinin belirlenmesinde 20 tane standart fenolik maddeye (protokatekuik asit, protekateuik aldehit, kafeik asit, vanilin, p-kumarik asit, salisilik asit, p-OH benzoik asit, rutin, kuersetin, kaemferol, oleuropein, ellajik asit, gallik asit, taksifolin, rezveratrol, kateşin, epikateşin, rosmarinik asit, şiringik asit ve ferulik asit) bakıldı. LC-MS/MS cihazı ile belirlenen 20 çeşit fenolik bileşikten, çiçek kısmında protekatekuik asit, kafeik asit, vanilin, p-kumarik asit,

salisilik asit, p-OH benzoik asit, rutin, kuarsetin ve kaemferol olmak üzere 9 tane ve yaprak kısmında kafeik asit, vanilin, p-kumarik asit, rutin ve kuarsetin olmak üzere 5 tane fenolik bileşik tespit edildi. Bu sonuçlara göre hem fenolik bileşik çeşitliliği hem de miktar açısından değerlendirildiğinde çiçek kısmının daha zengin fenolik içeriğe sahip olduğu görüldü. Miktar olarak çiçekte en fazla p-kumarik asit (1.410 µg/ml) ve rutin (1.189 µg/ml), yaprakta ise p-kumarik asit (1.923 µg/ml) bulundu. Hem çiçek hem de yaprak kısmında en fazla miktara sahip fenolik bileşik ise p-kumarik asittir. Ayrıca tespit edilen fenolik bileşiklerin toplam miktarları incelendiğinde bitkinin çiçek kısmının toplam fenolik içeriği 5.496 µg/ml' iken yaprak kısmının 3.028 µg/ml olduğu belirlendi.

Linum mucronatum subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının etanol ekstraktlarının toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde içerikleri LC-MS/MS sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, hem toplam fenolik madde hem de toplam flavonoid madde miktarı açısından yaprak kısmının etanolik ekstraktının çiçek kısmından daha aktif olduğu görülmüştür. Ancak LC-MS/MS cihazı ile belirlenen toplam fenolik içerik, bitkinin çiçek kısmında 5.496 µg/ml miken yaprak kısmında 3.028 µg/ml olarak belirlendi. Yani çiçek kısmının yapraktan hem fenolik bileşik çeşitliliği hem de miktar bakımından daha zengin fenolik içeriğe sahip olduğu görüldü. Bu durum bitkide LC-MS/MS cihazı ile analiz edilen 20 standart fenolik bileşikten farklı bileşiklerinde bulunduğunu göstermektedir.

Linum mucronatum subsp. *armenum* bitkisinin çiçek ve yaprak kısımlarının etanol ekstraktlarının α -glukozidaz enzim inhibisyonu belirlendi. Aynı zamanda karşılaştırma yapmak için farklı konsantrasyonlarda pozitif kontrol olarak akarboz standardı çalışıldı. *Linum mucronatum* subsp. *armenum* bitkisinin yaprak kısmının $IC_{50}=4.533$ mg/ml ve çiçek kısmının $IC_{50}=6.096$ mg/ml olarak hesaplandı. Elde edilen verilerde IC_{50} değeri ne kadar düşük ise enzim inhibisyonunun daha etkili olduğu için yaprak kısmının çiçek kısmına göre enzim inhibisyonunun daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

Yukarıdaki sonuçlara göre *Linum mucronatum* subsp. *armenum* alt türü antioksidan aktivite ve α -glukozidaz enzim inhibisyonu açısından biyolojik aktivite göstermektedir. Bu nedenle *Linum mucronatum* subsp. *armenum* alt türü antibakteriyal, antifungal, sitotoksik ve diğer enzim aktivitleri açısından da değerlendirilerek biyoteknolojik olarak kullanılabilirliğine yönelik çalışmalar gerçekleştirilebilir. Ayrıca ülkemizde zengin bir takson çeşitliliğine sahip olan *Linum* cinsinin diğer türleri, alt türleri ve varyetelerinin biyolojik aktivitlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların da

yapılması literatüre katkı sağlayarak ilaç, gıda vb gibi biyoteknolojik ürünlerin tasarlanmasında yol gösterici olacaktır.



KAYNAKÇA

- Akar, Z. (2021). Chemical compositions by using LC–MS/MS and GC–MS and antioxidant activities of methanolic extracts from leaf and flower parts of *Scabiosa columbaria* subsp. *columbaria* var. *columbaria* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(11), 6639-6644.
- Amin, T. ve Thakur, M. (2014). A Comparative Study on Proximate Composition, Phytochemical Screening, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Linum usitatissimum* L. (flaxseeds). *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(4), 465-481.
- Aniszewski, T. (2007). Alkaloids-secrets of life alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. *Elsevier, Amsterdam*, ss 1–316.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Armutcu, F., Akyol, S., Ustunsoy, S. ve Turan, F. F. (2015). Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects. *Experimental and therapeutic medicine*, 9(5), 1582-1588.
- Assefa, S. T., Yang, E. Y., Chae, S. Y., Song, M., Lee, J., Cho, M. C. ve Jang, S. (2019). Alpha Glucosidase Inhibitory Activities of Plants with Focus on Common Vegetables. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 2. <https://doi.org/10.3390/plants9010002>
- Atak, E., Yıldız, E. ve Uslu, M. (2017). "Fenolik Bileşiklerin Enkapsülasyonu". *Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, 2, 82-92.
- Ayala, A., Muñoz, M. F. ve Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Benalla, W., Bellahcen, S. ve Bnouham, M. (2010). Antidiabetic medicinal plants as a source of alpha glucosidase inhibitors. *Current diabetes reviews*, 6(4), 247-254.
- Benzie, IFF. ve Strain, JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘‘antioxidant power’’: the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70–6.

- Bhat, M., Zinjarde, S. S., Bhargava, S. Y., Kumar, A. R. ve Joshi, B. N. (2011). Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2011, 810207. <https://doi.org/10.1093/ecam/nen040>
- Blanco, A. ve Blanco, G. (2017). *Medical biochemistry*. Academic Press.
- Boo, Y. C. (2019). p-Coumaric acid as an active ingredient in cosmetics: A review focusing on its antimelanogenic effects. *Antioxidants*, 8(8), 275. <https://doi.org/10.3390/antiox8080275>
- Boue, S. M., Cleveland, T. E., Carter-Wientjes, C., Shih, B. Y., Bhatnagar, D., McLachlan, J. M. ve Burow, M. E. (2009). Phytoalexin-enriched functional foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(7), 2614–2622. <https://doi.org/10.1021/jf8040403>
- Boz, H. (2015). p-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(11), 2323-2328.
- Bozdemir, Y. (2007). *Keten tohumu ekstraktında (Linum usitatissimum) Katalaz ve Süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri, Yüksek lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 45.(200484)*.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, ME. ve Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol_LEB*, 28:25–30.
- Breitmaier, E. (2006). Terpenes: Importance, general structure, and biosynthesis. Terpenes: Flavors, fragrances, pharmaca, pheromones, 1, 1-3.
- Buettner G. R. (2011). Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 11(4), 341–346. <https://doi.org/10.2174/187152011795677544>
- Bursal, E. ve Köksal, E. (2011). Evaluation of reducing power and radical scavenging activities of water and ethanol extracts from sumac (*Rhus coriaria* L.). *Food Research International*, 44(7), 2217-2221.
- Cronquist, A. (1968). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. Houghton Mifflin Company, Boston, 396s.
- Dubey, S., Ganeshpurkar A., Ganeshpurkar, A., Bansal, D. ve Dubey, N. (2017). Glycolytic enzyme inhibitory and antiglycation potential of rutin. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 158-162.
- Ekor M. (2014). The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in pharmacology*, 4, 177. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00177>

- Erb, M. ve Kliebenstein, D. J. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant physiology*, 184(1), 39–52. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00433>
- Fedeniuk, R. W. ve Biliaderis, C. G. (1994). Composition and physicochemical properties of linseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(2), 240-247.
- Fieldes, M.A. ve Gerhardt, K.E. (2001). Developmental and genetic regulation of β -glucosidase (linamarase) activity in flax seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 158, 977-989.
- Fliniaux, O., Corbin, C., Ramsay, A., Renouard, S., Beejmohun, V., Doussot, J., . . . Hano, C. (2014). Microwave-assisted extraction of herbacetin diglucoside from flax (*Linum usitatissimum* L.) seed cakes and its quantification using an RP-HPLC-UV system. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(3), 3025–3037.
- Fukumoto, L. R. ve Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3597–3604. <https://doi.org/10.1021/jf000220w>
- Ganesan, S., Raja, S., Sampathkumar, P., Sivakumar, K. ve Thangaradjou, T. (2011). Isolation and screening of α -glucosidase enzyme inhibitor producing marine actinobacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 5(21), 3437-3445. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.583>
- Ghorbani, A. (2017). Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 305-312. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001>
- Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y. (2006). Algal Antioksidanlar, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23, 85–89.
- Göktaş, Ö. ve Gıdık, B. (2019). Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2 (1) , 145-151 .
- Gruia, A., Raba, D. N., Dumbrava, D., Moldovan, C., Bordean, D. ve Mateescu, C. (2012). Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (*Linum usitatissimum* L.) from Romania. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 18(2), 136-140.
- Gwozdziński, K., Pieniazek, A. ve Gwozdziński, L. (2021). Reactive Oxygen Species and Their Involvement in Red Blood Cell Damage in Chronic Kidney Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021: 6639199. <https://doi.org/10.1155/2021/6639199>

- Halfon, B. (2005). *Natural Products Lecture Notes*, Boğaziçi Üniversitesi Basımevi, İstanbul, 975-518251-9.
- Halligudi, N. N. (2012). Pharmacological properties of Flax seeds: A Review.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants - quo vadis?. *Trends in pharmacological sciences*, 32(3), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.12.002>
- Han, H., Yılmaz, H. ve Gülçin, I. (2018). Antioxidant activity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) shell and analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. *Records of Natural Products*, 12(4):397-402. doi:10.25135/rnp.46.17.09.155
- Hano, C., Corbin, C., Drouet, S., Quéro, A., Rombaut, N., Savoie, R., Molinié, R., Thomasset, B., Mesnard, F. ve Lainé, E. (2017). The lignan (+) - secoisolariciresinol extracted from flax hulls is an effective protectant of linseed oil and its emulsion against oxidative damage. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 119:1600219.
- Hano, C., Renouard, S., Molinié, R., Corbin, C., Barakzoy, E., Doussot, J., Lamblin, F. ve Lainé, E. (2013). Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) extract as well as (+)-secoisolariciresinol diglucoside and its mammalian derivatives are potent inhibitors of α -amylase activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(10), 3007–3012. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.029>
- Harborne, J. B ve Simmonds, N.W. (1964). In *Biochemistry of Phenolic Compounds*, s.79 [J. B. Harborne, editor]. London: Academic Press.
- Hassanpour, S., Sadaghian, M., MaheriSis, N., Eshratkhah, B. ve ChaichiSemsari, M. (2011). Effect of condensed tannin on controlling faecal protein excretion in nematode-infected sheep: in vivo study. *Journal of American Science*, 7(5): 896-900.
- Herchi, W., Ammar, K. B., Bouali, I., Abdallah, I. B., Guetet, A. ve Boukhchina, S. (2016). Heating effects on physicochemical characteristics and antioxidant activity of flaxseed hull oil (*Linum usitatissimum* L). *Food Science and Technology*, 36, 97-102.
- Hickey, M ve King, C. (1981). 100 Families of Flowering Plants. *Cambridge University Press*, Cambridge, 636s.

- Hosseinzadeh, H. ve Nassiri-Asl, M. (2014). Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of endocrinological investigation*, 37(9), 783-788.
- Jain, P. K ve Joshi, H. (2012). Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), 236-240.
- Jhala, A. J. ve Hall, L. M. (2010). Flax (*Linum usitatissimum* L.): current uses and future applications. *Aust. J. Basic Appl. Sci*, 4(9), 4304-4312.
- Kajla, P., Sharma, A. ve Sood, D. R. (2015). Flaxseed-a potential functional food source. *Journal of food science and technology*, 52(4), 1857–1871. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1293-y>
- Kalra, S. (2014). Alpha glucosidase inhibitors. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 64(4), 474-476.
- Kang, D. G., keun Yun, C. ve Lee, H. S. (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3), 231-236.
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4 (1): 50-59.
- Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G. ve Alfermann, A. W. (2004). Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin in *Linum* species. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 35(3), 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.01.016>
- Kermasha, S. ve Eskin, M. N. (2021). Selected industrial enzymes. In *Enzymes* (ss. 259-305). Academic Press.
- King, A. A., Shaughnessy, D. T., Mure, K., Leszczynska, J., Ward, W. O., Umbach, D. M., . . . Klein, C. B. (2007). Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. *Mutation research*, 616(1-2), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.022>
- Koulman, A., Konukgil, B. ve Evren, H. (2005). Aryltetralin Lignans, *Linum mucronatum* Bertol. sp. *mukronatum*. *Chem Nat Compd* 41, 30–31.
- Kurutas E. B. (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*, 15(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>
- Laar, F. (2008). α -Glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 4, 1189–1195.

- Lawag, I. L., Aguinaldo, A. M., Naheed, S. ve Mosihuzzaman, M. (2012). α -Glucosidase inhibitory activity of selected Philippine plants. *Journal of ethnopharmacology*, 144(1), 217-219.
- Li, X., Li, J., Dong, S., Li, Y., Wei, L., Zhao, C., ... ve Wang, Y. (2019). Effects of germination on tocopherol, secoisolariciresinol diglucoside, cyanogenic glycosides and antioxidant activities in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *International Journal of Food Science & Technology*, 54(7), 2346-2354.
- Liu, Y., Zhu, J., Yu, J., Chen, X., Zhang, S., Cai, Y. ve Li, L. (2021). A new functionality study of vanillin as the inhibitor for α -glucosidase and its inhibition kinetic mechanism. *Food Chemistry*, 353, 129448. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129448>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. ve Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C. ve Li, J. (2012). p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food Control*, 25(2), 550-554.
- Lu, Y. ve Cederbaum, A. I. (2008). CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free radical biology medicine*, 44(5), 723–738. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.004>
- Lubos, E., Loscalzo, J. ve Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 15(7), 1957–1997. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>
- Magnani, C., Isaac, V. L. B., Correa, M. A. ve Salgado, H. R. N. (2014). Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. *Analytical Methods*, 6(10), 3203-3210.
- Mai, TT., Thu, NN., Tien, PG. ve Chuyen, NV. (2007). Alpha-Glucosidase Inhibitory and Antioxidant Activities of Vietnamese Edible Plants ve Their Relationships with Polyphenol Contents. *Journal of Nutritional Science and Vitaminolgy*, 53(3), 267-276. <https://doi.org/10.3177/jnsv.53.267>
- Makni, M., Chtourou, Y., Garoui, E. M., Boudawara, T. ve Fetoui, H. (2012). Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and DNA damage in rats: protective role of vanillin. *Human & experimental toxicology*, 31(8), 844-852.
- Malik, S., Bíba, O., Grúz, J., Arroo, R. R. J. ve Strnad, M. (2014). Biotechnological approaches for producing aryltetralin lignans from *Linum* species. *Phytochemistry Reviews* 13, 893–913.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. ve Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Manuja, R., Sachdeva, S., Jain, A. ve Chaudhary, J. (2013). A comprehensive review on biological activities of p-hydroxy benzoic acid and its derivatives. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 22(2), 109-115.
- Matejczyk, M., Swislocka, R., Kalinowska, M., Widerskp, G., Lewandowski, W., Jablonska-Trypao, A. ve Rosochacki, S. J. (2017). In vitro evaluation of biological activity of cinnamic, caffeic, ferulic and chlorogenic acids with use of *escherichia coli* k-12 reca: gfp biosensor strain. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 74(3), 801-808.
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L. ve Silva, P. (2020). Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(17), 3809. <https://doi.org/10.3390/molecules25173809>
- Melchior, H. (1964). A. Engler's Syllabus Der Pflanzenfamilien. II.Band. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Nizamlioglu, M.N. ve Nas, S. (2010). Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1(5), 20-35.
- Noreen, H., Semmar, N., Farman, M. ve McCullagh, J.S.O. (2017). Measurement of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Aerial Parts of Medicinal Plant *Coronopus didymus*, *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 792–801.
- Oboh, G., Agunloye, O. M., Adefegha, S. A., Akinyemi, A. J. ve Ademiluyi, A. O. (2015). Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 26(2), 165-170. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2013-0141>
- Osonoi, T., Saito, M., Mochizuki, K., Fukaya, N., Muramatsu, T., Inoue, S., . . . Goda, T. (2010). The α -glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and inflammatory cytokine gene expression in peripheral leukocytes of Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental*, 59(12), 1816–1822.
- Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M. ve Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 55(5), 315–327. <https://doi.org/10.1007/s00005-007-0039-1>

- Pandey, K. B ve Rizvi, S. I. (2009). Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Pei, K., Ou, J., Huang, J. ve Ou, S. (2016). p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2952-2962. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7578>
- Pham-Huy, L. A., He, H. ve Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science : IJBS*, 4(2), 89–96.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B. ve Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Picur, B., Cebrat, M., Zabrocki, J. ve Siemion, I. Z. (2006). Cyclopeptides of *Linum usitatissimum*. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 12(9), 569-574.
- Ramsay A., Fliniaux, O., Quéro, A., Molinié, R., Demailly, H., Hano, C., . . . Kovensky, J. (2017). Kinetics of the incorporation of the main phenolic compounds into the lignan macromolecule during flaxseed development. *Food Chemistry*, 217, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.039>
- Re, R., Pellegrini, N., Protrggente, A., Pannala, A., Yang, M., ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10):1231–1237.
- Rees, M. D., Bottle, S. E., Fairfull-Smith, K. E., Malle, E., Whitelock, J. M. ve Davies, M. J. (2009). Inhibition of myeloperoxidase-mediated hypochlorous acid production by nitroxides. *The Biochemical journal*, 421(1), 79–86. <https://doi.org/10.1042/BJ20090309>
- Rendle, A.B. (1937). *The Classification of Flowering Plants. Dicotyledones*, Cambridge University Press, Cambridge, 662s.
- Ricciotti, E. ve FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(5), 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866-2887. <https://doi.org/10.1021/jf026182t>

- Roberge, C., Fleitz, F., Pollard, D. ve Devine, P. (2007). Synthesis of optically active cyanohydrins from aromatic ketones: evidence of an increased substrate range and inverted stereoselectivity for the hydroxynitrile lyase from *Linum usitatissimum*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18(2-14), 208-214.
- Robertson, K.R. (1971). The Linaceae in the southeastern united states, *Journal of the arnold arboretum*, 52, 649 – 665.
- Robinson P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Saboury, A. A. (2009). Enzyme inhibition and activation: A general theory. *Journal of the Iranian Chemical Society* 6, 219–229. <https://doi.org/10.1007/BF03245829>
- Samadî, A., Carapetian, J., Heidari, R., Jafari, M. ve Hassanzadeh Gorttapeh, A. (2012). Hairy Root Induction in *Linum mucronatum* ssp. *mucronatum*, an Anti-Tumor Lignans Producing Plant. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 125-131. <https://doi.org/10.15835/nbha4017312>
- Schultheiss, N., Roe, M. ve Boerrigter, SX. (2011). Cocrystals of nutraceutical p-coumaric acid with caffeine and theophylline: polymorphism and solid-state stability explored in detail using their crystal graphs. *CrystEngComm*, 13(2), 611-619.
- Seo, E. J., Curtis-Long, M. J., Lee, B. W., Kim, H. Y., Ryu, Y. B., Jeong, T. S., . . . Park, K. H. (2007). Xanthoness from *Cudrania tricuspidata* displaying potent alpha-glucosidase inhibition. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(23), 6421–6424.
- Shahidi, F. ve Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21(9), 1216.
- Shahidi, F. ve Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R.J. ve Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7, 828-835.
- Singh, P., Arif, Y., Bajguz, A. ve Hayat, S. (2021). The role of quercetin in plants. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 166, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.023>
- Slinkard, K ve Singleton, V. L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.

- Smith, J. (2004). Enzyme technology. In Biotechnology (Studies in Biology, ss.76-101). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9781139167215.006
- Sofowora, A., Ogunbodede, E. ve Onayade, A. (2013). The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*, 10(5), 210–229. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.2>
- Souto, A. L., Tavares, J. F., da Silva, M. S., Diniz, M., de Athayde-Filho, P. F. ve Barbosa Filho, J. M. (2011). Anti-inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(10), 8515–8534. <https://doi.org/10.3390/molecules16108515>
- Sultan, Z. (2020). *Linum arboreum* üzerinde farmakognozik çalışmalar (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Taiz, L. ve Zeiger, E. (2008). Bitki Fizyolojisi, Editör: İsmail Türkan. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Taslimi, P ve Gulçin, İ. (2017). Antidiabetic potential: in vitro inhibition effects of some natural phenolic compounds on α -glycosidase and α -amylase enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31, e21956.
- Tiring, G., Satar, S. ve Özkaya, O. (2021). Sekonder Metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35 (1) , 203-215.
- Traber, M. G ve Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*, 43(1): 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024>
- Uçak, İ. ve Afreen, M. (2022). Enzymes, Nutraceutical and Functional Food Components (Second Edition), 537-571.
- URL-1, www.bizimbitkiler.org.tr. 13 Nisa 2021.
- Walker, C. L., Pomatto, L., Tripathi, D. N. ve Davies, K. (2018). Redox Regulation of Homeostasis and Proteostasis in Peroxisomes. *Physiological reviews*, 98(1), 89–115. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2016>
- Walton, N. J., Mayer, M. J. ve Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5), 505-515.
- Wang, H., Qiu, C., Abbasi, A.M., Chen, G., You, L., Li, T., . . . Liu, R.H. (2015). Effect of germination on vitamin C, phenolic compounds and antioxidant activity in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 2545-2553.

- Wang, S., Fu, C. ve Bilal, M. (2018). Enhanced biosynthesis of arbutin by engineering shikimate pathway in *Pseudomonas chlororaphis* P3. *Microb Cell Fact* 17, 174. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1022-8>
- Wei, C., Thakur, K., Liu, D., Zhang, J. ve Wei, Z. (2018). Enzymatic hydrolysis of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein and sensory characterization of Maillard reaction products. *Food chemistry*, 263, 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.120>
- Westcott, N. D. ve Muir, A. D. (2003). Flax seed lignan in disease prevention and health promotion. *Phytochemistry Reviews*, 2, 401–417.
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F. ve Wang, Q. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4), 762. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Yıldız, G., Aktürk, C., Özerkan, M. ve Yılmaz, Ö. (2019). *Linum arboreum* L. (Linaceae) Türünün Antioksidan İçeriği ve Serbest Radikal Süpürücü Aktivitesi. *KSU Tarım ve Doğa Derg* 22 (Ek Sayı 1): 16-23.
- Yılmaz, Ö. (2009). *Türkiye'deki Linum L. (Linaceae) Türleri Üzerinde Taksonomik Araştırmalar, (Doktora Tezi), Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.*
- Yılmaz, Ö., Daşkın, R. ve Kaynak, G. (2011). IUCN categories of three *Linum* L. (Linaceae) taxa endemic to Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 4(1), 144-149.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J. ve Chen, F. (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase. *Food chemistry*, 135(3), 2078–2085.
- Zare, K., Movafeghi, A., Mohammadi, S. A., Asnaashari, S. ve Nazemiyeh, H. (2014). New Phenolics from *Linum mucronatum* subsp. *orientale*. *BioImpacts : BI*, 4(3), 117–122. <https://doi.org/10.15171/bi.2014.004>
- Zorov, D. B., Juhaszova, M. ve Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909–950. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>

ÖZGEÇMİŞ

Orta öğrenimini 2006 yılında Samsun Cumhuriyet Lisesi'nde tamamladıktan sonra. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünü kazandı. 2009 yılında yatay geçiş yaptığı Samsun Ondokuzmayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldu. Bu süreçte Samsun Çocuk Esirgeme Kurumu'nda gönüllü olarak çalıştı. 2012- 2015 yılları arasında Samsun'da özel eğitim kurumlarında çalıştı. 2015-2016 yılları arasında Gümüşhane Milli Eğitim Müdürlüğü'ne bağlı okullarda ücretli öğretmenlik yaptı. 2019 yılında halen devam etmekte olduğu Gümüşhane Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.