

# Yaş ve Kuru Üzümde (*Vitis vinifera L*) Bazı Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

## Determination of Some Antioxidant Enzyme Activities in Fresh and Dry Grapes (*Vitis vinifera L.*)

Halit Demir<sup>1</sup>, Ayhan Güler<sup>2</sup>, Canan Demir<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Van Yüzyüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Van

<sup>2</sup>Hakkari Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Beden Eğitimi ve Spor Anabilim Dalı, Hakkari

<sup>3</sup>Van Yüzyüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Van

### ÖZET

**Amaç:** Meyve ve sebzelerdeki fenolik bileşikler serbest radikalleri ortadan kaldırma yönleriyle çok önemlidir. Fenolik bileşiklerin çoğunun antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri koruduğu bilinmektedir. Hidroksinnamik asitler, flavonoller ve antosiyaninler gibi çeşitli fenolik bileşikler içerdiği bilinen üzüm meyvesinin, yüksek polifenolik içeriğinden dolayı antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bundan dolayı bu çalışmada, üzüm meyvesinde bulunduğu düşünülen bazı enzim aktiviteleri saptandı.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, Ege ve Marmara bölgelerinde yetişen yaş ve kuru üzüm tanesinde bulunan bazı antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesine yönelik olarak temin edilen üzüm ekstraktlarında, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi bazı enzimler spektrofotometrik yöntem ile belirlenerek, antioksidan enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen bulgular istatistik yöntemler kullanılarak analizleri yapılmış ve sonuçları yorumlanmıştır.

**Bulgular:** Yaş üzüm tanesinde süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ortalama olarak Ege ve Marmara bölgelerinde sırasıyla 11,70 U/L, 6,6 U/L, Katalaz (CAT) enzim aktivitesi 6,32 U/L ve 3,82 U/L olarak bulunmuştur. Kuru üzüm tanesinde süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ortalama olarak Ege ve Marmara bölgelerinde sırasıyla 6,05 U/L, 5,05 U/L, Katalaz (CAT) enzim aktivitesi 4,17 U/L ve 3,12 U/L olarak bulunmuştur.

**Sonuç:** Araştırmada elde edilen sonuçlar üzümün önemli bir antioksidan deposu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle araştırma sonucunda, üzümün hem besin olarak hem de insan sağlığı açısından oksidatif strese karşı güçlü bir antioksidan olduğu söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Üzüm, katalaz, süperoksit dismutaz

### ABSTRACT

**Introduction:** Phenolic compounds in fruits and vegetables are very important in terms of eliminating free radicals. Most phenolic compounds are known to have antioxidant activity and can help protect cells against oxidative damage caused by free radicals. Grape fruit, known to contain various phenolic compounds such as hydroxynamic acids, flavonols and anthocyanins has been reported to have antioxidant activity due to its high polyphenolic content. Therefore, in that study, it is aimed to determine some enzyme activities which are thought to be present in grape fruit.

**Methods:** In this study, some antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes were determined by spectrophotometric method in fresh and raisin extracts grown in Aegean and Marmara regions. The findings were analyzed using statistical methods and the results were interpreted.

**Results:** Superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in fresh grape fruits were found to be 11.70, 6.6 U/L in Aegean and Marmara regions, respectively, while catalase (CAT) enzyme activity were found to be 6.32 and 3.82 U/L, respectively. Superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in raisin fruits were found to be 6.05 and 5.05 U/L in Aegean and Marmara regions respectively, while Catalase (CAT) enzyme activity 4.17 and 3.12 U/L, respectively.

**Conclusion:** The results of our study showed that grapes are an important antioxidant store. Therefore, as a result of our research, it can be said that grapes are a powerful antioxidant against oxidative stress both in terms of food and human health.

**Key Words:** Grape, catalase, superoxide dismutase

### Giriş

Asma insanlık tarihinin en eski bitkilerinden biri olup, Türkiye dünya üzüm üretiminin %90'ından fazlasını oluşturan, eski dünya üzümü, Avrupa asması, kültür asması olarak da tanımlanan *Vitis vinifera L.* türünün gen merkezi ve ilk kültüre alındığı coğrafyadır (1).

Yapılan çalışmalarda, üzüm meyvesinin içerdiği vitamin ve mineraller sayesinde kemiklerin güçlenmesinde önemli rol aldığı bildirilmiştir. Literatür çalışmalarında üzüm meyvesinde demir, bakır ve mineral maddelerin yüksek olduğu saptanmıştır. Yine, yapılan çalışmalarda üzüm meyvesinin en önemli faydalarından biri de kalp krizi

riskini azaltmasıdır. Üzüm meyvesi, kan pıhtıları oluşumunu önleyip, kanı sulandırarak, olası kalp krizi ihtimalini düşürdüğü bildirilmiştir. Literatür çalışmalarında üzümün günlük olarak tüketilmesi bazı hastalıkların engellenmesine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir. Kırmızı üzüm üzerinde yapılan çalışmalarda üzüm içerisindeki fenolik maddelerin kardiyovasküler hastalıklara karşı önemli derecede koruyucu etkilerinin olduğu açıklanmıştır (2). Siyah üzüm hem besin olarak hem de geleneksel olarak sıklıkla tüketilen meyveler arasındadır. Hem siyah hem de kırmızı üzüm meyveleri biyoaktif bileşenler bakımından zengindir. Yapılan farklı çalışmalarda, siyah üzüm meyvelerinin özellikle antosiyaninler olmak üzere, flavonoidler ve fenolik asitlerce zengin oldukları bildirilmiştir (3, 4, 5). Meyvelerde bulunan doğal antioksidanların aktivitesine çok dikkat edilmesi gerekir, çünkü potansiyel olarak bu bileşenler oksidatif stres seviyesini azaltabilir (6). Aynı zamanda serbest radikallerin proteinlere zarar vermesini de önler (7, 8). Bu çalışmada, Ege ve Marmara bölgesinde yetişen yaş ve kuru üzüm (*Vitis vinifera* L.) meyvesinden bazı antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

Çalışma için, Ege ve Marmara bölgelerinde yetişen yaş ve kuru üzüm tanesi kullanıldı. Çalışmanın etik onayı için deneysel rat modeli uygulanmadığı için herhangi bir etik onayına ihtiyaç duyulmamıştır. Çünkü doğrudan yaş ve kuru üzüm tanesinden bazı antioksidan enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Bu nedenle, herhangi bir etik kurul onayına gerek duyulmamıştır.

**Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini:** Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, Sun ve ark. (9) çalışmaları metoda göre aktivite ölçümü yapıldı.

### Reaktif Çözeltilerinin Hazırlanışı:

1. 0.3 mM Ksantin: 4.56 mg ksantin (Sigma X7375) önce birkaç damla 1N NaOH de çözüldü ve 100 ml bidistile suda çözüldü.
2. 0.6 mM EDTA: 4.46 mg EDTA 20 ml bidistile suda çözüldü.
3. 150 mg/L NBT: 12.3 mg NBT (Sigma N6876) 100 ml bidistile suda çözüldü.
4. 400 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 2.544 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 60 ml bidistile suda çözüldü.
5. Sığır serum albümin (1g/L): 12 mg BSA (Sigma A2153) 12 ml bidistile suda çözüldü.

Reaktif çözeltinin hazırlanışı: 40 ml ksantin çözeltisi, 20 ml EDTA çözeltisi, 20 ml NBT çözeltisi, 12 ml

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi, 6 ml BSA'yı karıştırıldı.(Koyu renkli bir şişede saklayınız)

- Ksantin oksidaz (167 u/L)(Sigma X1875) enziminden 16 µl alınıp, 1 ml 2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> da çözüldü.

- 2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 2.643 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 ml'ye saf su ile tamamlandı (+4 °C'de muhafaza edildi).

- 0,8 mM CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 13.6 mg CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O hazırlandı, 100 ml'ye saf su ile tamamlandı.

Tablo 1'de belirtildiği gibi pipetlemeler yapıldıktan sonra, kör ve örnek tüpleri 560 nm'de bidistile suya karşı okundu.

**Aktivite Hesabı:** % inhibisyon: [(Kör OD – Numune OD) / Kör OD] x 100

1 Ünite SOD: NBT redüksiyonunu %50 inhibe eden enzim aktivitesidir.

Aktivite= (% inhibisyon) / (50 x 0.1)

Aktivite; U/ml cinsinden hesaplandı.

**Katalaz (CAT) Aktivitesi Tayini:** Hidrojen peroksidin substrat olarak kullanılan bu çalışmada Aeibi (10) yöntemine göre katalaz aktivitesi belirlendi. Aktivite için önce iki tüp alınır kör tüpüne 1.4 ml 30 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilir ve üzerine 0.1 ml fosfat tamponu eklenir. Numune tüpüne ise 1.4 ml 30 mM'lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilir. Üzerine 0.1 ml enzim eklenerek vortexle karıştırıldı. 30 saniye aralıklarla iki defa 240 nm'de absorbanlar okundu ve böylece aktivite tayin edildi.

**Kullanılan çözeltiler:** 1. 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hazırlanışı: 10 ml bidistile suyun içine, % 30'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 34 µl alınarak konuldu (% 35'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 25,8 µl alınarak konuldu).

2. 50 mM Fosfat Tamponunun hazırlanışı: 6.81 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 7.1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bidistile suda çözülerek, tamponun pH'ı 1N NaOH ile 7.4'e ayarlandı ve hacim 1 litreye tamamlandı.

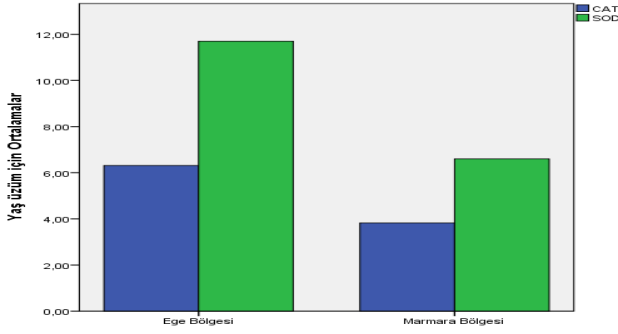
**Aktivite Hesabı:** E.Ü.= (2,3 / Δx) x [ ( log A<sub>1</sub> / log A<sub>2</sub> ) ] Aktivite; U/L cinsinden hesaplandı.

Δx= 30 saniye

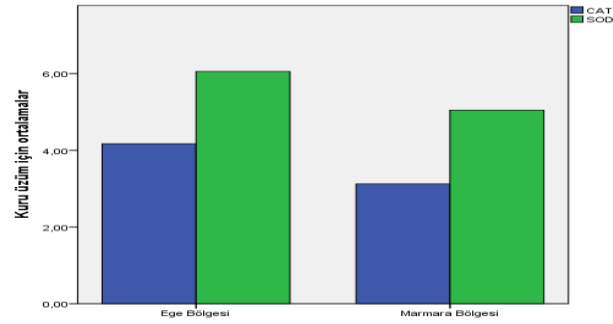
2,3= 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği optik dansite.

**Deney Sonuçları ve İstatistik Analiz:** Verilerin normalliğini test etmek için Shapiro-Wilk ve Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler, ortalama ve standart sapma olarak tanımlandı. Gruplar arasındaki farkları değerlendirmek için Student t test istatistiği kullanıldı. Tüm hesaplamalarda p<0.05 istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi. Ayrıca, hesaplamalar için SPSS istatistik paket programından yararlanıldı.

## Bulgular



**Grafik 1.** Yaş üzüm bakımından CAT ve SOD düzeyleri



**Grafik 2.** Kuru üzüm bakımından CAT ve SOD düzeyleri

## Tartışma

Serbest oksijen radikallerini (SOR), antioksidan savunma sistemleri bloke eder. Serbest radikal tarafından oluşturulan hidroksi radikalleri (HO $\cdot$ ), peroksi radikalleri, superoksit anyonları (O $_2^{\cdot-}$ ) ve hidrojen peroksit (H $_2$ O $_2$ )'in de içerdiği serbest oksijen radikaller (SOR), canlı organizmada sık sık üretilir. SOR'un çok az düzeyi bile, metabolizmayı etkileyerek bir takım hasarlara yol açar. Bu SOR düzeylerinin oluşturdukları hasar sonucu hücre içerisinde oksidatif stres meydana gelir (11, 12).

Antioksidanlar, enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere iki grup altında toplanırlar. Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon S-transferaz (GST) ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD); non-enzimatik antioksidanlar ise vitamin E (tokoferoller), vitamin C (askorbik asit), vitamin A ( $\beta$ -karoten), selenyum, transferin, laktoferrin, ürik asit, glukoz, askorbat, albumin, bilirubin ve seruloplazmindir. Antioksidanlar sıklıkla

intraselüller bazen de ekstraselüller olabilirler (13, 14, 15).

Yapılan çalışmalarda yüksek miktarda fenolik maddelerce zengin meyve ve sebze tüketiminin başta koroner kalp hastalıkları ve kanser gibi hastalıkların azaltılmasında önemli rol oynadıkları bildirilmiştir. Kırmızı ve koyu renkli meyveler, özellikle antosiyaninler olmak üzere yüksek miktarda fenolik maddeler ihtiva etmektedirler. Bu meyvelerin doğal pigmentlerin antioksidan, anti-enflamatuvar, anti-karsinojenik gibi farklı biyolojik etkilere sahip oldukları saptanmıştır (16).

CAT ve SOD için tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2 incelendiğinde Ege bölgesi (yaş ve kuru) ile Marmara bölgesinde yetişen üzüm (yaş ve kuru) bakımından CAT ve SOD aktiviteleri için ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulundu ( $p < 0.05$ ). CAT düzeyi Ege bölgesinde yetişen yaş üzüm için ortalama 6.3153 iken Marmara bölgesinde yetişen yaş üzüm için 3.8240, SOD düzeyi Ege bölgesinde yetişen yaş üzüm için ortalama 11.6960 iken Marmara bölgesinde yetişen yaş üzüm için ortalama 6.6007 olarak bulunmuştur. Ege bölgesinde yetişen yaş üzüm hem CAT hem de SOD düzeyi bakımından Marmara bölgesinde yetişen yaş üzümüne göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde CAT düzeyi Ege bölgesinde yetişen kuru üzüm için ortalama 4.1713 iken Marmara bölgesinde yetişen kuru üzüm için ortalama 3.1233, SOD düzeyi Ege bölgesinde yetişen kuru üzüm için ortalama 6.0520 iken Marmara bölgesinde yetişen kuru üzüm için ortalama 5.0473 olarak bulunmuştur. Ege bölgesinde yetişen kuru üzüm hem CAT hem de SOD düzeyi bakımından Marmara bölgesinde yetişen kuru üzümüne göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Tüm bu araştırmalarda görüldüğü gibi kuru ve yaş üzüm antioksidan enzim açısından oldukça önemli olduğu görülmektedir. Bizim araştırmamızda da Tablo 2 incelendiğinde kuru ve yaş üzüm bakımından CAT ve SOD aktiviteleri için ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ). Yapılan bir araştırmada meyvelerde kararma, esmerleşme olmaması (muz, elma, patates vb) ve antioksidan özelliklerinin kaybolmaması için adaçayı, biberiye, nar kabuğu, yeşil çay gibi farklı bitki ekstraktlarına daldırılmıştır. Bu bitki ekstraktlarındaki antioksidanlar sayesinde, enzimatik esmerleşme ve bozunmalar engellenmiştir (17). Bu çalışma da bitkilerin oksidatif strese karşı raf ömrünü uzatma yönünde antioksidanların faydasını ortaya koymaktadır. Diğer bir önemi ise yapılan bu çalışmalarla ülkemiz

**Tablo 1.** SOD aktivitesi tayin yöntemi

	Kör	Örnek
Reaktif	1.425 µl	1.425 µ
Örnek	-	50 µl
Bidistile	100 µl	-
Ksantin oksidaz	25 µl	25 µl
20 dakika oda sıcaklığında bekletildi		
CuCl <sub>2</sub>	50 µl	50 µl

**Tablo 2.** Tanımlayıcı istatistikler ve Karşılaştırma sonuçları

	Grup	n	Ortalama±standart sapma	p
CAT (U/mI)	Ege	15	6,3153±0,18516	0.001
Yaş üzüm	Marmara	15	3.8240±0.22197	
SOD (U/mI)	Ege	15	11.6960±0.16851	0.001
Yaş üzüm	Marmara	15	6.6007±0.35931	
CAT (U/mI)	Ege	15	4.1713±0.26229	0.001
Kuru üzüm	Marmara	15	3.1233±0.07365	
SOD (U/mI)	Ege	15	6.0520±0.02833	0.001
Kuru üzüm	Marmara	15	5.0473±0.02685	

ürünlerinin hiçbir kimyasal kullanmadan raf ömrünün uzatılması ve insan sağlığını koruma adına önem arz etmesiyle birlikte, ihraç ürünlerimizin de daha rahat satışını sağlayabilmesidir. Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlar üzümün önemli bir antioksidan deposu olduğunu göstermiştir. Bu nedenle araştırmamızın sonucunda, üzümün hem besin olarak hem de insan sağlığı açısından oksidatif strese karşı güçlü bir antioksidan olduğu söylenebilir. Ülkemizin ürün çeşitliliğini düşündüğümüzde, yaptığımız bu araştırmanın, ekonomik bir getirisinin olacağını ve yapılacak diğer araştırmalara da öncü olacağı inancını taşımaktayız.

## Kaynaklar

- Kunter B, Keskin N. Üzümün Antioksidan ve Ayurvedik Önemi. Uluslararası Avrasya Doğal Beslenme ve Sağlıklı Yaşam Zirvesi 2018; 382-387.
- Keskin N, Çavuşoğlu Ş, Türkoğlu N, Özrenk K, Kunter B. Siirt ili asma gen kaynakları içerisinde öne çıkan bazı yerli üzüm çeşitlerinin toplam fenolik ve antioksidan içerikleri. Bahçe 2018; 47: 326-330.
- Yang J, Martinson TE, Liu RH. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. Food Chemistry 2009; 116: 332-339.
- Baiano A, Terracone C. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant activities of seven table grape cultivars grown in the south of Italy based on chemometrics. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011; 59: 9815-9826.
- Keskin N. Multidimensional scaling (MDS) to visual representation of proximities for quality and phytochemical characteristics in *Vitis vinifera* L. cv. 'Ercis'. Progress in Nutrition 2017; 19: 305-311. Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J Agriculture and Food Chemistry* 2005; 53: 2928-2935.
- Isabelle M, Lee BL, Lim MT, Koh WP, Huang D, Ong CN. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. *Food Chemistry* 2010; 123: 77-84.
- Shian TE, Abdullah A, Musa KH, Maskat MY, Ghani MA. Antioxidant Properties of Three Banana Cultivars (*Musa acuminata* 'Berangan', 'Mas' and 'Raja') Extracts. Sains Malaysiana 2012; 41(3): 319-324.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin. Chem 1988; 34: 497-500.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. In: Allbritton NL, Kavarik ML, Editors. Methods In Enzymology. Orlando. Academic Press; 1984. p. 121-126.
- Canbay E, Çelik K, Dökmetaş S, Karadayı K, Turan M, Keleştemur F ve ark. Tiroid Kanseri Hastalarda Değişen Antioksidan Enzim Aktivitesi ve Lipid Peroksidasyonu. C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, 2003; 25 (4): 151-156.
- Gürgöze S, Şahin T, Durak MH. Memelilerde Ortalama Yaşam Süresi ve Yaşlanma Sürecinde Serbest Radikallerin Rolü. İstanbul Üniv Vet

- Fak Derg 2007; 33 (1): 43-49.
12. Yarıktaş M, Döner F, Doğru H, Aynalı G, Yönden Z, Delibaş N. Baş- Boyun Maling Tümörlerinde Malondialdehit Düzeyleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri. S.D.Ü Tıp Fakültesi Dergisi, 2003; 10(4): 65-67.
  13. Tosun D, Karadeniz B, Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi. OMÜ Zir Fak Dergisi 2005; 20(1): 78-83.
  14. Yüce A, Aksakal M. Ratların Karaciğer ve Testis Dokusundaki Antioksidan Aktivite Üzerine Nar Suyunun Etkisi. F Ü Sağlık Bilimleri Dergisi. 2007; 21(6): 253–256.
  15. Weisel T, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Stockis JP et al. Ananthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. Biotechnology Journal 2006; 1: 388-397.
  16. Numanoğlu EN, Çelik AG. Antioksidantların Enzimatik Esmerleşme Üzerine Etkileri. Bilim Armonisi. 2018; 1: 3-9.