

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ESANSİYEL YAĞ BİLEŞENLERİNİN *ESCHERICHIA COLI*
VE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ÜZERİNDEKİ
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU GÖZETİCİ

BOLU, TEMMUZ - 2017

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



ESANSİYEL YAĞ BİLEŞENLERİNİN *ESCHERICHIA COLI*
VE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ÜZERİNDEKİ
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU GÖZETİCİ

BOLU, TEMMUZ - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ebru GÖZETİCİ tarafından hazırlanan “ESANSİYEL YAĞ BİLEŞENLERİNİN *ESCHERICHIA COLI* VE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ” adlı tez çalışması Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda 27.07.2017 tarihinde Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Danışman
Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR
Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Doç. Dr. Semra TURAN
Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Üye
Yrd. Doç. Dr. Gökçe POLAT YEMİŞ
Sakarya Üniversitesi

İmza


.....

.....

.....

27.07.2017

Prof.Dr. Duran KARAKAŞ



Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



Aileme,

ETİK BEYAN

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.

Ebru GÖZETİCİ

ÖZET

**ESANSİYEL YAĞ BİLEŞENLERİNİN *ESCHERICHIA COLI* VE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
EBRU GÖZETİCİ
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)**

BOLU, TEMMUZ - 2017

Esansiyel yağlar antimikrobiyal özellikler gösteren aromatik ve uçucu sıvılardır. Esansiyel yağlar ve bileşenleri antibakteriyel, antiparaziter, insektisidal, antiviral, antifungal, antikanser ve antioksidan aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir. Olumsuz tüketici görüşüne sahip sentetik koruyuculara karşı etkili bir alternatif olarak gıda muhafazasında önemli bir rol oynamaktadırlar. Ancak yeni uygulamalar için, esansiyel yağların ve bileşenlerinin çözünürlüğü, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), hedef mikroorganizmaya etkileri ve sinerjistik/antagonistik etkileşimleri hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, bu araştırmada ocimene, geraniol, sitral, geraniol asetat, mentol, menton, mentil asetat, p-çimen, timol, öjenol, estragol (4-allylanisole), sinamil alkol, sinnamaldehit, α -pinen, kamfor, ökaliptol (1,8-sineol) ve borneol olmak üzere onyediy esansiyel yağ bileşeni üzerine çalışılmıştır. Araştırmada ilk aşamada, sürfaktan ve/veya çözücü kullanarak esansiyel yağ bileşenlerinin sıvı besiyerindeki maksimum çözünebilir konsantrasyonu belirlenmiştir. Daha sonra, bu bileşenlerin Gram (-) bakterileri için model organizma olarak seçilmiş *Escherichia coli* (3 suş) ve Gram (+) bakterileri için model organizma olarak seçilmiş *Staphylococcus aureus* (3 suş)'a karşı *in vitro* antimikrobiyal duyarlılık testleri uygulanmıştır. Bu bileşenlerden bazıları olan geraniol (11,25 mM), sitral (13,5 mM) ve sinnamaldehit (14,4 mM) bireysel olarak uygulandığında test edilen *S. aureus* ve *E. coli*'nin tüm suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Geraniol *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı en etkili esansiyel yağ bileşeni olarak tespit edilmiştir. Sinnamaldehit ve p-çimen kombinasyonu test edilmiş tüm bakterilere karşı antagonistik etki göstermemiştir. *S. aureus* LMG8224 ve *E. coli* JG33 suşlarının, sinnamaldehit ve öjenol kombinasyonuna karşı ilaveli ya da sinerjistik etkili olabileceği belirlenmiştir. Aynı kombinasyon *E. coli* ve *S. aureus*'un diğer test edilmiş suşlarına karşı antagonistik etki göstermemiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Esansiyel Yağ Bileşenleri, Çözünürlük, Antimikrobiyal Aktivite, Kombinasyon Etkisi

ABSTRACT

THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL COMPOUNDS AGAINST *ESCHERICHIA COLI* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

MSC THESIS
EBRU GÖZETİCİ
ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF
NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING
(SUPERVISOR: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)

BOLU, JULY 2017

Essential oils (EOs) are aromatic and volatile liquids with antimicrobial properties. EOs or their compounds have been shown antibacterial, antiparasitic, insecticidal, antiviral, antifungal, anticancer and antioxidant activities. In the food industry, they play an important role in food preservation as effective alternatives or complements to synthetic preservatives which have a negative consumer perception. However, new applications require more knowledge about the solubility and the minimum inhibitory concentration (MIC) of EOs and their compounds, the effect of the individual compounds on target microorganisms as well as synergistic/antagonistic interactions between compounds. In order to fill this knowledge gap, this thesis focused on seventeen pure compounds of essential oil (EO): ocimene, geraniol, citral, geranyl asetat, menthol, menthone, menthyl asetat, p-cymene, thymol, eugenol, estragole (4-allylanisole), cinnamyl alkol, cinnamaldehyde, α -pinene, camphor, eucalyptol (1,8-cineole) and borneol. More specifically, maximum soluble concentrations of pure EO compounds supplemented with surfactant and/or solvent in a water based broth was first tested. Furthermore, their antimicrobial activity was investigated *in vitro* using a growth inhibition assay against *Escherichia coli* (3 strains), as model organism for the Gram (-) bacteria and against *Staphylococcus aureus* (3 strains) as model organism for the Gram (+) bacteria. Some of these compounds such as geraniol (11,25 mM), citral (13,5 mM) and cinnamaldehyde (14,4 mM) expressed antibacterial activity against all tested strains of *S. aureus* and *E. coli* when they are applied as single compounds. Geraniol was a more effective EO compound against *S. aureus* than *E. coli*. The combination of cinnamaldehyde and p-cymene did not show antagonistic effect towards all tested bacteria. The interaction between cinnamaldehyde and eugenol could be an additive or synergistic effect against *S. aureus* LMG8224, which was the most susceptible bacterium to this combination, and *E. coli* JG33. The interaction of the same combination against other tested strains of *E. coli* and *S. aureus* was non-antagonism.

KEYWORDS: Essential Oil Compounds, Antimicrobial Activity, Solubility, Combination Interactions

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI.....	4
2.1 Esansiyel Yağların Kimyasal Bileşimi	4
2.1.1 Terpenler	6
2.1.2 Terpenoitler.....	7
2.1.3 Fenilpropenler	8
2.1.4 Diğer Esansiyel Yağlar	8
2.2 Esansiyel Yağların ve/veya Bileşenlerinin Bakterilere Karşı Aktivitesi9	
2.2.1 Esansiyel Yağların ve/veya Bileşenlerinin Bakterilere Karşı	
Antimikrobiyal Etki Mekanizması	9
2.2.2 Gram (+) ve Gram (-) Bakteriler Üzerindeki Aktivite Farklılıkları12	
2.3 Esansiyel Yağ Bileşenleri Arasındaki Sinerjistik, İlaveli ve Antagonistik	
Etkileşimler	13
2.4 Esansiyel Yağlar ve Bileşenlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerini	
Etkileyen Faktörler	20
2.5 Esansiyel Yağların Gıda Model Sistemlerindeki Antimikrobiyal	
Aktivitesi	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1 Besiyerleri ve Kimyasallar	24
3.2 Bakteriyel Suşlar ve Kültür İnokülasyonu	24
3.3 Seçilen Esansiyel Yağ Bileşenleri	25
3.3.1 Antimikrobiyal Ajanların Hazırlanması	27
3.4 McFarland Standart Çözeltisinin Hazırlanması.....	27
3.5 İnokülüm Hazırlanması ve İnokülasyon.....	28
3.6 Mikrotiter Plakadaki Gelişim İnhibisyonunun Kantitatif Tahminlenmesi	
29	
3.7 Dama Tahtası Analizi	30
3.7.1 Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyon İndeksi (FİKİ)	34
3.8 İstatistiksel Analizler	35

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1 Seçilen Esansiyel Yağ Bileşenlerinin Çözündükleri En Yüksek Konsantrasyonlar	36
4.2 Esansiyel Yağ Bileşenlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin in vitro Değerlendirmesi	40
4.2.1 Sürfaktan ve/veya Çözgenin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	40
4.2.2 Terpenlerin Antimikrobiyal Aktivitesi	42
4.2.3 Terpenoitlerin Antimikrobiyal Aktivitesi	44
4.2.4 Fenilpropenlerin Antimikrobiyal Aktivitesi	51
4.3 Esansiyel Yağ Bileşenleri Arasındaki Etkileşimler.....	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
6. KAYNAKLAR.....	61
7. EKLER.....	70

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Seçilen esansiyel yağ bileşenlerinin kimyasal yapıları.....	5
Şekil 2.2. İzopirenin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.3. Bazı esansiyel yağların kimyasal yapısı	7
Şekil 2.4. Esansiyel yağ bileşenlerinin hedef bölgeleri ve etki mekanizmaları..	9
Şekil 2.5. Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin hücre duvarı yapısı	12
Şekil 3.1. Mikrobiyal gelişim inhibisyon analizi deney seti	30
Şekil 3.2. Dama tahtası analizinin deneysel tasarımı.....	32
Şekil 4.1. Etanol, Tween 80 ve/veya DMSO maddelerinin antimikrobiyal etkisi	41
Şekil 4.2. p-çimenin antimikrobiyal etkisi	42
Şekil 4.3. Geraniolün antimikrobiyal aktivitesi	45
Şekil 4.4. Sitralin antimikrobiyal aktivitesi	47
Şekil 4.5. Timolün antimikrobiyal aktivitesi	49
Şekil 4.6. Mentolün antimikrobiyal aktivitesi.....	50
Şekil 4.7. Sinnamaldehitin antimikrobiyal aktivitesi.....	52

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Esansiyel yağ bileşenleri ile bazı mikroorganizmalar arasındaki in vitro etkileşimler	17
Çizelge 2.2. Literatürdeki FİKİ değerlerinin karşılaştırılması.....	20
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların listesi	25
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan esansiyel yağ bileşenlerinin özellikleri	26
Çizelge 3.3. Denemelerde kullanılan esansiyel yağ bileşenlerinin farklı kombinasyonlardaki son konsantrasyonları	33
Çizelge 4.1. Sıvı besiyerindeki esansiyel yağ bileşenlerinin çözündükleri en yüksek konsantrasyonlarının deneysel verileri	37
Çizelge 4.2. Esansiyel yağ bileşenlerinin farklı bakteri suşlarına karşı tekli MİK değerleri ile kombinasyonlarının FİKİ değerleri.....	55

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince desteklerini benden esirgemeyen ve yazım aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim Çakır'a teşekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarımı Ghent Üniversitesi'nde yapma şansı tanıyan Prof. dr. ir. Katleen Raes'e kıymetli rehberliği, profesyonel tecrübesi ve öngörüsünden dolayı teşekkür ederim. Tavsiyeleri, yapıcı yorumları ve tezimin kontrolünde yol gösteren doktora öğrencisi Elien Van de Vel'e de teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olup destekleri ile çalışmamı sonlandırmama katkıda bulunan değerli iş arkadaşım Araştırma ve Geliştirme Uzmanı Özer Atıl'a en içten teşekkürlerimi iletirim. Yüksek lisans stajım ve tezimdaki desteklerinden dolayı Son Nguyen Huu'ya şükranlarımı bir borç bilirim. Başta sevgili arkadaşlarım Pınar Özdemir ve Seda Fidan olmak üzere tez çalışmam boyunca bana moral veren ve desteklerini esirgemeyen tüm dostlarıma da teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olup bana güvenen ve maddi manevi her konuda beni destekleyen sevgili Aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ebru GÖZETİCİ

Temmuz 2017, Bolu

1. GİRİŞ

Uçucu ve eterik yağlar olarak da adlandırılan esansiyel yağlar, doğal, uçucu, aromatik bitki materyallerinden ekstrakte edilen kompleks karışımlardır. Kuvvetli kokulu olan bu yağlar, aromatik bitkiler tarafından ikincil metabolitler olarak üretilir (Bakkali vd., 2008). Esansiyel yağlar sıvı, berrak, nadiren renkli, organik çözücülerde ve yağlarda çözünebilirler (Nazzaro vd., 2013). Günümüzde bilinen yaklaşık 3000 esansiyel yağdan 300 kadarı aroma ve kozmetik sanayisinde ticari öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Burt, 2004).

Esansiyel yağlar bütün bitki organlarından (tomurcuk, çiçek, yaprak, tohum, kabuk, dal, sap, meyve, kök ve ağaç kabuğundan) sentezlenebilir ve genellikle salgı hücreleri, kovuklar, kanallar, epidermik hücreler ya da glandüler tüylerde depolanırlar (Hyldgaard vd., 2012; Nazzaro vd., 2013). Geleneksel ilaçların önemli bir kısmını oluşturan esansiyel yağlar, genelde Akdeniz Bölgesi ve tropik ülkelerde yetişen çeşitli aromatik bitkilerden kolaylıkla izole edilebilir (Bakkali vd., 2008; Nazzaro vd., 2013). Soğuk presleme, destilasyon, çözücü ekstraksiyonu (mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon gibi) çeşitli yöntemler uygulanarak elde edilebilmektedir (Burt, 2004; Jocelyn Paré vd., 1994).

Esansiyel yağlar doğada bitki savunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu yağlar bazı böcekleri, polenlerin ve tohumların yayılması için teşvik etmekte ya da istenmeyen böcekleri uzaklaştırabilmektedir. Böylelikle, bitkilerin çevre ile ilişkilerinin bağdaştırılmasında önemli rol oynamaktadırlar (Bakkali vd., 2008; Nazzaro vd., 2013). Esansiyel yağlar, bakterisidal, virusidal, fungusidal, antiparazital, insektisidal, tıbbi ve kozmetik amaçlı olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sadece antiseptik özellikler göstermeyen bu esansiyel yağların aynı zamanda antioksidan aktiviteye de sahip oldukları bildirilmiştir (Bakkali vd., 2008). Esansiyel yağlar ve bileşenleri özellikle mikroorganizmaların sitoplazması ve membranı üzerinde etki göstermektedir (Nazzaro vd., 2013).

Esansiyel yağlar, farklı biyosentetik kaynaklardan ve çeşitli kimyasal yapılardan oluşan bileşenlerin kompleks karışımlarıdır. Başlıca gruplar olarak: Terpenler (çoğunlukla monoterpen ve seskiterpenler), terpenoitler, fenol türevi aromatik fenilpropenler ve diğer esansiyel yağ bileşenleri sayılabilir (Hyldgaard vd., 2012).

Günümüzde tüketicilerin daha az işlenmiş, doğal, yüksek yağ, tuz ya da şeker içeriği olmayan sağlıklı gıdalara eğilimi artmış bulunmaktadır. Bakteri gelişimini inhibe edip, raf ömrünü uzatan sentetik kimyasal koruyucular endüstride sürekli kullanılmaktadır. Ancak temiz etiket (clean label) olan ürünleri tercih eden tüketicilerin, bu sentetik katkı maddelerine karşı olumsuz bir algısı bulunmaktadır (Seow vd., 2014). Aslında mikroorganizmalar geleneksel kimyasallara ve ilaçlara karşı direnç kazanmıştır ve bu da dünya çapında bir problem olarak bilinmektedir. Araştırmacılar, kimyasal sanayinin sentetik koruyucularını kullanmaktan ziyade doğal alternatiflerin araştırılması konusunda teşvik edilmektedir (Nazzaro vd., 2013). Bundan dolayı, antimikrobiyal aktivite gösteren bu esansiyel yağlar ve bileşenleri, gıda endüstrisi için iyi bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

Esansiyel yağlar kullanılarak yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmaları farklılık göstermektedir. Çünkü bu çalışmaların sonuçlarının bazıları, mikroorganizmalara karşı etkili bir esansiyel yağ olduğunu gösterirken; diğerleri aynı sonucu göstermeyebilmektedir. Doğal yağların antimikrobiyal aktivitesi üzerine birçok çalışma bulunmaktadır (Goñi vd., 2009; Hili vd., 1997), ancak bu sonuçların çoğu tartışmaları da beraberinde getirmektedir. Çünkü yapılan çalışmalarda esansiyel yağ bileşenlerinin net bileşimi her zaman belirtilmemekte, bileşenler arasında oluşan sinerjistik veya antogonistik etkiler dikkate alınmamakta ve ayrıca esansiyel yağların sıvı besiyerinde çözünürlüğü güçlkle tanımlanmaktadır. Diğer taraftan, esansiyel yağların antimikrobiyal aktivite deneylerindeki konsantrasyonları ve uygulanan koşullar çalışmaya göre farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca, esansiyel yağların bileşimi değişebilmekte bu da yağların etki şeklinin araştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bunun sonucu olarak, ticari esansiyel yağların uygulanması üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır.

Bu bilgiler ışığında, tez çalışmasında esansiyel yağlarda bulunan bileşenler üzerine yoğunlaşmıştır. Esansiyel yağların başlıca kimyasal sınıflarından olan bileşenler seçilmiş; Gram (-) bakteriler için model organizma olarak 3 adet *Escherichia coli* suşuna ve Gram (+) bakteriler için model organizma olarak da 3 adet *Staphylococcus aureus* suşuna karşı antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Bununla birlikte, esansiyel yağ bileşenlerinin muhtemel sinerjistik ya da antagonistik etkileri de araştırılmıştır.

Bu çalışmanın spesifik hedefleri şunlardır:

1. Esansiyel yağlarda bulunan farklı bileşenlerin sıvı besiyerinde çözündükleri en yüksek konsantrasyonu tespit etmek.
2. Bakteriyel gelişme inhibisyonu analizini uygulayarak, esansiyel yağ bileşenlerinin iki model bakteri olan *E. coli* ve *S. aureus* 'a karşı antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmek.
3. Dama tahtası yöntemini kullanarak, bazı esansiyel yağ bileşenlerinin sinerjistik, ilaveli veya antagonistik etkileşimlerinin her iki model bakteri üzerindeki etkileri araştırmak.

2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI

2.1 Esansiyel Yağların Kimyasal Bileşimi

Esansiyel yağlar herbiri farklı konsantrasyonlarda olmak üzere 45 çeşide kadar bileşenden oluşan kompleks karışımlardır (Hyldgaard vd., 2012). Esansiyel yağ bileşenleri düşük molekül ağırlığına ve farklı antimikrobiyal aktiviteye sahip genellikle sudan daha düşük yoğunlukta karakterize edilen geniş bir gruptur. Kimyasal yapılarına bağlı olarak dört aktif grup içermektedirler; terpenler, terpenoitler, fenilpropenler ve diğerleri (Şekil 2.1.) (Hyldgaard vd., 2012).

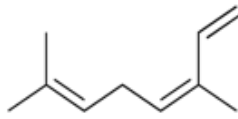
Doğal uçucu yağlar iz miktarda bulunan bileşenlere göre daha yüksek konsantrasyonlarda (%20-70) iki veya üç temel bileşenden oluşmaktadırlar. Örnek olarak timol (%27) *Origanum compactum* esansiyel yağının, kamfor (%24) *Artemisia herba-alba* esansiyel yağının, ökaliptol (1,8-sineol) (%50) *Cinnamomum kamfor* esansiyel yağının, ve mentol (%59) ve menton (%19) *Mentha piperita* (*Mentha x piperita*) esansiyel yağının temel bileşenleridir (Bakkali vd., 2008). Minör bileşenler de antimikrobiyal aktiviteye diğer bileşenlerle sinerjik etki göstererek katkıda bulunabilmektedir. Ayrıca, çiçek açma zamanında veya hemen sonrasında hasat edilen bitkilerden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesi en yüksek olduğu bilinmektedir (Burt, 2004).

Esansiyel yağların antimikrobiyal etkisi sadece farklı bileşenlere sahip olmasının dışında bu bileşenlerin farklı oranlarda ve farklı stereoizomerlere sahip olmasına göre değişmektedir. Bu faktörleri çeşitli çevresel faktörler etkilemektedir. Hasat zamanı ve coğrafi koşullara bağlı olarak aynı kaynaktan alınmış olsa da esansiyel yağlar farklı kimyasal bileşime sahip olabilmektedirler (Burt, 2004). Tarımsal geçmiş, tür farklılıkları, bitkinin olgunluğu da bileşen kompozisyonlarında farklılıklara sebep olabilmektedir (Holley ve Patel, 2005). Bitkinin farklı bölümlerinden alınan esansiyel yağların bileşimleri bile çok büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Örnek olarak, kişniş (*Coriandrum sativum* L.) tohumu ve yaprağından ekstrakte edilen esansiyel yağların oldukça farklı bileşime sahip oldukları bildirilmiştir (Delaquis vd., 2002). Esansiyel yağ bileşenlerinin enantiyomerleri farklı

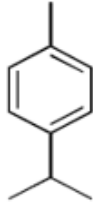
boyutlarda antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Lis-Balcin vd., 1999). Ayrıca, farklı ekstraksiyon yöntemleri de esansiyel yağların farklı bileşenlere sahip olmasında etkilidir (Burt, 2004).

Terpenler

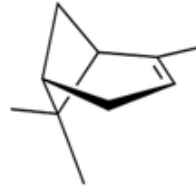
Ocimene



p-çimen

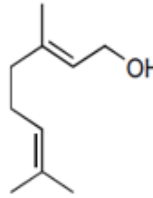


α -pinen

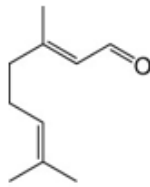


Terpenoitler

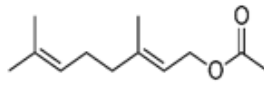
Geraniol



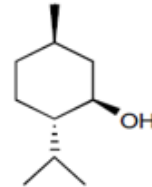
Sitral



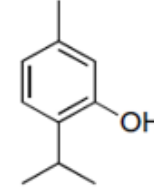
Geraniil asetat



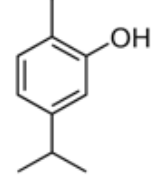
Mentol



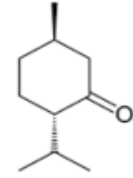
Timol



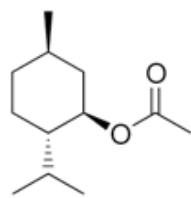
Karvakrol



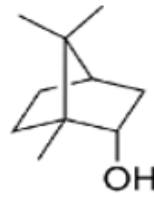
Menton



Mentil asetat



Borneol



Kamfor

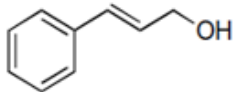


Ökalyptol

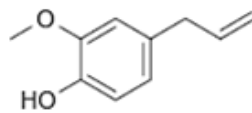


Fenilpropenler

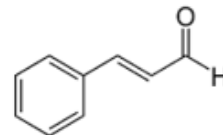
Sinamil alkol



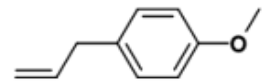
Öjenol



Sinnamaldehyt



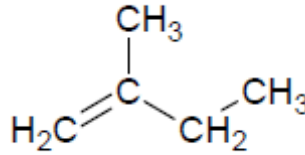
Estragol



Şekil 2.1. Seçilen esansiyel yağ bileşenlerinin kimyasal yapıları

2.1.1 Terpenler

Terpenler, izopiren (C₅) olarak adlandırılan birçok beş karbonlu ünitelerin farklı kombinasyonlarından oluşan hidrokarbonlardır (Şekil 2.2.). Bitki hücrelerinin sitoplazmasında sentezlenip, asetil-CoA'dan başlayan mevalonik asit yolunu takip etmektedir. Terpenler, siklaz tarafından halkalı yapıya dönüştürülen hidrokarbon omurgaya sahip olduğu bildirilmiştir. Böylece tek halkalı veya iki halkalı yapılar oluşturulmaktadır. Monoterpen (C₁₀) ve seskuiterpen (C₁₅) en çok bulunan terpenler olup, hemiterpenler (C₅), diterpenler (C₂₀), triterpenler (C₃₀) ve tetraterpenler (C₄₀) de bitki hücresinde bulunan diğer terpenlerdir (Nazzaro vd., 2013).



Şekil 2.2. İzopirenin kimyasal yapısı

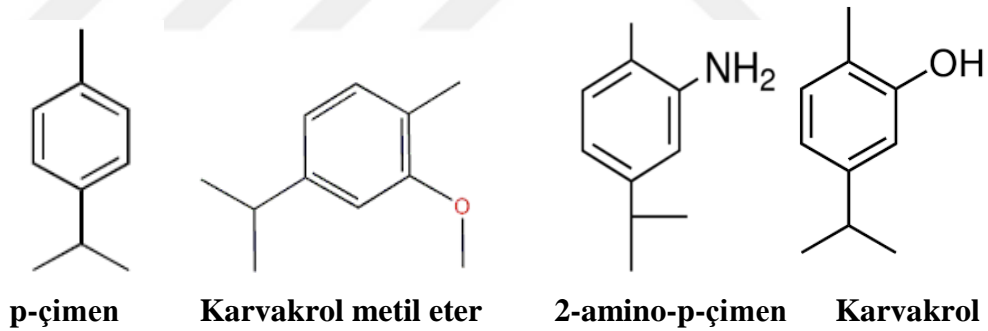
Seskuiterpenler üç adet izopirenin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Zincirlerin uzamasıyla siklasyon sayısını arttırır ve yüksek molekül yapısına sahip olmaktadır. Monoterpenlerin ve seskuiterpenlerin yapısı ve fonksiyonları benzerdir (Bakkali vd., 2008).

En çok bilinen terpen olan p-çimen, yan zincirlerinde hiçbir fonksiyonel grup içermeyen benzen halkası olup karvakrolün öncü bileşenidir. Terpenlerin çoğu yüksek antimikrobiyal aktivite göstermemektedir. *In vitro* çalışmaların sonucunda da tek başlarına kullanıldıklarında antimikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir.

2.1.2 Terpenoitler

Terpenoitler, terpenlerin özel enzimler ile oksijen molekülü eklenmesi, metil grubunun uzaklaştırılması veya yerinin değiştirilmesi ile meydana gelen biyokimyasal modifikasyonlar sonucunda oluşturulmaktadır. Terpenoitler, esterler, alkoller, aldehitler, eterler, ketonlar, fenoller ve epoksiler olarak altgruplarına ayrılabilirler. Timol, mentol, karvakrol ve geraniol en çok bilinen ve yaygın olan terpenoitlerdir (Hyldgaard vd., 2012).

Terpenoitlerin antimikrobiyal etkileri hidroksil grubu gibi fonksiyonel gruplara ve delokalize elektronların varlığına göre değişmektedir. Örnek olarak, karvakrol benzeri bileşenler, p-çimen ve karvakrol metil eter, hidroksi grubu içeren karvakrole göre daha düşük antimikrobiyal etki göstermektedir (Şekil 2.3.) (Ben Arfa vd., 2006; Ultee vd., 2002). Karvakroldeki hidroksil grubunun metil eter ile yer değiştirmesi antimikrobiyal aktivitesi, hidrofobik özelliği ve halka yapısı üzerinde değişiklikler yapıp bakteri hücresi ile olan etkileşimini değiştirmektedir (Veldhuizen vd., 2006).



Şekil 2.3. Bazı esansiyel yağların kimyasal yapısı

Karvakrol ve p-çimen benzer hidrofobik özellik ve kimyasal yapı göstermektedir (Şekil 3). Ancak karvakrol, 2-amino-p-çimen kıyasla hidroksil grubunun etki mekanizmasının öneminden dolayı daha yüksek antimikrobiyal etki göstermektedir (Veldhuizen vd., 2006). Timol ve karvakroldeki hidroksil grupları farklı pozisyonlarda olmasına rağmen, *S. aureus*, *Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde benzer antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Lambert vd, 2001; Ultee vd., 2002). Hidroksil grubunun pozisyonunun

antimikrobiyal aktiviteye etki etmemesinin mümkün olabileceği bildirilmiştir (Dorman ve Deans, 2000). Sonuç olarak terpenoitler oldukça geniş aralıktaki mikroorganizmalar üzerinde yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Kimyasal yapıları terpenler ile benzerlik göstermesine rağmen antimikrobiyal aktivitesinin terpenlere oranla yüksek olmasının sebebi yapılarındaki fonksiyonel gruplardır (Hyldgaard vd., 2012).

2.1.3 Fenilpropenler

Fenilpropenler altı karbonlu aromatik fenil grubu ve fenilpropanoit biyosentezinin ilk aşamasında oluşan ve sinamik asit kısmına bağlı üç karbonlu propen dalı içerdiği için böyle isimlendirilmişlerdir. Fenilpropenler, bitkilerdeki aminoasit öncüsü fenilalaninden sentezlenen fenilpropanoit isimli organik bileşenlerin alt grubunda yer alırlar. Genel olarak esansiyel yağlar, fenilpropen grubundan az miktarda bileşene sahip olduğu bildirilmiştir (Hyldgaard vd., 2012). Yaygın olarak fenilpropenlere örnek olarak sinamaldehit ve öjenol gösterilmektedir.

Öjenol ve izo öjenol gibi kimyasal olarak benzer moleküller bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösteren serbest hidroksil grubu içermektedir. Ayrıca, fenilpropenlerin antimikrobiyal aktivitesi aromatik halkadaki değişimlerin tipi ve sayısı ile bağdaştırılmaktadır (Hyldgaard vd., 2012).

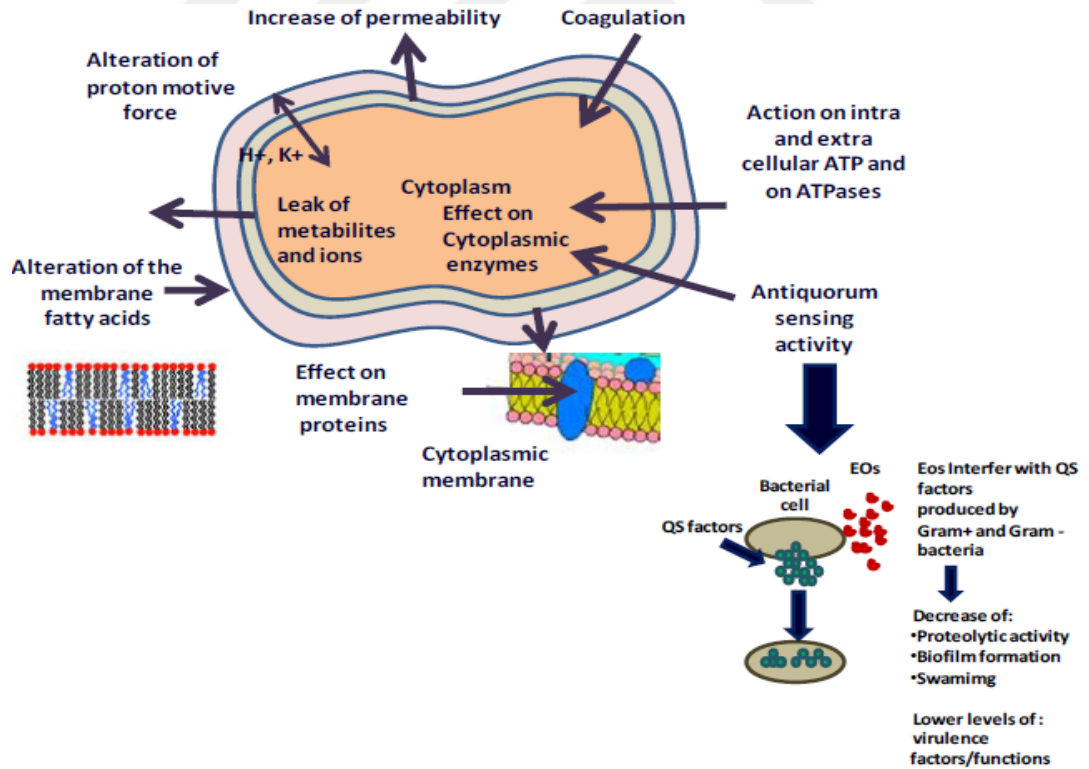
2.1.4 Diğer Esansiyel Yağlar

Esansiyel yağlarda doymamış yağ asitleri, laktonlar, terpenler, glikozitlerden oluşan bozunma ürünleri ile bitkilerin ikincil metabolizma ürünü olan kükürt ve azot içeren bileşenler bulunmaktadır (Hyldgaard vd., 2012). Allisin (diallil tiyosülfanat) ve izotiyosiyanat kükürt ve azot içeren antimikrobiyal bileşenlerdendir. Sarımsakta bulunan allisin topraktaki mikroorganizmalara karşı potansiyel bir doğal savunma mekanizmasıdır (Ankri ve Mirelman, 1999). Hardal esansiyel yağı temel bileşen olarak izotiyosiyanat içermekte, hardal, brokoli, yaban turpu, lahana, karnabahar ve şalgam gibi hardal ailesi üyelerinde bulunmaktadır (Nielsen ve Rios, 2000).

2.2 Esansiyel Yağların ve/veya Bileşenlerinin Bakterilere Karşı Aktivitesi

2.2.1 Esansiyel Yağların ve/veya Bileşenlerinin Bakterilere Karşı Antimikrobiyal Etki Mekanizması

Esansiyel yağların aktivitesi tek bir mekanizmaya dayandırılmaz (Nazzaro vd., 2013) çünkü bileşenlerinin çoklu hedefler üzerinde kendine has etki mekanizması bulunmaktadır. Esansiyel yağların etki mekanizması ve antimikrobiyal aktivitesi onların kimyasal yapısı ve içerdikleri tekli bileşenlerin konsantrasyonlarına göre değişmektedir (Nazzaro vd., 2013). Ayrıca, farklı bileşenlerin arasındaki sinerjistik ve antagonistik ilişkiler esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerini belirlemektedir. Esansiyel yağların olası etki mekanizması ve mikroorganizmalar üzerindeki hedef bölgeleri Şekil 2.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Esansiyel yağ bileşenlerinin hedef bölgeleri ve etki mekanizmaları

(Nazzaro vd., 2013)

Esansiyel yağlar ve bileşenlerinin hidrofobik yapısı hücre duvarının çift katmanlı fosfolipit yapısının destabilizasyonuna neden olmaktadır. İlk hedef olarak sitoplazma zarının geçirgenliğini arttırarak elektron transfer sistemini bozmaktadır. Ayrıca önemli hücre bileşenlerinin dışarı sızması (metabolitler ve iyonlar), birçok enzimin inaktive olması ve protein denatürasyonu ile sitoplazmanın koagüle olması gibi hücre içinde birçok reaksiyon meydana gelmektedir. Antimikrobiyal ürünler hücre içine alınması gereken önemli moleküllerin transferinden sorumlu membran proteinlerine ve yağ asidi sentezine de etki etmektedir (Nazzaro vd., 2013).

Terpenler protein denatürasyonuna ve hücre zarının bozulmasına etki ederek hücre bileşenlerinin kaybına ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Fisher ve Phillips, 2008). Örnek olarak p-çimen (monoterpen) sitoplazmik membran üzerinde seçici olarak genişlemelere, membran potansiyelinde düşüşe ve hücre hareketliliğinde de azalışa neden olmaktadır (Burt vd., 2007). Ayrıca p-çimen hücre zarında yabancı madde olarak görülmekte ve entalpide büyük bir düşüşe neden olmaktadır (Cristani vd., 2007; Hyldgaard vd., 2012).

Fenol türevlerinin antimikrobiyal etkileri, farklı konsantrasyonlarda değişiklik göstermektedir. Düşük konsantrasyonlarında enerji üretiminden sorumlu enzimlerin aktivitesini etkilemekte ancak yüksek konsantrasyonlarda protein denatürasyonuna neden olmaktadır (Tiwari vd., 2009). Buna ilaveten esansiyel yağların hidroksil grubu bakterilere karşı yüksek etkiye sahip olup; protein denatürasyonu, çözücü veya dehidrasyon ajanı olarak kullanılması bu bileşenlerin etkilerine örnek olarak gösterilmektedir (Bajpai vd., 2012; Dorman ve Deans, 2000). Fenol türevi bileşenler membran fonksiyonlarına (Elektron transferi ve besin maddesi vb.), nükleik asit sentezi ile etkileşime girmekte (Bajpai vd., 2008), membran proteinleri ile etkileşime girerek onların yapısal ve fonksiyonel deformasyonuna neden olmaktadır (Tiwari vd., 2009). Antimikrobiyal aktiviteleri hücre zarının geçirgenliğini değiştirebilme yeteneğine ve buna bağlı olarak hücre içi makromoleküllerin salınımını etkilemesine bağlıdır (Bajpai vd., 2008).

Timol (monoterpenoit fenol) etki mekanizması membranın iç ve dış yapısının bozulması, hücre proteinleri ve hücre içi hedefleri ile etkileşime girerek hücrenin kendini onarmasını geciktirme olarak tahmin edilmektedir. Hücre zarı ile etkileşimi ile zar geçirgenliğini değiştirerek H⁺ ve K⁺ iyonları ile ATP salınımına neden olmaktadır.

Timol membrandaki lipit ve protein profilinde değişimlere neden olmaktadır (Hyldgaard vd., 2012). Sitrat metabolik yoluna da etki ederek ATP sentezinde direkt veya dolaylı olarak sorumlu enzimleri inaktive etmektedir (Di Pasqua vd., 2010). Timol ve karvakrol benzer antimikrobiyal aktiviteye sahip olmasına rağmen Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı farklı etki mekanizmasına sahip olduğu bildirilmiştir (Nazzaro vd., 2013). Başka bir monoterpenoit olan mentol membran geçirgenliğin bozarak hücre bileşenlerinin sızmasına neden olmakta, ayrıca hücre içi bileşenlerle de etkileşime girmektedir (Hyldgaard vd., 2012).

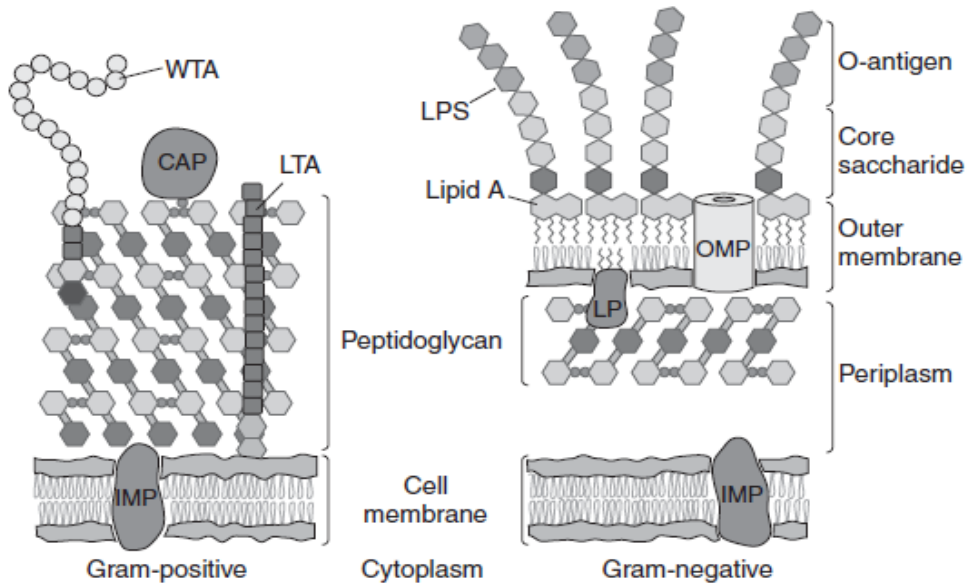
Aldehitler diğerlerine nazaran reaktif bileşen olup amino grubu içeren protein ve DNA ile kovalent çapraz bağ oluşturmaktadır (Feron vd., 1991). Sinamaldehit, fenilpropen aldehit olup en az üç olası etki mekanizmasına sahip olduğu bildirilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda sitokin etkileşimlerinde bulunan enzimlerin ve daha az önemli hücre fonksiyonlarının inhibe edilmesinde etkili göstermektedir. Öldürücü dozun altındaki konsantrasyonlarda, ATPaz aktivitesinin inhibisyonunda rol oynamakta, öldürücü konsantrasyonlarda, membran bozulmasına neden olmaktadır (Hyldgaard vd., 2012). Monoterpenoit aldehitlerden biri olan sitral, hücre zarını bozmaktadır. Fenolik propen olan öjenolün etki mekanizması, hücre membranının değiştirilmesi ile ATP ve potasyum iyonlarının salınımı ve yağ asidi profilindeki değişimler ile bakterilerin birçoğunda hücre hasarına etki etmesi olarak örnek verilebilmektedir. Ayrıca proteinler ile de etkileşime girerek öldürücü dozun altındaki konsantrasyonlarda; ATPaz, histidin dekarboksilaz, amilaz ve proteaz gibi bazı enzimlerin inhibisyonuna neden olmaktadır (Hyldgaard vd., 2012). Öjenoldeki hidroksil grubunun da proteinlere bağlanarak enzim inaktivasyonuna sebep olduğu düşünölmektedir (Angienda ve Hill, 2011).

Sonuç olarak, yağ asitleri ve/veya bileşenlerinin mekanizması hücre zarındaki, sitoplazmadaki, enzimlerdeki ve proteinlerdeki kimyasal değişimler olarak görölmektedir. Ayrıca, mikroorganizma metabolizmasına uzun süreli metabolit ve iyonların kaybı ile zarar verilerek, hücrenin lizisine ve dolayısıyla ölümüne yol açmaktadır (Nazzaro vd., 2013). Yukarıda verilen literatürde göröldüğü gibi, esansiyel yağların ve bazı bileşenlerinin antimikrobiyal aktiviteleri üzerine oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Ancak etki mekanizmaları konusunda halen ayrıntılı bilgiye ihtiyaç olduğu görölmektedir. Ayrıca, esansiyel yağların küf ve maya ile etkileşimleri üzerine sınırlı miktarda bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle yapılacak araştırmaların

esansiyel yağların ve bileşenlerinin mikroorganizmaların farklı tür ve suşları üzerindeki etki mekanizmalarının aydınlatılması üzerine olacağı düşünülmektedir. Esansiyel yağlar ve bileşenleri üzerine sahip olduğumuz temel bilgilerin artırılması ile sadece bu bileşenlerin antimikrobiyal aktivitesinin ayrıntılı olarak anlaşılması değil, farklı bileşenler arasındaki sinerjistik ve antagonistik etki mekanizmalarının da sistematik olarak araştırılmasına katkı sağlanacaktır.

2.2.2 Gram (+) ve Gram (-) Bakteriler Üzerindeki Aktivite Farklılıkları

Genel olarak Gram (-) bakteriler Gram (+) bakterilere göre hücre duvarı kompozisyonlarındaki farklılıklardan dolayı esansiyel yağlar ve onların bileşenlerine karşı daha az hassastırlar (Trombetta vd., 2005). Bu antimikrobiyal ajanlara karşı *Aeromonas hydrophila* en hassas, *P. aeruginosa* ise en dayanıklı Gram (-) bakteri türleri olduğu bilinmektedir (Burt, 2004). Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin hücre duvarlarının farklı olması, antimikrobiyal maddelerin bakteri inhibisyonunda farklılıklara neden olmaktadır. Şekil 2.5.'te Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin hücre duvarı yapıları görülmektedir. (Yvette, 2005).



Şekil 2.5. Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin hücre duvarı yapısı

WTA: Duvar Taykoik asit, CAP: Kovalent bağlı protein, LTA: Lipotaykoik asit, LPS: Lipopolisakakritler, OMP: Dış membran proteini, LP: Lipoproteinler ve IMP: İç membran proteini (Silhavy vd., 2010).

Dış membran hücrede geçirgenlik bariyeri olarak görev almakta ve proteinleri periplazmik alanda tutmaktadır. Gram (+) bakterilerin dış membrana sahip olmaması en önemli temel farklılıklardan biridir (Yvette, 2005). Gram (-) bakteriler Gram (+) bakterilere göre 2-3 nm daha ince peptidoglukan tabakaya sahip olup bu tabaka hücre kuru ağırlığının yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadır (Nazzaro vd., 2013). Sitoplazmik membran Gram (+) ve Gram (-) bakteriler için de geçirgenlik bariyeri olarak görev almaktadır (Yvette, 2005).

Küçük hidrofilik çözülmüş maddeler hidrofilik membranlar arası kanallar olan porin proteinleri vasıtasıyla dış membrandan penetre olmaktadır (Nazzaro vd., 2013). Lipopolisakkaritler, makromoleküller ve hidrofobik maddelere karşı bariyer oluşturarak hücre içine girmelerini engelleyerek, esansiyel yağlar ve bu yağların doğal ekstraktlarının Gram (-) bakterilerde daha düşük antimikrobiyal aktivite göstermesine neden olmaktadır (Hyldgaard vd., 2012; Nazzaro vd., 2013; Yvette, 2005). Ayrıca Gram (-) bakteriler Gram (+)'lere göre hidrofobik antibiyotikler ve toksik ilaçlara karşı daha az hassas oldukları bilinmektedir (Nazzaro vd., 2013).

Şekil 5'te görüldüğü gibi Gram (+) bakterilerin hücre duvarı Gram (-)'lere göre daha kalın ve daha az kompleks yapıya sahip olduğu bildirilmiştir (Yvette, 2005). Gram (+) bakteri hücre duvarı %90-95 peptidoglukan içermektedir. Ayrıca hidrofobik moleküllerin hücre içine penetrasyonu hücre duvarı yapısının farklılığından dolayı Gram (-)'lere göre daha kolay olmaktadır (Nazzaro vd., 2013).

2.3 Esansiyel Yağ Bileşenleri Arasındaki Sinerjistik, İlaveli ve Antagonistik Etkileşimler

Esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesi bileşenlerin kimyasal yapılarına, bulunma oranlarına ve interaktif ilişkilerine göre değişmektedir (Burt, 2004). Doğal aktiviteleri içeriklerindeki bir ya da iki temel bileşene dayanmaktadır. Ancak aktiviteleri sadece temel bileşenler ile bağlantılı olmayıp minör bileşenlerin de etkisi bulunabilmektedir. Esansiyel yağ bileşenleri arasında sinerjistik, ilaveli ve antagonistik etkileşimler görülmektedir (Hyldgaard vd., 2012).

Sinerjizm, iki antimikrobiyal bileşenin karışımı sonucu elde edilen etkinin ikisinin bireysel etkilerinin toplamından fazla olduğu durum olarak bilinmektedir. (Burt, 2004). Öjenol, sinnamaldehit, timol ve karvakrol bileşenlerinin ikili kombinasyonlarının *E. coli*'ye karşı oldukça düşük MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Pei vd., 2009). Bazı çalışma sonuçlarına göre ham esansiyal yağların, saflaştırılmış temel bileşenler ve farklı bileşenlerin kombinasyonlarına oranla daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

β -pinen, *R*-limonen, *S*-limonen, borneol ve 1,8-sineol gibi bazı esansiyal yağ bileşenleri ham esansiyal yağlar olan ladine (MİK=%0,024 \pm 0,003) oranla *Listeria monocytogenes* 4b ve 1/2c'ye karşı daha yüksek MİK değerine sahip iken, α -pinen bileşeninin bu iki tip sreatipe karşı benzer MİK değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir (%0,019 ve %0,025) (Canillac ve Mourey, 2001; Mourey ve Canillac, 2002). Yapılan bir çalışmada 0,25 mM çimen ve 0,5 mM karvakrol kombinasyonunun *Bacillus cereus*'a karşı *in vitro* sinerjistik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ultee vd., 2000). Bu durum minör bileşenlerin doğal antimikrobiyal aktivitesinde önemli olup, diğer bileşenler ile sinerjistik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Burt, 2004).

İlaveli antimikrobiyal etki, bileşenlerin kombinasyonunun bu bileşenlerin ayrı olarak uygulandıkları duruma kıyasla benzer etkiye sahip olduğu durumlardır (Burt, 2004). Öjenol ve sinnamaldehitin sırasıyla 3,1 mM ve 1,89 mM oranlarda kombine edilmesiyle *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. ve *Enterobacter* sp., gelişimini inhibe etmekte ilaveli etki gösterdiği tespit edilmiştir (Moleyar ve Narasimham, 1992).

Antagonizm bir veya iki bileşenin birlikte kullanıldığında tekli kullanımına kıyasla daha az etkiye sahip olması durumudur (Burt, 2004). Kekik uçucu yağı, saf karvakrole kıyasla maya gelişimi inhibisyonuna olumsuz yönde etki etmektedir (Rao vd., 2010).

Diğer bir çalışmada Canillac ve Mourey, 1996, 1,8-sineol hariç çalışılan tüm uçucu yağ bileşenlerinin köknar (MİK %0,10) ve çam (MİK %0,42) yağına kıyasla *L. monocytogenes* 1/2c üzerine daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Mourey ve Canillac, 2002). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir

başka çalışmada ise α -pinen, β -pinen, *R*-limonen, *S*-limonen ve borneol gibi uçucu yağ bileşenlerinin, 1,8-sineol hariç, ham köknar ve özellikle çam uçucu yağlarına oranla *L. monocytogenes* 4b ve 1/2c serotipleri üzerinde daha düşük MİK değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Minör bileşenler temel bileşenlerin etkilerini modifiye ederek onların antimikrobiyal etkileri üzerinde antagonistik etkiye neden olmaktadır. Bu durum ham esansiyel yağların antimikrobiyal etkilerinin incelenmesini oldukça kompleks ve değişken olmasına neden olmaktadır (Bakkali vd., 2008).

Esansiyel yağların ve bileşenlerinin sinerjistik etkileri üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Seow vd., 2014). Bazı esansiyel yağlar GRAS (genellikle güvenilir kabul edilen) statüsünde olsalar da duyuşsal kabul edilebilirlikleri düşük olduğu için kullanımları sınırlamaktadır (Zinoviadou vd., 2009). Esansiyel yağlar keskin koku ve lezzet karakteristikleri nedeniyle gıda koruyucusu olarak kullanımları yaygınlaşmamaktadır. Esansiyel yağlar ve bileşenleri birlikte kullanıldıklarında, istenmeyen tat veya organoleptik özelliklerinin önlenme olasılığı bulunmaktadır (Seow vd., 2014). Esansiyel yağ bileşenlerin antimikrobiyel etki göstermeleri için yüksek konsantrasyonlarda kullanımı gerekebilmektedir. Bu durum da organoleptik olarak kabul edilebilir dozun aşımına neden olmaktadır (Klein vd., 2013; Zinoviadou vd., 2009).

Diğer taraftan, Zinoviadou vd. (2009) yaptıkları çalışmada yenilebilir protein filmlerine kekik yağı ilave ederek, istenen antimikrobiyel etkiyi olumsuz tat profiline sebep olmadan, çok düşük dozlarda elde etmişlerdir. Ancak esansiyel yağlar ve bileşenlerinin spesifik gıdalara göre dikkatlice seçilmesi gerekmektedir (Seow vd., 2014). Yapılan çalışmalarda gıda ürünlerindeki esansiyel yağ bileşenlerinin tekli veya kombinasyon şeklinde kullanımının araştırılmasında duyuşsal özelliklerin de dikkate alınması gerektiği bildirilmektedir (Klein vd., 2013).

Buna karşın esansiyel yağlar ve bileşenlerinin doğru kombinasyonlarının kullanımı, sinerjistik ve ilaveli etkilerinin avantajları ile mikroorganizmalarla savaşmada etkili olmaktadır (Bassolé ve Juliani, 2012; Hyldgaard vd., 2012). Uçucu yağların kombinasyonlarında tekli kullanımına oranla daha düşük konsantrasyonlarda kullanılarak daha yüksek antimikrobiyal etkiye ulaşıldığı belirlenmiştir. Çizelge 2.1. ve Çizelge 2.2'de esansiyel yağ bileşenlerinin interaksiyonları üzerine yapılan *in vitro*

alışmalar ve bunların fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon indeksleri (FİKİ) gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. ve izelge 2.2. esansiyel yağ bileşenlerinin sinerjitik yağ kombinasyonların kantitatif olarak standardize etme yolunun olmadığını göstermektedir. Farklı alışmalar farklı yöntemler ve farklı FİKİ değerleri kullanılmaktadır. Ayrıca aynı cinsteki bakterilere karşı kullanılan besiyeri, son inokulasyon konsantrasyonları ve uygulanan inkubasyon koşulları farklı çalışmalarda değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte, bileşenlerin kombinasyonlarındaki oranlar ve konsantrasyonlar farklı olup, sürfaktan/çözücü türleri tüm çalışmalarda açıkça belirtilmemiştir. Bu da esansiyel yağ bileşenlerinin kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan farklı çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır.

Çizelge 2.1. Esansiyel yağ bileşenleri ile bazı mikroorganizmalar arasındaki *in vitro* etkileşimler

Bileşen 1 (mM)	Bileşen 2 (mM)	Mikroorganizmalar	Yöntem	Besiyeri	Koşullar	Etkileşim	Kaynak
Sinnamaldehit	Öjenol						
1,89	3,1	<i>Staphylococcus sp.</i>	karıştırma	NA	30 ± 1°C, 24 h	ilaveli	1
1,89	3,1	<i>Micrococcus sp.</i>			yaklaşık 3x10 ⁷ cfu	ilaveli	
1,89	3,1	<i>Bacillus sp.</i>				ilaveli	
1,89	3,1	<i>Enterobacter sp.</i>				ilaveli	
0-1,51	0-4,87	<i>Escherichia coli</i> CGMCC 1.487	dama tahtası	MHB	37°C, 24 h yaklaşık 5x10 ⁵ cfu/ml	S, FİKİ: 0,5	2
0,47 (MİK)	1,52 (MİK)	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	dama tahtası	THB	37°C, 24 h	FİKİ: 0,75, KS	3
0,95 (MİK)	0,76 (MİK)	<i>Streptococcus sanguis</i>		THB	37°C, 24 h	FİKİ: 1, etkileşim yok	
0,95 (MİK)	0,05 (MİK)	<i>Streptococcus milleri</i>		THB	37°C, 24 h	FİKİ: 1,25 etkileşim yok	
0,47 (MİK)	0,76 (MİK)	<i>Streptococcus mitis</i>		THB	37°C, 24 h	FİKİ: 1, etkileşim yok	
1,89 (MİK)	3,05 (MİK)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 14956		W-W	37°C, 48 h	FİKİ: 1, etkileşim yok	
0,47 (MİK)	1,52 (MİK)	<i>Prevotella buccae</i> (2,5x10 ⁷ to 5x10 ⁷ cfu/ml)		TGY	37°C, 48 h	FİKİ: 1, etkileşim yok	
0,24 (MİK)	1,52 (MİK)	<i>Prevotella oris</i> (2,5x10 ⁷ to 5x10 ⁷ cfu/ml)		TGY	37°C, 48 h	FİKİ: 1, etkileşim yok	
0,47 (MİK)	0,76 (MİK)	<i>Prevotella intermedia</i> (2,5x10 ⁷ to 5x10 ⁷ cfu/ml)		TGY	37°C, 72 h 10 ⁷ cfu/ml	FİKİ: 1, etkileşim yok	
0-0,20 (MİK)	0-0,20 (MİK)	<i>Laetiporus sulphureus</i> (BCRC 35305)	karıştırma	PDA	26 ± 2°C, 5 gün miselyumların inokülümü	sinerjistik	4
0-0,34 (MİK)	0-0,34 (MİK)	<i>Lenzites betulina</i> (BCRC 35296)				ilaveli	

Çizelge 2.1. (devam)

Bileşen 1 (mM)	Bileşen 2 (mM)	Mikroorganizmalar	Yöntem	Besiyeri	Koşullar	Etkileşim	Kaynak
Sinnamaldehit	Öjenol						
0-2,52 (MİK)	0-1,02 (MİK)	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium LT2	karıştırma	TSA	35°C, 24 h	etkileşim yok	5
0-4,03 (MİK)	0-1,62 (MİK)	<i>Listeria innocua</i>		MOX	10 ⁴ 5 cfu/ml		
0-0,61 mM	0-0,97 mM	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> 6 farklı suş	zamana bağlı öldürme tekniği	MEB	35°C, 7 gün 10 ⁴ 3 spor/ml	ilaveli	6
Timol	α-pinen						
0,27 - 0,67	5,87 - 8,81	<i>Escherichia coli</i> (DSM 10727)	karıştırma	SNA	30°C, 7h	S (1), etkileşim yok (2)	7
0,27 - 0,67	8,81	<i>Pseudomonas fragi</i> (DSM 3456)		NB2	25°C, 12 h	etkileşim yok (2)	
0,27 - 0,67	2,94	<i>Brochothrix thomosphacta</i> (DSM 20171)			25°C, 12 h	S (1), etkileşim yok (1)	
0,27 - 0,67	5,87 - 8,81	<i>Aeromonas hydrophila</i> (DSM 30187T)			30°C, 7h 2,5-5x10 ⁴ 5 cfu/ml	S (1), etkileşim yok (2)	
Timol	Ökalyptol						
0,27 - 0,67	12,97 - 18,15	<i>Escherichia coli</i> (DSM 10727)	karıştırma	SNA	30°C, 7h	S (2), etkileşim yok (1)	7
0,27 - 0,67	18,15	<i>Pseudomonas fragi</i> (DSM 3456)		NB2	25°C, 12 h	etkileşim yok (2)	
0,67	11,67 - 12,97	<i>Brochothrix thomosphacta</i> (DSM 20171)			25°C, 12 h	S (1), etkileşim yok (1)	
0,03 - 0,27	3,89 - 9,08	<i>Aeromonas hydrophila</i> (DSM 30187T)			30°C, 7h 2,5-5x10 ⁴ 5 cfu/ml	S (2), etkileşim yok (1)	
0-0,51 (MİK)	0-(14,93-29,85) (MİK)	<i>Candida albicans</i> M1	dama tahtası	RPMI 1640	35°C, 48h	S, FİKİ: 0,125	8
0-(0,51-1,02) (MİK)	0-(14,93-29,85) (MİK)	<i>Candida krusei</i> H9		RPMI 1640	35°C, 48h 0,5x10 ⁴ 3-2,5x10 ⁴ 3	S, FİKİ: 0,125	

Çizelge 2.1. (devam)

Bileşen 1 (mM)	Bileşen 2 (mM)	Mikroorganizmalar	Yöntem	Besiyeri	Koşullar	Etkileşim	Kaynak
Karvakrol	Ökalyptol						
0-0,52 (MİK)	0-(14,93-29,85) (MİK)	<i>Candida albicans</i> M1	dama tahtası	RPMI 1640	35°C, 48h	S, FİKİ: 0,25	8
0-0,52 (MİK)	0-(14,93-29,85) (MİK)	<i>Candida krusei</i> H9		RPMI 1640	35°C, 48h	S, FİKİ: 0,25	
					0,5x10 ³ -2,5x10 ³		
0-1,95 (MİK)	0-59,17 (MİK)	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	dama tahtası	NB	35 °C, 24 h	S, FİKİ: 0,25	9
0-1,95 (MİK)	0-14,93 (MİK)	<i>Aeromonas hydrophila</i> INCQS 7966			28 °C, 24 h	S, FİKİ: 0,25	
0-8,13 (MİK)	0-29,85 (MİK)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 11253			28 °C, 24 h	S, FİKİ: 0,25	
					yaklaşık 10 ⁷ cfu/ml		
0,13 - 0,33	12,97 - 18,15	<i>Escherichia coli</i> (DSM 10727)	karıştırma	SNA	30°C, 7h	S (3)	7
0,67 - 1,30	12,97 - 18,15	<i>Pseudomonas fragi</i> (DSM 3456)		NB2	25°C, 12 h	S (3)	
0,33 - 0,67	11,67 - 12,97	<i>Brochothrix themosphacta</i> (DSM 20171)			25°C, 12 h	An(1), etkileşim yok (2)	
0,13 - 0,33	3,89 - 9,08	<i>Aeromonas hydrophila</i> (DSM 30187T)			30°C, 7h	S (2), etkileşim yok (1)	
					2,5-5x10 ⁵ cfu/ml		
Karvakrol	α-pinen						
0,67 - 1,30	5,87 - 8,81	<i>Escherichia coli</i> (DSM 10727)	karıştırma	SNA	30°C, 7h	S (2), etkileşim yok (1)	7
0,67 - 1,30	5,87 - 8,81	<i>Pseudomonas fragi</i> (DSM 3456)		NB2	25°C, 12 h	S (2), etkileşim yok (1)	
0,33 - 0,67	2,49 - 2,94	<i>Brochothrix themosphacta</i> (DSM 20171)			25°C, 12 h	An (1), etkileşim yok (1)	
0,13 - 0,67	5,87 - 8,81	<i>Aeromonas hydrophila</i> (DSM 30187T)			30°C, 7h	An (4)	
					2,5-5x10 ⁵ cfu/ml		

NA: Nutrient agar, MHB: Mueller–Hinton sıvı besiyeri, THB: Todd Hewitt sıvı besiyeri, W-W: Wilkins West, TGY: Tryptose glucose yeast extract sıvı besiyeri, PDA: Potato dextrose agar, TSA: Tryptic soy agar, MOX: Peptone, modified Oxford's medium, MEB: Malt-extract sıvı besiyeri, SNA: Standard I nutrient agar, NB2: Nutrient sıvı besiyeri no. 2, SGB: Sabouraud glucose sıvı besiyeri, RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium. S: Sinerjitik, An: Antagonistik, KS: Kısmen sinerjitik. 1: (Moleyar ve Narasimham, 1992) 2: (Pei vd., 2009) 3: (Didry vd., 1994) 4: (Yen ve Chang, 2008) 5: (Hill vd., 2013) 6: (Bevilacqua vd., 2010) 7: (Klein vd., 2013) 8: (Pina-Vaz vd., 2004) 9: (De Sousa vd., 2012)

Çizelge 2.2. Literatürdeki FİKİ değerlerinin karşılaştırılması

FİKİ				
Sinerjizm	Kısmi Sinerjizm	İlaveli	Etkisiz	Antagonizm
< 1	/	1	$1 < \text{FİKİ} \leq 2$	> 2
$\leq 0,5$	$0,5 < \text{FİKİ} \leq 0,75$	/	$0,75 < \text{FİKİ} \leq 2$	> 2
< 0,5	/	/	$0,5 \leq \text{FİKİ} \leq 4$	> 4
$\leq 0,5$	/	$0,5 < \text{FİKİ} \leq 4$	$0,5 < \text{FİKİ} \leq 4$	> 4

Çizelgedeki FİKİ değerleri literatürde sırasıyla Pei vd., 2009, Didry vd., 1994, Pina-Vaz vd., 2004 ve De Sousa vd., 2012 yazarlar tarafından değerlendirilmiştir.

2.4 Esansiyel Yağlar ve Bileşenlerinin Antimikrobiyel Aktivitelerini Etkileyen Faktörler

Esansiyel yağlar ve bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitesi aktif ajanların kimyasal yapılarındaki değişiklikler, esansiyel yağ bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal karakteristikleri, antimikrobiyal etkiyi azaltan nişasta, yağ ve protein varlığı, kullanılan test yöntemi, mikroorganizmaların tür ve suşlarının hassasiyeti ve kültür geçmişi gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Buna ilave olarak, inokülasyon miktarı, kültürün yaşı, kültür koşulları, besiyerinin çeşidi, inkübasyon süresi ve sıcaklığı, çalışılan kültürlerin fizyolojik durumlarındaki farklılıklar da aktivite sonucunu etkilemektedir (Holley ve Patel, 2005; Seow vd., 2014). Mikroorganizmaların doğal antimikrobiyallere olan hassasiyeti durağan fazda değişebilmektedir ve bazen daha dirençli olabilmektedirler (Holley ve Patel, 2005). Bu nedenle farklı sistemlerdeki antimikrobiyal aktivite çalışmalarında tüm bu faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Seow vd., 2014).

Genel olarak esansiyel yağlar veya saf bileşenlerin yüksek konsantrasyonlarda kullanımı daha yüksek antimikrobiyal etki göstermektedir. Konsantrasyon, aktiviteyi

etkileyen en önemli etkidir. Bununla birlikte esansiyel yağlar ve bileşenlerinin su bazlı besiyerindeki çözünürlüğü biyoaktivitesini etkileyen en önemli faktördür (Seow vd., 2014). Berrak elma suyundaki *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella enterica* üzerine yapılan çalışmada karvakrol ve sinamaldehytin bakterisidal aktivitesi, düşük konsantrasyonlarda yüksek olarak görülmektedir. Bulanık meyve suyunda bu etki berrak olana oranla daha düşük aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum esansiyel yağların homojen dağılmamasına ve bazı antimikrobiyal ajanların elma pulpu tarafından adsorbe edilmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (Friedman vd., 2004). Bunla birlikte, esansiyel yağlar ve saflaştırılmış bileşenlerinin optimum konsantrasyonlarda besiyerindeki ya da gıdadaki karışılabilirlikleri yüksek antimikrobiyal aktivite açısından önem taşımaktadır (Seow vd., 2014).

Esansiyel yağlar ve bileşenlerinin antifungal aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada mikrodilüsyon yönteminin makrodilüsyon yöntemine göre daha yüksek etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Soković vd., 2009). Hidrofobik esansiyel yağların sudaki çözünürlüğünün düşük olması ve katı besiyerindeki difüzyonun sınırlayıcı oluşu sebepler olarak gösterilmektedir (Griffin vd., 2000). Suda çözünebilirliği daha yüksek olan 1,8-sineol, karvon, terpinen-4-ol ve α -terpineol gibi bileşenler, daha düşük çözünürlüğe sahip olanlara kıyasla katı besiyerine daha kolay difüze olmaktadır (Griffin vd., 2000; Soković vd., 2009). Bununla birlikte, hidrokarbon bileşenlerin besiyerinin üzerinde kalması veya buharlaşması sebebiyle daha düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Griffin vd., 2000). Mikrodilüsyon yönteminde katı besiyeri kullanılmaması esansiyel yağların ve bileşenlerinin sıvı besiyerinde daha iyi difüze olmasını sağlamaktadır (Soković vd., 2009).

İyonik olmayan sürfaktanlar (Tween 20 veya Tween 80), çözücüler (dimetil sülfoksit (DMSO) veya etanol), stabilizatörler (agar ve lesitin) esansiyel yağlar ve bileşenlerinin besiyerindeki çözünürlüğünü arttırdığından dolayı mikroorganizmalarla daha yüksek oranda etkileşim sağlamaktadır (Seow vd., 2014). Bununla birlikte bu kombinasyonlar esansiyel yağlar ve bileşenlerinin fiziksel ve/veya kimyasal karakterizasyonlarındaki değişikliklere sebep olabileceğinden onların fonksiyonellikleri üzerinde etkileri olabilmektedir (Chalova vd., 2010).

Esansiyel yağlar ve saf bileşenlerinin Tween ile birlikte kullanıldığı durumlarda antimikrobiyal aktiviteleri üzerine yapılan çalışmaların sonuçları

değişiklik göstermektedir. Örneğin, linalool, sitral ve geraniol Tween 20 ile kombine edildiğinde yüksek antimikrobiyal etki göstermiş ancak, karanfil, kekik (*Thymus* sp.), nane (*Mentha* sp.) ve Valensiya portakalı esansiyel yağları Tween 80 ile kombine edildiğinde antagonistik etki görüldüğü tespit edilmiştir. Bunun nedeni iyonik olmayan Tween emülgatörünün, bileşenlerle misel oluşturarak mikroorganizmalar ile etkileşimini engellemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, DMSO, etanol ve izopropanol polar çözümler olduklarından misel oluşturmamakta ve bu nedenle de esansiyel yağların mikroorganizmalar ile etkileşimini arttırmaktadırlar (Seow vd., 2014).

2.5 Esansiyel Yağların Gıda Model Sistemlerindeki Antimikrobiyal Aktivitesi

Esansiyel yağların gıdalardaki aktivitesiyle ilgili 1990 yılına kadar oldukça az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu tarihten sonra yapılan bazı çalışmalar esansiyel yağların ve bileşenlerinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ve gıda koruyucusu olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Bajpai vd., 2012). Genel olarak esansiyel yağların gıdalardaki bakterilere karşı aynı etkiyi vermesi için *in vitro* çalışmalarda kullanılandan daha yüksek miktarlarda kullanılması gerekmektedir (Burt, 2004).

Ayrıca, gıdaların yağ, protein, su gibi bileşen miktarları, pH, antioksidanlar, koruyucular, tuz ve diğer katkıları gibi iç faktörler ile sıcaklık, ambalajlama, mikroorganizma özellikleri gibi dış faktörler de esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesini etkilemektedir (Burt, 2004). Uçucu yağlar düşük pH'lı gıdalarda daha yüksek antimikrobiyal etki göstermektedir (Burt, 2004). Burt (2004)'ün belirttiği gibi, Juven vd. (1994) yaptığı çalışmada düşük pH'larda esansiyel yağların hidrofobitesinin arttığını, böylece hedef mikroorganizmaların hücre zarındaki lipitlerde daha kolay çözüldüğünü belirtmiştir.

Esansiyel yağlar ayrıca kısa süreli depolama koşullarında ve ambalaj içindeki düşük oksijen konsantrasyonlarında daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Burt, 2004). Ayrıca, bazı esansiyel yağların ya da bileşenlerinin yüksek tuz konsantrasyonları ile kombinasyonu sinerjistik etki göstermektedir (Kurita ve Koike, 1982; Tassou vd., 1995).

Yapılan bir çalışmada karanfil esansiyel yağı ile NaCl'nin %0,0325 (v/v) ve %1,2'lik (w/v) konsantrasyonlardaki kombinasyonu *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada tuz, hücre duvarı proteinlerinin amino bileşenlerini etkileyerek yağın geçmesine olanak sağlamıştır (Angienda ve Hill, 2011). Buna karşın karvakrolün, çimen veya soya sosu (NaCl, 1,25 g/L eklenmiş) ile kombinasyonu *Bacillus cereus*'a karşı antagonistik etki göstermiştir. Bu bileşenler tuzun olmadığı durumlarda sinerjistik etki göstermelerine rağmen tuz ilavesi ile aktivitelerinde düşüş olduğu belirlenmiştir (Ultee vd., 2000).

Gıdaların fiziksel yapısı da esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitelerini etkilemektedir (Burt, 2004). Yüksek orandaki yağ ve/veya proteinler esansiyel yağların etkisine karşı patojenleri koruyan bir bariyer oluşturabilmektedir (Burt, 2004). Ancak karbonhidratların, protein ve yağlara oranla patojenleri daha düşük düzeyde koruduğu bildirilmiştir (Bajpai vd., 2012). Bu sebeple, esansiyel yağların gıdanın yağ fazında çözündüğü ve su fazındaki bakteriler üzerinde etkisinin olmadığı öngörülmektedir (Mejlholm ve Dalgaard, 2002). Bir başka deyişle, gıdalardaki su miktarının besiyerine kıyasla azalması antimikrobiyal maddelerin hücrelerin aktif kısımlarına geçişini geciktirebilmektedir (Smith-Palmer vd., 2001).

Esansiyel yağlar ve bileşenlerinin suda çözünürlüğü, antimikrobiyal aktivitesi ve esansiyel yağ bileşenlerinin birbirleri arasındaki etkileşimler, gıda sistemlerine uygulanmadan önce *in vitro* olarak belirlenmesi gerekmektedir. *In vitro* çalışmalarda parametreler kontrol edilerek veya değiştirilerek gıdaya benzer ortamlar elde edilebilmektedir. Ayrıca *in vitro* çalışmalarda esansiyel yağ bileşenlerinin protein, yağ ve karbonhidrat gibi gıda bileşenleri ile etkileşiminin incelenmesi de mümkündür.

Ancak, esansiyel yağların veya bileşenlerinin kullanımı son ürün üzerinde negatif etkiye sebep olabilmektedir ve kombinasyonları, bazen tek bileşen veya ham esansiyel yağ olarak uygulandığı durumlara oranla daha iyi sonuç verebilmektedir. Bu sebeple esansiyel yağlar ve/veya bileşenleri ile çalışmalar yapılırken duyu analizi yapılması önerilmektedir.

Esansiyel yağlar ve bileşenlerinin gıdalardaki antimikrobiyal aktivitelerini değiştirebilecek çok fazla sayıda parametre olduğundan, gıdalarda doğru uygulama yapılması için *in vivo* testler de uygulanabilmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Besiyerleri ve Kimyasallar

Mikroorganizma kültürlerinin geliştirilmesinde Beyin-Kalp İnfüzyonu (BHI) besiyeri ve bakteriyolojik agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, İngiltere) kullanılmıştır. Katı besiyeri için 37 g BHI 1 L destile suda çözünüp %1 agar eklendikten sonra 121°C'de 15 psi basınçta 15 dakika otoklavlanmış ve ardından steril Petri kutularına 12-15 mL olacak şekilde steril olarak dağıtılmıştır. Çalışmada inokülasyon amacıyla kullanılacak BHI sıvı besiyeri, 5, 9 veya 10 mL olacak şekilde sterilize edilerek hazırlanmıştır. BHI sıvı besiyeri ayrıca mikroanaliz ve dama tahtası yöntemlerinde de kullanılmıştır.

Çalışmada ayrıca analitik saflıkta dimetil sülfoksit (DMSO), Tween 80 (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, ABD) ve %95'lik etanol (Chem-Lab NV, Zedelgem, Belçika) kullanılmıştır.

3.2 Bakteriye Suşlar ve Kültür İnokülasyonu

Bu çalışmada esansiyel yağ bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitesi *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerinin seçilmiş üç farklı suşu üzerinde denenmiştir. Çalışmada kullanılan suşlar Çizelge 3.1.'te gösterilmiştir. Bu mikroorganizmalar sırasıyla Gram (+) ve Gram (-) bakterilere örnek olarak seçilmişlerdir. Kültürler %50'lik gliserol içinde -20°C'de uzun süreli koruma için saklanmışlardır. Bakteriye kültür devamlılığı için aylık olarak BHI sıvı besiyerinde aktifleştirilerek alt kültürü hazırlanmış ve çalışma süresince 4°C'de tutulmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların listesi

Türler	Suşlar	İzolasyon Kaynağı	Temin Edildiği Kişi / Kurum
<i>E. coli</i>	LMG2093	Bilinmiyor	BCCM
<i>E. coli</i>	JG33	Sosis	Imca Sampers'ın doktora çalışmasında izole edilmiştir.
<i>E. coli</i>	JG45	Hayvan derisi	Imca Sampers'ın doktora çalışmasında izole edilmiştir.
<i>S. aureus</i>	LMG8224	Klinik izolat	BCCM
<i>S. aureus</i>	TIAC39	Brokolili sebze karışımı	Akreditasyon Lab: WIV Brüksel
<i>S. aureus</i>	TIAC82	Karides	Akreditasyon Lab: WIV Brüksel

BCCM: Belçika Mikroorganizma Kültür Koleksiyonu, İzole edilen suşlar Gıda Güvenliği ve Gıda Kalitesi Bölümü, Ghent Üniversitesi, Belçika'dan temin edilmiştir.

Katı besiyerinde geliştirilen saf *E. coli* ve *S. aureus* suşları BHI sıvı besiyerinde geliştirilerek aktifleştirilmiştir. Denemelerden önce 100 µL *E. coli* ve *S. aureus* kültürleri 10 mL BHI sıvı besiyerine aktarılmış ve ard arda iki defa pasaj yapılarak 24 saat aktifleştirildikten sonra 100 µL aktif kültür ile 10 mL besiyerine inoküle edilip, 37°C'de 22 saat inkübe edilerek, yaklaşık 10⁹ veya 10¹⁰ kob/mL olacak şekilde kullanılmışlardır.

3.3 Seçilen Esansiyel Yağ Bileşenleri

On yedi adet esansiyel yağ bileşeni antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması için seçilmiştir. Geraniol hariç bütün bileşenler Sigma-Aldrich (Saint Louis Missouri, ABD) firmasından, geraniol ise Janssen Chimica (Geel, Belçika) firmasından temin edilmiştir.

Seçimler temel olarak bileşenlerin yapısı göz önüne alınarak yapılmış, literatürde var olan çalışmalar da dikkate alınarak her yapısal sınıf için bir bileşen seçilmiştir. Araştırma süresince geranil asetat 4°C’de, diğer bileşenler ise oda koşullarında muhafaza edilmiştir. Saf bileşenler ile ilgili ayrıntılı bilgiler Çizelge 3.2.’te verilmiştir. Bu çizelge, araştırmada kullanılan ürünlerin etiketlerindeki mevcut bilgiler dikkate alınarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan esansiyel yağ bileşenlerinin özellikleri

Bileşenler	Molekül				
	Safılık (%)	ağırlığı (g/mol)	Yoğunluk (g/mL)	Fiziksel yapı ^c	Ürün kodu
Ocimen	≥90	136,23	0,818 ^a	Sıvı	W353901
p-çimen	99	134,22	0,860	Sıvı	C121452
α-pinen	98	136,23	0,858	Sıvı	147524
Geranil asetat	≥97	196,29	0,916	Sıvı ^d	173495
Geraniol	98	154,25	0,879 ^b	Sıvı	/
Sitral	≥96	152,23	0,888	Sıvı	W230308
Mentol	≥98	156,27	0,890	Vaks	63670
Menton	≥97	154,25	0,896 ^a	Sıvı	63680
Mentil asetat	≥97	198,31	0,922	Sıvı	W266809
Kamfor	96	152,23	/	Toz	148075
Ökalyptol(1,8 sineol)	99	154,25	0,921	Sıvı	C80601
Borneol	97	154,25	/	Toz	139114
Timol	≥99,5	150,22	0,965	Toz	T0501
Öjenol	≥98	164,20	1,066	Sıvı	W246700
Estragol(4-Allilanol)	98	148,20	0,965	Sıvı	A29208
Sinnamil alkol	98	134,18	1,044	Vaks	108197
Sinnamaldehit	≥98	132,16	1,050	Sıvı	W228605

a: Sıcaklık 20°C, diğerleri için 25°C; b: Bilinmeyen sıcaklık; c: Oda sıcaklığı; d: Buzdolabı sıcaklığı

3.3.1 Antimikrobiyal Ajanların Hazırlanması

Esansiyel yağların en yüksek çözünebilirlik konsantrasyonlarını belirlemek için yapılan çalışmalar, literatürde kullanılan esansiyel yağ bileşenlerinin konsantrasyonları ve yüzey aktif madde ve/veya çözügen çeşit ve oranları göz önünde bulundurularak yürütülmüştür. Çözeltiler 100 mL'lik erlenmeyerde Tween 80, etanol veya DMSO kullanılarak su içerisinde, manyetik karıştırıcı yardımıyla yaklaşık 30 dakikada hazırlanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan yüzey aktif madde ve/veya çözügen miktarı mümkün olduğunca düşük tutularak bu maddelerin mikrobiyal gelişim üzerine etki etmelerinin önüne geçilmeye çalışılmıştır. Erlenmeyerler parafin ile kapatılarak uçucu bileşenlerin uzaklaşması önlenmiştir. Esansiyel yağ bileşenlerinin homojen karışımı elde edilmemiş ise bu bileşenlerin daha düşük oranları veya daha yüksek oranda yüzey aktif madde ve/veya çözügen kullanılmıştır. Homojen ve berrak karışımın olması, antimikrobiyal aktivitenin ölçülmesi ve kültürlerin yoğunluğunun düzgün olarak belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu bileşen çözeltilerinin çözünebildikleri en yüksek konsantrasyonları elde edilene kadar nitel olarak tespit edilmiştir.

Her çalışma öncesinde esansiyel yağ bileşen çözeltilerine çözünebilirliği arttırma amacıyla %1 Tween 80, %2,5 etanol, %1 Tween 80 ile desteklenmiş %1 veya %5 DMSO BHI sıvı besiyeri eklenmiştir. Bu karışımlar 0,45 µm'lik por çapına sahip şırınga ucu filtreler (Whatman) kullanılarak sterilize edilmiştir. Her çalışmada kontrol olarak %1 Tween 80, %2,5 etanol, %1 Tween 80 ile desteklenmiş %1 veya %5 DMSO esansiyel yağ içermeyen BHI sıvı besiyerleri kullanılmıştır. Çözeltilerin pH değerleri ölçülmüştür.

3.4 McFarland Standart Çözeltisinin Hazırlanması

Hücre yoğunluğunun belirlenmesi için McFarland standart çözeltisinin absorbansı kullanılmıştır. Öncelikle 1,175 g BaCl₂ 100 mL destile suda çözündürülüp (0,048 M) stok çözelti hazırlanmıştır. Ardından 1 mL H₂SO₄ 100 mL destile suya eklenerek 0,18 M seyreltik asit çözeltisi elde edilmiştir. Bu çözeltiden 99,5 mL alınarak üzerine 0,5 mL BaCl₂ çözeltisi ilave edilmiş ve sürekli karıştırılarak standart hazırlanmıştır.

Standart çözeltinin absorbansı 1 cm ışık yolu olan küvetler kullanılarak spektrofotometre (Thermo Spectronic Genesys 20 4001/4) ile ölçülmüştür. Buna göre 0,5 McFarland çözeltisi için absorbans değerleri 625 nm'de 0,08 ve 0,13 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçla spektrofotometrenin çalışma aralığının bu çalışmada kullanımını için yeterli genişlikte olduğu belirlenmiştir. BaSO₄ çözeltisi tüplere aktarılıp bakteriyel ekim için standardize edilmiştir. Tüpler parafin ile kapatılıp ışık almayan ortamda oda sıcaklığında depolanmıştır (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, CLSI, 2012).

McFarland standart çözeltisinin absorbansı 0,08-0,13 değerlerinde olduğu takdirde, hücre yoğunluğu da $1-2 \times 10^8$ kob/mL değerine denk gelmektedir. Denemelerde istenilen hücre yoğunluğu, kültürlerin absorbansı ölçülerek belirlenmiştir. (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, CLSI, 2012).

3.5 İnokülüm Hazırlanması ve İnokülasyon

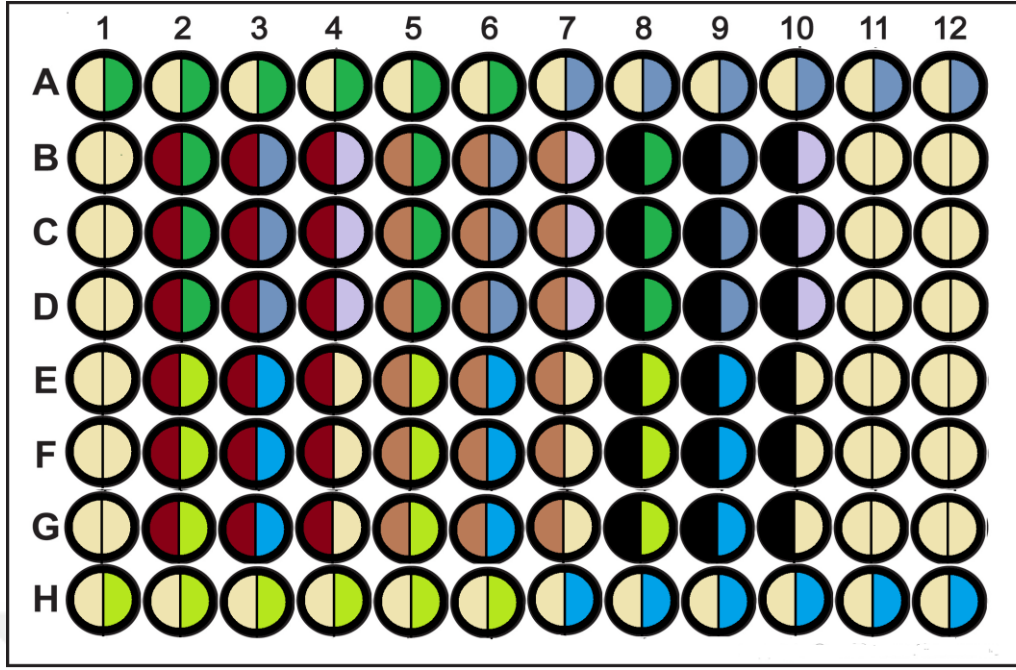
Çalışılan her mikroorganizma kültüründen 100 µL, 10 mL BHI sıvı besiyerine ekilip 22 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası BHI sıvı besiyeri kullanılarak kültürler 0,5 McFarlan'da ayarlanmıştır. Ayarlanan kültürler $1-2 \times 10^8$ kob/mL düzeyinde mikroorganizma içermektedir. İnokülasyon öncesi, bakteri kültürleri seyreltilerek yaklaşık 5×10^6 kob/mL mikroorganizma sayısına ulaşılmıştır. Denemede kullanılacak mikrotiter plakanın (96 kuyucuklu) bazı kuyucuklarına 20 µL inokülüm ve 180 µL bileşen çözeltisi ile doldurulup 5×10^5 kob/mL konsantrasyonu elde edilmiştir.

İnokülüm kuvveti ve saflığı, BHI agar Petrilerinde eş zamanlı inkübasyon ile test edilmiştir. İnokülümler (Yaklaşık 5×10^6 kob/mL) 10^{-4} düzeyine kadar %0,9 NaCl (w/v) ile seyreltilip, yaklaşık 5×10^2 kob/mL değeri elde edilmiştir. Buradan yayma kültür yöntemi ile katı besiyerine 100 µL ekim yapılarak her bir Petri kutusunda yaklaşık olarak 50 koloni sayılması amaçlanmıştır.

3.6 Mikrotiter Plakadaki Gelişim İnhibisyonunun Kantitatif Tahminlenmesi

Esansiyel yağ bileşenlerinin *E. coli*'ye ve *S. aureus*'a karşı gelişim inhibisyon potansiyeli hassaslık izlemesi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu yöntem temel olarak sıvı besiyeri mikrodilüsyon esasına bağlıdır (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, CLSI, 2012). Buna göre, polisitren ile muamele edilmiş düz tabanlı steril mikrotiter plakalar (*Falcon*®, REF 353936) sıvı besiyeri ve antimikrobiyal çözeltileri içermekte olup içerisinde; 20 µL mikrobiyal inokulum ve 180 µL antimikrobiyal çözelti içermektedir (Şekil 3.1.). Her bileşen 1 mM ve 2 mM olacak şekilde iki konsantrasyonda test edilmiştir.

Test kuyucuklarını ayırmak için, 180 µL bileşen çözeltisi 20 µL steril besiyerine eklenmiş ve bu kuyucuklar kontrol olarak kullanılmıştır. Çözücü/süpfaktan kontrolü için, 180 µL BHI sıvı besiyeri Tween 80, etanol ve/veya DMSO ile belirlenen konsantrasyonlarda desteklenmiş ve bu maddelerin antimikrobiyal etki gösterip göstermediği test edilmiştir. Steril 180 µL BHI sıvı besiyerine 20 µL i içerisinde belirli sayıda test mikroorganizması içeren ekim süspansiyonu inoküle edilmiş ve bu da denemelerde kontrol olarak kullanılmıştır. Bu kuyucuklar aynı zamanda mikrobiyal gelişme referans noktası olarak değerlendirilmiştir. Ortamın sterilitesini kontrol etmek için de bazı kuyucuklarda 200 µL BHI sıvı besiyeri kullanılmıştır (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, CLSI, 2012). *S. aureus* ve *E. coli* için mikrotiter plakalar, 37°C'de 24 saat inkübatörde (VWR Incu-line 390-0353) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası mikrotiter plaka okuyucu (Labsystems Multiskan RC) ile absorbans okunmuştur. Mikroorganizma gelişimi 590 nm'de kontrol kuyucuklarına kıyasla belirlenmiştir. Pozitif ve negatif kontroller her bileşen için üç farklı kuyucuğa uygulanmıştır (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, CLSI, 2012).



Şekil 3.1. Mikrobiyal gelişim inhibisyon analizi deney seti

3.7 Dama Tahtası Analizi

Dama tahtası analizi esansiyel yağ bileşenlerinin kombinasyonların test edilmesi için sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Ancak, bu maddelerin birbirleri ile etkileşimlerini inceleyen standart bir yöntem bulunmamaktadır (Bassolé ve Juliani, 2012).

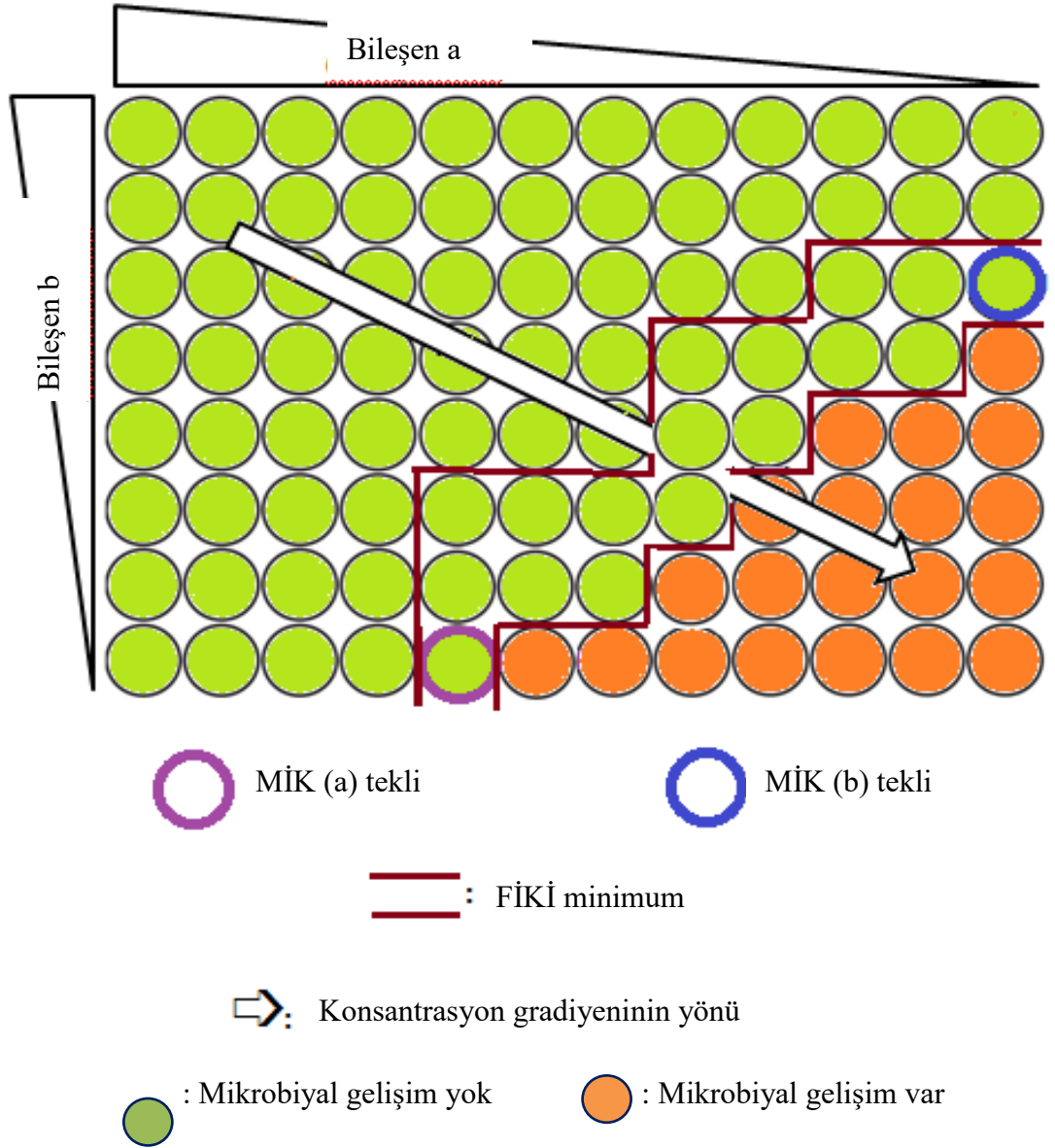
Bu çalışmada, iki esansiyel yağ bileşeninin farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonları dama tahtası analizi ile test edilmiştir (Dougherty vd., 1977; Meletiadis vd., 2010). Denemelerde kullanılan yöntem Şekil 3.2.'de görülmektedir. Dama tahtası analizi ile bileşenler arasındaki sinerjizm, antagonizm, ilaveli ve etkileşimsizlik ölçülebilmektedir.

Bu yöntem için düşük hacimlerdeki sıvı besiyeri ve antimikrobiyal bileşen çözeltisi, polisitren ile muamele edilmiş düz zeminli mikrotiter plakaya (*Falcon®*, REF 353936) aktarılmıştır. İki bileşen için de bireysel ve kombinasyonları için yüksek ve düşük konsantrasyon aralığı belirlenip, bu aralık içinde test edilmişlerdir.

Her bir plaka esansiyel yağ bileşenlerinin özel bir kombinasyonunu içerip, antimikrobiyal aktivitelerini test etmektedir. Bileşen çözeltilerinin 1:1 (90:90 µL) oranlarda kombinasyonları hazırlanmış ve ayrı ayrı filtre ile sterilize edildikten sonra, steril BHI sıvı besiyeri kullanılarak steril tüplerde seri dilisyonları gerçekleştirilmiştir.

Dama tahtası analizi ayrıca esansiyel yağ bileşenlerinin bireysel MİK değerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu testte bakterilerin seyreltilmiş antimikrobiyal bileşen çözeltilerinde gözle görülebilir bir gelişim yapabilme yeteneklerine bakılmaktadır. MİK, inkübasyon sonrası gelişimi önleyen minimum antimikrobiyal konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır (Andrews, 2001).

Bu yöntemde, 90 µL ilk bileşen çözeltisi ile 90 µL ikinci bileşen çözeltisi 96 kuyucuklu mikrotiter plakaya aktarılmakta, kontrol olarak ise 180 µL besiyeri ve %1 Tween 80 kullanılmaktadır. Bu aşamanın ardından 20 µL inokülüm süspansiyonu kuyucuklara inoküle edilmekte ardından, 20 µL BHI sıvı besiyeri antimikrobiyal bileşen çözeltilerinin kombinasyonunu içeren kuyucuklara eklenmektedir. Bu çözeltiler hem şahit olarak hem de bileşen çözeltilerinin sterilitesinin kontrolünde kullanılmaktadır. Son olarak ortam sterilitesinin kontrolü amacıyla bazı kuyucuklara 200 µL besiyeri ilave edilerek deney gerçekleştirilmektedir.



Şekil 3.2. Dama tahtası analizinin deneysel tasarımı

İlk çalışma için, sinnalaldehit, p-çimen ile kombine edilmiştir. Sinnalaldehit konsantrasyonları sırasıyla 16, 12, 8, 4 ve 2 mM olup p-çimen 5, 4, 3 ve mM olarak %1'lik Tween 80 içinde hazırlanmıştır. Toplam olarak 30 kombinasyonun *E. coli*'nin ve *S. aureus*'un üzer farklı suşundaki antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. İkinci çalışmada sinnalaldehitin konsantrasyonları 16, 8, 4 ve 2 mM olarak seçilip 8, 6, 4 ve 2 mM öjenolün %1'lik Tween 80 ile kombine edilip altı farklı bakteri suşuna karşı incelenmiştir. Toplam olarak esansiyel yağ bileşenleri arasındaki etkileşimi incelemek için 25 farklı kombinasyon, çalışılmıştır.

Son çalışmada timol ve α -pinen sırasıyla 2, 1,5 ve 1 mM konsantrasyonlarında (%1'lik Tween 80) ayarlanmıştır. Test bakterileri üzerinde 16 farklı kombinasyon çalışılmıştır. Bütün kombinasyonların 96 kuyucuklu mikrotiter plakadaki son konsantrasyonları Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Denemelerde kullanılan esansiyel yağ bileşenlerinin farklı kombinasyonlardaki son konsantrasyonları

Deney 1		Deney 2		Deney 3	
sinnamealdehit [mM]	p-çimen [mM]	sinnamealdehit [mM]	öjenol [mM]	timol [mM]	α -pinen [mM]
7,20	2,25	7,20	3,60	0,90	0,90
7,20	1,80	7,20	2,70	0,90	0,68
7,20	1,35	7,20	1,80	0,90	0,45
7,20	0,90	7,20	0,90	0,90	0,00
7,20	0,00	7,20	0,00	0,68	0,90
5,40	2,25	3,60	3,60	0,68	0,68
5,40	1,80	3,60	2,70	0,68	0,45
5,40	1,35	3,60	1,80	0,68	0,00
5,40	0,90	3,60	0,90	0,45	0,90
5,40	0,00	3,60	0,00	0,45	0,68
3,60	2,25	1,80	3,60	0,45	0,45
3,60	1,80	1,80	2,70	0,45	0,00
3,60	1,35	1,80	1,80	0,00	0,90
3,60	0,90	1,80	0,90	0,00	0,68
3,60	0,00	1,80	0,00	0,00	0,45
1,80	2,25	0,90	3,60	0,00	0,00
1,80	1,80	0,90	2,70		
1,80	1,35	0,90	1,80		
1,80	0,90	0,90	0,90		
1,80	0,00	0,90	0,00		
0,90	2,25	0,00	3,60		
0,90	1,80	0,00	2,70		
0,90	1,35	0,00	1,80		
0,90	0,90	0,00	0,90		
0,90	0,00	0,00	0,00		
0,00	2,25				
0,00	1,80				
0,00	1,35				
0,00	0,90				
0,00	0,00				

Plakalar *S. aureus* ve *E. coli* için 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası mikrotiter plaka okuyucu ile 590 nm’de absorbans okunmuştur (Labsystems Multiskan RC). Her denemede pozitif ve negatif kontroller de kullanılmış ve esansiyel yağ bileşenlerinin MİK değerinin altında ve gelişim üzerinde azalma olduğu durumlarda iki bileşenin sinerjistik etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

3.7.1 Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyon İndeksi (FİKİ)

Fraksiyonel inhibisyon konsantrasyon indeksi (FİKİ) seçilen bileşenlerin tekli veya kombinasyonlarının MİK değerlerinden türetilmektedir. MİK değerleri fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonuna (FİK) çevrilerek dama tahtası yöntemi ile elde edilen sonuçların incelenmesinde kullanılmaktadır. En etkili kombinasyonun FİK değeri iki esansiyel yağ bileşeninin birbirleriyle etkileşimini sayısal bir tanımda gösteren kantitatif bir değerlendirme olan FİKİ’nin hesaplanmasında kullanılmaktadır (Elion vd., 1954).

Kombinasyonun FİKİ değeri, Denklem 1’deki formül kullanılarak, her bir kuyucuğun FİK değerinin toplamı olarak hesaplanmaktadır. MİK (a) tek başına ve MİK (b) tek başına a ve b bileşeninin bakteri gelişimini engellediği minimum konsantrasyonlardır (Meletiadis vd., 2010). MİK (a) kombinasyon değeri “b” bileşeni içindeki “a” bileşenin MİK değerini, MİK (b) kombinasyon değeri için de aynı mantık kullanılır (Elion vd., 1954; Hyldgaard vd., 2012).

Denklem 1:

$$FİKİ = \frac{MİK(a) \text{ kombinasyon}}{MİK (a) \text{ tekli}} + \frac{MİK(b) \text{ kombinasyon}}{MİK (b) \text{ tekli}}$$

Arikan vd. (2002), Mulyaningsih vd. (2010) ve van Vuuren ve Viljoen (2011)'a göre her kombinasyon için FİKİ değeri aşağıdaki gibi tanımlanmaktadır:

$FİKİ \leq 0,5$ Sinerjik etki,

$0,5 < FİKİ \leq 1$ İlaveli etki,

$1 < FİKİ \leq 4$ Etkisizlik ve

$FİKİ > 4$ Antagonistik etki.

Bu sayısal tanımlar, araştırmacılar için çalışmalarının değerlendirilmesinde kullanılan pratik bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Odds, 2003).

3.8 İstatistiksel Analizler

Sonuçlar üç paralelin ortalaması ve \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Esansiyel yağ bileşenlerinin kontrole karşı antimikrobiyal aktivitelerinde farklılık olup olmadığı ($p < 0,05$) analiz edilmiştir. SPSS 16.0 kullanılarak Shapiro-Wilk testinin ($\alpha = 0,05$) ortalamaları ile verilerin normaliteleri doğrulanmıştır. Verilerin normal dağılım göstermesi durumunda Tukey testi (tek yönlü ANOVA) uygulanmıştır. Bu koşul sağlanmadığında veya dışa düşen veri olduğunda ($n=2$) Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Seçilen Esansiyel Yağ Bileşenlerinin Çözündükleri En Yüksek Konsantrasyonlar

Bu tezde esansiyel yağ bileşenlerinin antimikrobiyal etkilerinin araştırılmasından önce, bu bileşenlerin sürfaktan ve/veya çözücü eklenmiş BHI sıvı besiyerindeki maksimum çözünebilir konsantrasyonları test edilmiştir. Bu bileşenlerin etkilerini optimize etmek için çözeltilerinin homojen bir şekilde dağılımı ve tamamen berrak olmaları önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada kullanılan sürfaktan ve/veya çözücünün miktarı, bu sürfaktan ve/veya çözücünün kendisinin mikrobiyel gelişim üzerine olası etkilerini önlemek için mümkün olduğunca düşük olması önemli rol oynamaktadır. Bileşenlerin solüsyonlarında kullanılan Tween 80, etanol ve DMSO için maksimum konsantrasyonlar sırasıyla %1, %2,5 ve %5'dir.

Esansiyel yağ bileşenlerinin çözeltide homojen bir şekilde dağılmaması durumunda, daha yüksek miktarda sürfaktan ve/veya çözücü ya da bu esansiyel yağ bileşenlerinin daha düşük konsantrasyonları incelenmiştir. Esansiyel yağ bileşenlerinin çözündükleri en yüksek konsantrasyonları nitel olarak belirlenmiş olup Çizelge 4.1.'da verilmiştir.

Buzdolabında muhafaza edilen geranil asetatın, test edilen 2 mM'dan 10 mM'a kadar olan konsantrasyonlarının Tween 80 %1, etanol %2,5, DMSO %2,5, DMSO %1 ve Tween 80 %1'nin kombinasyonu ve etanol %1 ve Tween 80 %1'nin kombinasyonu ile hazırlanan çözeltilerinin hiçbirinde berrak ve homojen dağılım gözlemlenmemiştir. Bu çalışmanın kısıtlamalarını da aşarak, Tween 80 %2,5 ya da etanol %5 konsantrasyonları da test edilmiştir. Ayrıca ayçiçek yağı %1 ve emülgatör olarak Tween 80 %1 ilave edilerek çözünebilir ve berrak sıvı besiyeri elde edilmek istenmiştir. Apolar olan ayçiçek yağı çözünebilir geranil asetat konsantrasyonunu arttırmak için kullanılmıştır. Fakat bu bileşenin çözeltisi berrak değildir ve kullanılan yöntem ile geranil asetatın antimikrobiyal aktivitesini test etmek mümkün olmamıştır.

Sonuç olarak, test edilen geranil asetatın ve sürfaktan ve/veya çözücünün tüm konsantrasyonları ile berrak veya homojen dağılıma sahip bileşenlerin çözeltisini elde etmek mümkün olmamıştır. Bununla birlikte, sudan daha az yoğunluğa sahip bu geranil asetatın suyun üst yüzeyinde görülebilir olması da homojen dağılıma sahip olmadığını kanıtı olmuştur.

Çizelge 4.1. Sıvı besiyerindeki esansiyel yağ bileşenlerinin çözündükleri en yüksek konsantrasyonlarının deneysel verileri

Bileşenler	Konsantrasyon (mM)	Tween 80 (%)	Etanol (%)	DMSO (%)	Sıcaklık (°C)
p-çimen	5	1			50
α-pinen	2	1			40-50
Ocimene	2	1		1	50
Ökalyptol*	25	1			
Sitral	15	1			50
Geraniol*	12,5	1			
Mentol	9	1			40-65
Menton	7	1			40
Mentil asetat	3	1			50
Borneol*	3	1		5	
Kamfor*	3		2,5		
Timol	2	1			55
Geranil asetat**					
Sinamil alkol	35	1			40
Sinnamaldehit*	16	1			
Öjenol*	2	1			
Estragol	2	1			50

*: Isıtma uygulanmamıştır.

** : Homojen dağılım gözlenmemiştir.

Terpenler grubuna dahil olan ocimene ve α -pinen, 2 mM olan maksimum konsantrasyona sahip iken p-çimen'in ise 5 mM maksimum konsantrasyonda çözünebildiği gözlemlenmiştir. Saf bileşenlerin 25°C'deki suda çözünürlüğü üzerine yapılan bir çalışmada terpenler düşük çözünürlüğe sahip iken (0,3 mM'den daha düşük) okside olmuş monoterpenlerin ise en yüksek çözünürlükte olduğu belirlenmiştir (Fichan vd., 1999). Bu çalışmada, bileşenlerin çözeltileri hazırlanırken farklı materyal ve yöntemler kullanılmıştır. Diğer sürfaktan ve/veya çözücü, genellikle daha yüksek sıcaklık ve daha kısa süreli karıştırma uygulanmıştır. Bu sebeple, terpenler ve terpenoitlerin birlikte kullanıldığı berrak sıvı besiyerinde Fichan'ın çalışmasına kıyasla bu bileşenlerin daha yüksek konsantrasyonları kullanılabilmiştir. Suda çözünürlük verilerine bakıldığında α -pinen zayıf çözünürlükte bir terpen olarak belirtilmiştir (Cal, 2006). α -pinen'in suda çözünürlüğü 19,85°C'de 0,13 mM (Cal, 2006) ve 25°C'de 0,037 mM (Fichan vd., 1999) olarak saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada ısı ve sürfaktan olarak Tween 80 kullanılmasının bu esansiyel yağ bileşenlerinin homojen dağılımını geliştirdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada terpenoitlerin, genellikle terpenlere oranla daha yüksek maksimum çözünebilir konsantrasyonlara sahip olduğu tespit edilmiştir. Ökalyptol içeren berrak sıvı besiyeri, diğer düşük su çözünürlükte olan esansiyel yağ bileşenlerine kıyasla daha fazla çözünebilir olduğu ve %1 Tween 80 kullanılarak 25 mM maksimum çözünebilir konsantrasyonu belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada ökalyptol'un sulu çözünürlüğü 19,85°C'da 17,07 mM olarak bulunmuştur (Cal, 2006). Timol ise diğer test edilen terpenoitlere kıyasla 2 mM olan düşük konsantrasyonda berrak sıvı besiyeri elde edilmiştir. Tween 80 ilaveli timol için daha yüksek konsantrasyonlarda küçük partiküller görülmüştür. Tween 80 miseller oluşturabilmekte ve bileşenlerin su bazlı sıvı besiyeri ile temasını engelleyebilmektedir.

Sırasıyla hidroksil ve oksijen grubu içeren ve düz yapıda olan geraniol (12,5 mM) ve sitral (15 mM) yüksek konsantrasyonlarda berrak sıvı besiyeri görünümüne sahip iken asiklik bileşen olan ve ester grubu içeren geraniol asetat da ise aynı durum söz konusu olmamıştır. Diğer bir asiklik bileşen olan ve hiçbir fonksiyonel grup içermeyen ocimene ise düşük çözünürlüklü olarak tespit edilmiştir (2 mM). Daha önce de bahsedildiği üzere geraniol asetat homojen dağılım gösterememiştir.

Bunun sebebi olarak, monosiklik bileşenlerinden olan mentil asetatın da bir asetat grubu içermesi ama geranil asetatın asiklik yapıda olması düşünülmektedir. Ayrıca bir halka yapısına sahip ama çift bağ içermeyen mentol bileşeninin (9 mM) daha yüksek çözünürlük konsantrasyonları bulunurken, bir halka yapılı ama çift bağ içeren timol bileşeninin (2 mM) ise daha düşük konsantrasyonları belirlenmiştir.

Bununla birlikte, en yüksek çözünürlükteki bileşen olan sinamil alkol fenilpropen grubuna dahildir ve 40°C'de 30 dakika boyunca devamlı karıştırıldıktan sonra 35 mM konsantrasyonlara kadar sıvı besiyerinde berrak olarak kaldığı tespit edilmiştir. Ancak estragol ve öjenol bileşenlerinin Tween 80 ile kombine edilmesi sonucunda 2 mM kadar düşük konsantrasyonların çözünebilir özellikte olduğu belirlenmiştir. Bazı esansiyel yağların çözünürlüğünü arttırmak için polar çözücülerle birlikte kullanılması, sıvı besiyerinin bu bileşenleri çözmesinde ve böylece daha homojen bir dağılım elde edilmesinde yardımcı olup; daha yüksek antimikrobiyal aktivite ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir.

Sinamil alkolün maksimum konsantrasyonu (35 mM), sinnalaldehit (16 mM) ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, geraniol (12,5 mM) ve mentol (9 mM) de yüksek konsantrasyonlarda berrak sıvı besiyeri görünümü elde edilmiştir. Bunun sebebinin hidroksil grubunun, bu bileşenlerin homojen dağılımına pozitif etki sağlaması ve sıvı besiyerine berraklık vermesi olabileceği düşünülmektedir. Öjenol de hidroksil grup içermesine rağmen düşük konsantrasyonda (2 mM) çözünebilmiştir fakat bu bileşen eter grubu da içermektedir.

Hidroksil grup içeren bir diğer bileşen de timol olup düşük konsantrasyonda (2 mM) çözünmesi tespit edilmiştir. Ayrıca bu bileşenin fiziksel özelliklerinin oda sıcaklığında toz olması da onu farklı kılar (Oda sıcaklığında sinnalaldehit, geraniol ve öjenol sıvı; sinamil alkol ve mentol ise vaks yapıdadır). Timol bileşenini çözmek oldukça zordur ve yeterli ısı uygulanmadığı takdirde partiküller gözle görünür özellikte olmaktadır. Borneolun (3 mM), timol ile benzer yapıya sahip olduğu bilinmektedir. Bu iki bileşen de hidroksil grubu içermektedir ve oda sıcaklığında katı olduğu bilinmektedir. Fakat borneol bisiklik, timol ise monosiklik yapıdadır. Hidroksil grubunun pozisyonundaki farklılıklar ve diğer yan zincirler, bileşenlerin oda sıcaklığında katı yapıda olmalarını sağlamaktadır. Bu da çözünürlükteki farklılıklara neden olmaktadır. Örneğin, bileşenlerin fonksiyonel grup olarak sadece hidroksil

grubu içermesi, timol ve borneol gibi toz bileşenler hariç, su bazlı sıvı besiyerindeki esansiyel yağ bileşenlerinin konsantrasyonlarını arttırdığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, esansiyel yağ bileşenlerinin çözeltilerinin çoğuna orta derece ısı uygulandığında daha kolay çözüldüğü belirlenmiştir. Bu bulgular, orta derece ısının esansiyel yağ bileşenlerinin homojen dağılımına pozitif yönde katkı sağladığını göstermiştir. Diğer bir çalışmada, α -pinen, β -pinen, p-çimen, timol, borneol, ökaliptol, karvakrol, linalool, terpineol-4-ol, kamfor ve α -terpinyl asetat bileşenlerine orta derece ısı uygulamasının (54 °C/10 dakika) etkinliklerini arttırdığı tespit edilmiştir (Ait-Ouazzou vd., 2011). Bu esansiyel yağ bileşenlerin 0,2 µl/ml ile orta derece ısı uygulamasının 0,5-5 log hücre inaktivasyonu sağlayarak sinerjistik lethal etkiler gözlemlenmiştir. Isı uygulanması daha düşük konsantrasyonlarda esansiyel yağ bileşenleri kullanımına ve bu yüzden yoğunluğunu azaltıp gıda kalitesini (duyusal ve besinsel özelliklerini kapsayan) arttırmasına katkısı olmaktadır (Ait-Ouazzou vd., 2011).

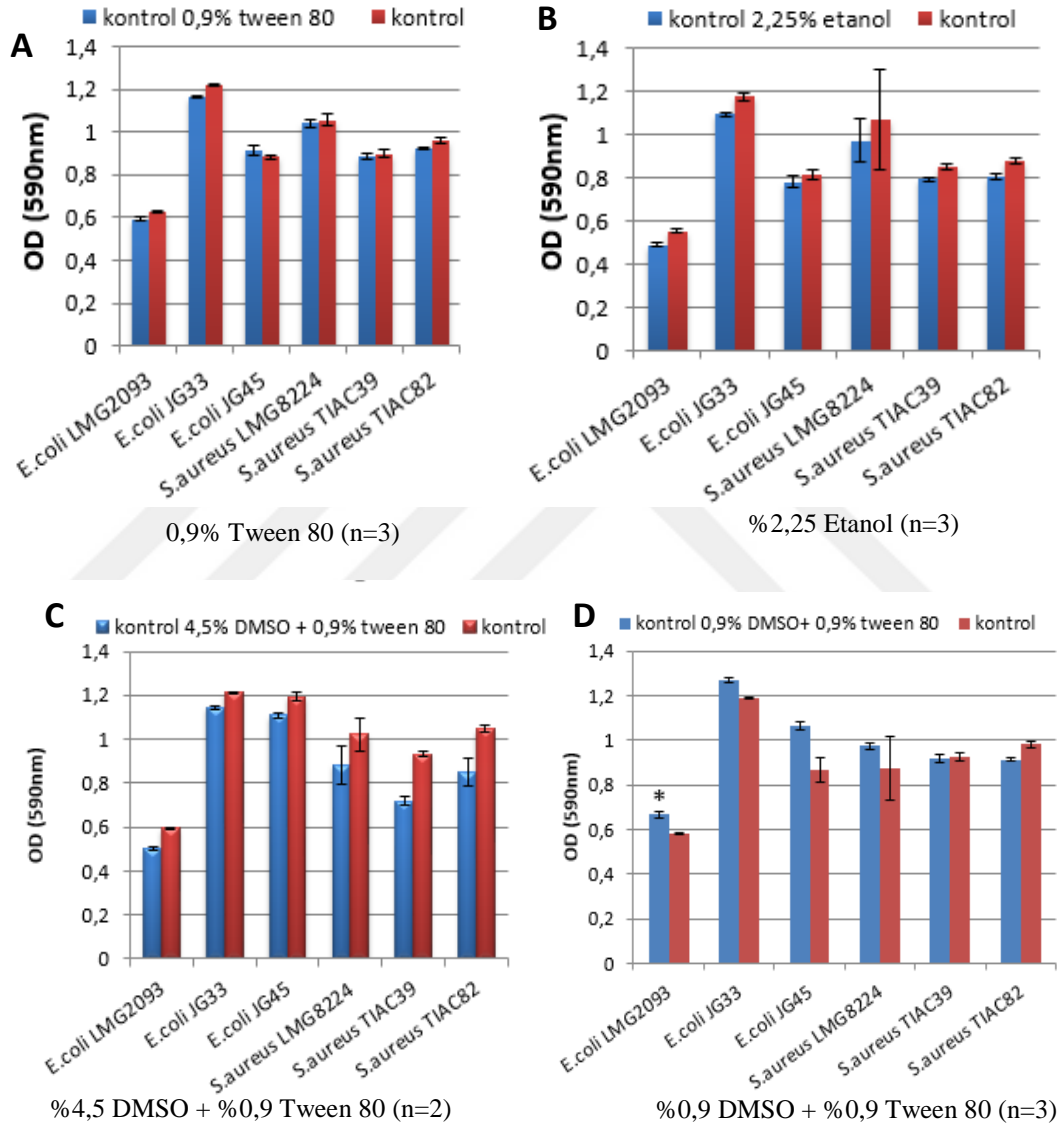
%1 Tween 80'nin BHI sıvı besiyerindeki pH değeri 7,44 olup (n=13)diğer sürfaktan ve/veya çözücünün BHI sıvı besiyerindeki pH değerlerinin ise yaklaşık 7,53 olduğu belirlenmiştir. Bileşenlerin çözeltilerinin BHI sıvı besiyerindeki pH değerlerinin de 7,11 ve 7,61 arasında olduğu saptanmıştır. Bu bulgular çalışmadaki gözlemlenen antimikrobiyal etkinin, BHI sıvı besiyerindeki bakteri gelişimini etkileyen optimal pH'dan daha düşük pH değerlerinden kaynaklanmadığını göstermektedir.

4.2 Esansiyel Yağ Bileşenlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin *in vitro* Değerlendirmesi

4.2.1 Sürfaktan ve/veya Çözgenin Antimikrobiyal Aktivitesi

Çizelge 4.2.'te gösterildiği gibi esansiyel yağ bileşenlerinin en yüksek çözünürlük değerini vermesi için belirlenen oranlarda etanol, Tween 80 ve/veya DMSO ile desteklenen BHI sıvı besiyerinin antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Eklenen bu maddelerin *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal etki göstermediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.). Bu maddeleri içeren ve içermeyen kontrol

grupları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Bu maddelerin potansiyel antimikrobiyal aktivitelerinin bilinmesi önem taşımaktadır. Ancak, birçok araştırmacı potansiyel antimikrobiyal aktivite üzerine yorum yapmamıştır ve bu durum sonuçların karşılaştırılmasını zorlaştırmıştır. Buna ilaveten, kör çalışmanın olası etkisi de önemli olup dikkate alınması gerektiği düşünülmektedir.



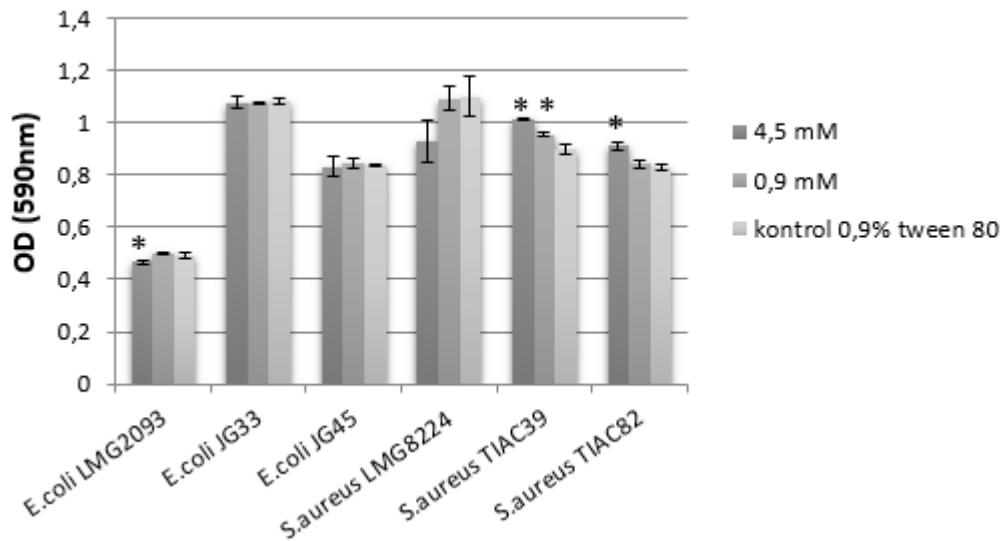
Şekil 4.1. Etanol, Tween 80 ve/veya DMSO maddelerinin antimikrobiyal etkisi

Bazı bileşenler için A grafiği, kamfor için B grafiği, borneol için C grafiği ve ocimene için D grafiğindeki çözeltiler kullanılmıştır. Bazı esansiyel yağ bileşenleri ile Tween 80 kullanıldığında her set için bu emülgatörün antimikrobiyal aktivitesi analizlenmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ve Mann-Whitney U testine göre farklılıklar ($\alpha = 0,05$) da yıldız ile gösterilmiştir.

4.2.2 Terpenlerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Terpenlerde (ocimene, α -pinen ve p-çimen) düşük miktarda antimikrobiyal aktivite gözlemlenmiştir. Bu durum terpenlerin yüksek uçuculuğu ve düşük çözünürlüğü ile bağdaştırılabilmektedir (Fichan vd., 1999). Ayrıca, kullanılan konsantrasyonlar antimikrobiyal etki için düşük kalmış olabilmek ile birlikte yüksek konsantrasyonlarda da bileşen çözeltilisinde berraklık görülmemiştir. Şekil 4.2.'te p-çimenin antimikrobiyal aktivitesi gösterilmektedir.

Bu bileşen, seçilen bakterilere karşı çok az miktarda etki göstermiştir. 4,5 mM konsantrasyonda *E. coli* LMG2093 üzerinde önemli derecede gelişmeyi engelleyici etki göstermesine rağmen inhibisyonun oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir. Aynı konsantrasyonda *S. aureus* LMG8224 üzerine etkisi daha fazla olmasına rağmen önemli farklılıklar görülmemiştir. p-çimenin etki mekanizması onların sitoplazmik membran üzerine seçicilikleri, membranın genişlemesi ve membran potansiyelini düşürmesini içermektedir (Ultee vd., 2002). Ayrıca entalpide ve hücre hareketliliğinde düşüşe sebep olmaktadır (Burt vd., 2007; Cristani vd., 2007).



Şekil 4.2. p-çimenin antimikrobiyal etkisi

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Önemli farklılıklar yıldız (*) ile gösterilmiştir (Her suş için, ANOVA, $n = 3$, $\alpha = 0,05$ sadece 4. suş için, Mann-Whitney U testi, $n \geq 2^1$, $\alpha = 0,05$).

¹: 4,5 mM p-çimen ile muamale görmüş *S. aureus* LMG8224 çalışmasında bir adet dış veri vardır. Bu yüzden kombinasyon için $n = 2$ alınmıştır.

Terpenler üzerine yapılan önceki *in vitro* çalışmalarda tekli kullanılmaları durumunda yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadıkları tespit edilmiştir (Hyldgaard vd., 2012). Örnek olarak, agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak 638,5 mM kadar yüksek konsantrasyonda bile p-çimenin Gram (-) *Shigella* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği saptanmıştır (Bagamboula vd., 2004).

Bir başka çalışmada ise swab kağıdı disk yöntemi kullanılarak 7,45 mM konsantrasyonda p-çimen kullanımının dört çeşit *Salmonella enterica* Typhi serotipi suşlarının gelişimini sınırlayamadığı bildirilmiştir (Rattanachaikunsopon ve Phumkhachorn, 2009).

Aynı bileşenin 3,2 mM konsantrasyonunda da *Saccharomyces cerevisiae* üzerinde etki göstermediği saptanmıştır (Rao vd., 2010). *S. aureus* (ATCC 6538) üzerinde orta değerlerde engelleyici etki görülse de *Enterococcus faecium*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7 ve iki farklı *Listeria monocytogenes* suşlarında hiçbir etki olmadığı saptanmıştır (Ait-Ouazzou vd., 2011).

p- çimenin *E. coli* üzerinde antimikrobiyal etki görülmemiş olup, *S. aureus* ve *Bacillus subtilis* üzerinde az miktar gelişmeyi engelleyici etki görülmüştür (Koutsoudaki vd., 2005). Yapılan bu tezdeki çalışmalardan elde edilen sonuçların literatür ile benzer olduğu bilinmektedir.

p-çimen'nin MİK değerinin gelişme inhibisyon analizinde 4,5 mM değerinden yüksek olduğu dama tahtası analizinde ise *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı 2,25 mM değerinden yüksek MİK değerinin olduğu belirlenmiştir (n = 1) (Çizelge 7).

Yapılan bir çalışmada *S. aureus* (ATCC 6538P), *E. faecalis* ve *C. albicans* bakterilerine karşı p-çimenin MİK değeri 4,47 mM olarak saptanmış olup, *E. coli* (ATCC 8739), *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Salmonella* sp. üzerinde hiçbir etki tespit edilmemiştir (Höferl vd., 2009). Bu araştırmada aynı konsantrasyon, farklı yöntem ve farklı suşlar kullanılarak çalışılmıştır. p-çimen üzerine yapılan bir başka çalışmada *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. aureus* (ATCC 6538) için 36 mM'dan daha yüksek MİK değerleri belirlenmiştir (Veldhuizen vd., 2006). Sonuç olarak, esnsiyel yağ bileşeninin uygulanma yöntemi ile kullanılan emülgatör ve çözümler literatür ile farklılık gösterebilmektedir.

Ayrıca, bahsedilen çalışmalarda sürfaktan/çözücü kontrolleri değerlendirmeye alınmadığı için karşılaştırma yapılmasını zorlaştırmaktadır.

Bu tezde α -pinen (1,8 mM) ve ocimene (1,8 mM) gibi terpenler de test edilmiştir. Bu bileşenlerin yüksek (1,8 mM) ve düşük (0,9 mM) konsantrasyonlarda *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı etki göstermediği saptanmıştır (sırasıyla Ek A ve B). Kullanılan konsantrasyonların bu bileşen için düşük kalmış olabileceği düşünülmektedir.

α -pinen ve β -pinen maddelerinin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan araştırmalarda, agar difüzyon tekniği kullanılarak *E. coli* ve *S. aureus*'u da içeren 25 farklı bakteri üzerinde çok az ya da hiç etki görülmediği bildirilmiştir (Dorman ve Deans, 2000). Ayrıca disk difüzyon hassasiyeti yöntemi kullanımında da bu bileşenlerin, *E. coli*, *S. aureus* ve *B. subtilis* üzerindeki etkileri araştırıldığında benzer sonuçlar tespit edilmiştir (Koutsoudaki vd., 2005).

Ait-Ouazzou vd., 2011, yaptığı çalışmada α -pinen ve β -pinenin, *S. aureus*, *E. faecium*, *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* ve iki farklı *L. monocytogenes* suşunda gelişimi önleyemediği bildirilmiştir. Bu tezde α -pinen için MİK değerinin dama tahtası analizinde 1,8 mM'den yüksek olduğu tespit edilmiştir.

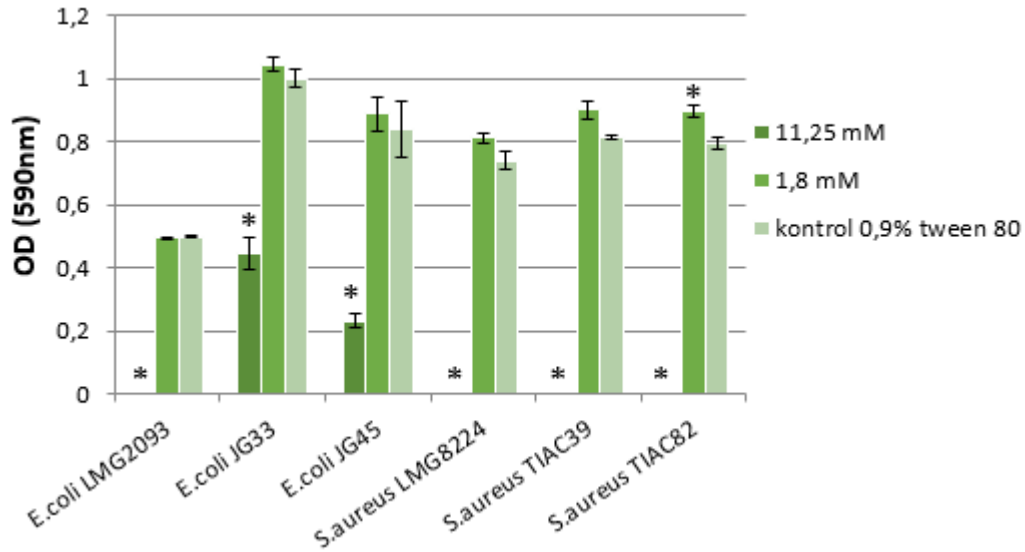
Ahmad vd. (2014) çalışmasında, (+) α -pinen, (-) α -pinen ve β -pinen için *Chromobacterium violaceum* ve *P. aeruginosa* bakterilerine karşı MİK değerinin 3,67 mM'den yüksek olduğunu belirlemiştir. Bu bilgiler de yapılan çalışmadaki sonuçlar ile paralel olup bu esasnsiyel yağ bileşenlerinin tek başlarına kullanımında geniş bir mikroorganizma çerçevesinde yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını göstermektedir.

4.2.3 Terpenoitlerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Geraniol'ün yüksek oranda antimikrobiyal aktivitesi tespit edilmiş olup Şekil 4.3.'te gösterilmektedir. Bir monoterpenoit alkol olan geraniol 11,25 mM konsantrasyonda bütün *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı önemli oranda antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Geraniol, bakterinin membran yapısı ve fonksiyonları ile etkileşime girerek membranın geçirgenliğini artırarak antibakteriyel etki gösterdiği düşünülmektedir (Ilić vd., 2014).

Yapılan çalışmada 1,8 mM gibi düşük konsantrasyonlarda bile *S. aureus* TIAC82'nin mikrobiyal gelişimine oldukça fazla etkisinin olduğu gözlenmiştir. Geraniol, *E. coli*'ye oranla *S. aureus* üzerinde daha fazla etki göstermektedir. Bu durum Gram (+) ve Gram (-) hücre duvarı yapıları ile ilişkilendirilebilmektedir (Yvette, 2005). Geraniol gibi hidrofobik grupların yüksek oranda peptidoglukan içeren Gram (+) bakteri duvarından geçmesinin daha kolay olduğu bildirilmiştir (Nazzaro vd., 2013), Gram (-)'lerde ise dış membran geçirgenlik bariyeri görevi yaparak proteinleri periplasmik alanda tutmaktadır (Yvette, 2005). Bütün bu farklılıklar geraniolün *S. aureus* üzerinde daha yüksek antimikrobiyal etki göstermesini açıklayabilmektedir.



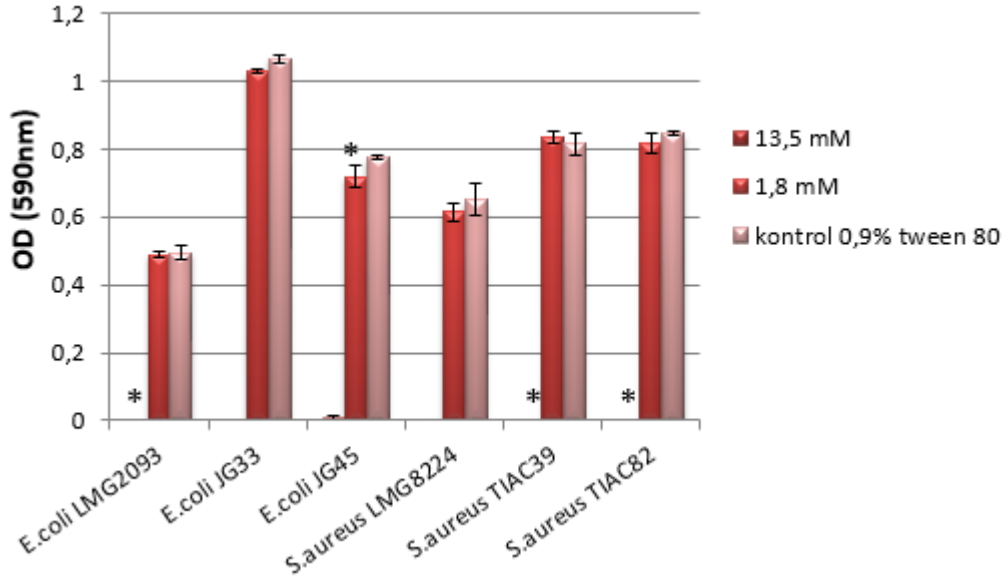
Şekil 4.3. Geraniolün antimikrobiyal aktivitesi

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Önemli farklılıklar yıldız (*) ile gösterilmiştir (2., 3. ve 6. suşlar için, ANOVA, $n = 3$, $\alpha = 0,05$ ve 1., 4. ve 5. suşlar için, Mann-Whitney U testi, $n \geq 2^1$, $\alpha = 0,05$). ¹: 1,8 mM geraniol ile muamele gören *E. coli* LMG2093 verilerinde bir adet dış veri vardır bu yüzden kombinasyonda $n = 2$ alınmıştır.

Bir başka çalışmada agar difüzyon tekniği kullanılarak geraniolün, *E. coli* ve *S. aureus*'u da içeren 23 farklı bakteriye karşı düşük antimikrobiyal aktivitesi; *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecalis* bakterilerinde ise orta seviyede inhibisyon etkisi tespit edilmiştir (Dorman ve Deans, 2000). *E. coli* (ATCC 25922) ve *S. aureus* (ATCC 25923 ve ATCC 29213) için MİK değerleri sırasıyla 8,9 ve 17,9 mM olarak belirlenmiştir (Ilić vd., 2014). Bu çalışmada geraniolün *E. coli* LMG2093 ve bütün *S. aureus* suşları için MİK değeri 11,25 mM'den düşük 1,8 mM'den yüksek, diğer *E. coli* suşları için ise MİK değeri 11,25 mM'den yüksek olarak belirlenmiştir. Ayrıca Ilić vd., 2014 tarafından yapılan çalışmada, %70'lik etanol ile hazırlanan geraniolün *S. aureus*'a karşı olan MİK değerinin bu tezdeki sonuçlara göre daha yüksek belirlenmiştir. Bu çalışmada aynı yöntem farkı suşlara uygulanmış olup, etanol yerine Tween 80 ve düşük inokülüm konsantrasyonu kullanılmıştır. Bu faktörler esansiyel yağların MİK değerine etki edebilmektedir. Yapılan çalışmadaki koşullar, *S. aureus*'a karşı daha yüksek antimikrobiyal etki görülmesine sebep olmuştur.

Aynı cins bakterilere karşı geraniol ile yapılan çalışmalardaki MİK değerleri değişiklik göstermektedir. Örnek olarak, yatık agar ile emülsifiye edilen geraniolün *E. coli*, *S. aureus* (ATCC 21212) ve *B. cereus* için MİK değeri 1440,8 mM olarak belirlenmiştir (Gallucci vd., 2009). Diğer çalışmalarda geraniolün MİK değeri *S. aureus* ve *E. coli* için sırasıyla 0,38 mM (Jirovetz vd., 2007) veya 8,1 mM (Ngan vd., 2012) olarak belirlenmiştir. Geraniolün bu çalışmada kullanılan cinsler dışında *Chromobacterium violaceum* ve *P. aeruginosa*'ya karşı MİK değeri 0,81 mM olarak bildirilmiştir (Ahmad vd., 2014).

Monoterpenoit aldehit olan sitralın bu çalışmada kullanılan bütün mikroorganizmalara karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4.). Bütün *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı 13,5 mM konsantrasyonunda antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bu bileşen aynı zamanda oldukça düşük konsantrasyonlarda bile (1,8 mM) *E. coli* (JG45)'ye karşı düşük de olsa önemli antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Sitral, hücre membranına zarar vererek etki göstermektedir (Hyldgaard vd., 2012). Bu çalışmada sitralin MİK değeri 1,8 mM ve 13,5 mM arasında belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Sitralin antimikrobiyal aktivitesi

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Önemli farklılıklar yıldız (*) ile gösterilmiştir (1., ve 5. suşlar için, ANOVA, $n = 3$, $\alpha = 0,05$ ve 2., 3., 4. ve 6. suşlar için, Mann-Whitney U testi, $n \geq 2^1$, $\alpha = 0,05$). ¹: 13,5 mM sitral ile muamele gören *E. coli* JG33 verilerinde bir adet dış veri vardır bu yüzden kombinasyonda $n = 2$ alınmıştır.

Yapılan bir çalışmada agar dilüsyon yöntemi uygulanarak sitralin, *S. aureus* ATCC 9144 (C7001)'e karşı MİK değeri 3,52 mM olarak belirlenmiş olup, *E. coli* O157:H7'de üzerinde inhibisyon gözlemlenmemiştir. Agar, %0,5 Tween 20 ile kombine edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında Gram (+) olan *S. aureus*'un Gram (-) olan *E. coli*'ye oranla daha duyarlı olduğunu göstermiştir (Fisher ve Phillips, 2006). Hacmen %1'lik Tween 80 içeren sitralin agar seri tüp seyreltme yöntemi ile *S. aureus* (ATCC 6538P) ve *E. coli* (ATCC 8739)'a karşı antimikrobiyal aktivitesini inceleyen bir çalışmada MİK değeri 0,39 mM olarak belirlenmiştir (Jirovetz vd., 2007). Ancak farklı koşullar, farklı yöntemler ve farklı suşlar bu çalışmada kullanılmıştır.

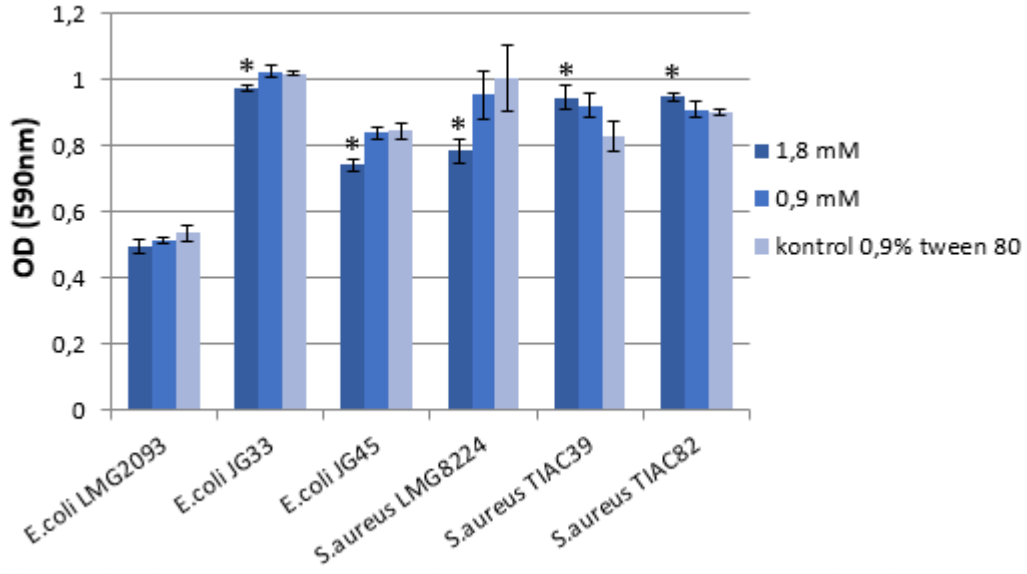
Sitral, mikrodilüsyon yöntemi ile üç farklı *S. aureus* suşuna karşı 0,39 ve 0,52 mM MİK değerlerinde yüksek oranda mikrobiyal gelişmeyi önceliyici aktivite göstermiştir. Ayrıca bu bileşen agar dilüsyon yöntemi ile aynı bakteriler üzerine kullanıldığında 0,65 ve 0,98 mM gibi daha yüksek MİK değerleri saptanmıştır. Araştırmacılar 2-propanol içinde %10'luk (w/v) sitral stok çözeltisi kullanmışlardır (Apolónio vd., 2014).

Bu tez çalışmasında ise hacmen %1'lik Tween 80 uygulanmıştır. Bu sonuçlardan, mikrodilüsyon yönteminin agar dilüsyon yöntemine oranla daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebi olarak esansiyel yağ bileşenlerinin düşük suda çözünürlüğe sahip olmaları ve agarın içine geçememeleri olarak gösterilebilmektedir.

Sadece suda çözünürlüğü iyi olan 1,8-sineol, carvone, terpinen-4-ol ve α -terpineol agar matrisine geçebilmektedir. Agarın yüzeyinde kalan veya uçan hidrokarbon bileşenler de antimikrobiyal aktiviteyi azaltmaktadır. Ayrıca agar olmayan ortamlarda mikrodilüsyon yöntemi uygulandığında esansiyel yağların daha iyi bir dilüsyonu elde edilmektedir ve bu da besiyerine geçişin iyi olması anlamına gelmektedir (Griffin vd., 2000; Soković vd., 2009). Sitral, Avrupa Komisyonu tarafından gıda ürünlerinde aroma verici olarak kabul edilmiştir (Regulation EU 872/2012) (Apolónio vd., 2014).

Monoterpenoit fenol olan timolün test edilen mikroorganizmalar üzerinde çok az etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5.). Bu bileşen, 1,8 mM konsantrasyonda *E. coli*'nin iki ve *S. aureus*'un bir suşu üzerinde çok fazla inhibisyon göstermese de önemli derecede mikrobiyal gelişmeyi engelleyici etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın timolün aynı konsantrasyonda *S. aureus* TIAC39 ve *S. aureus* TIAC82 üzerinde gelişmeyi pozitif yönde etkilediği belirlenmiştir.

Timolün etki mekanizması iç ve dış membrana hasar verme, membran proteinleri ve hücre içi hedeflerle etkileşime girme olarak sıralanabilmektedir (Hyldgaard vd., 2012). Ayrıca sitrat metabolik yoluna etki ederek ATP sentezinde direkt veya dolaylı olarak etkisi olan enzimleri inhibe etmektedir (Di Pasqua vd., 2010).



Şekil 4.5. Timolün antimikrobiyal aktivitesi

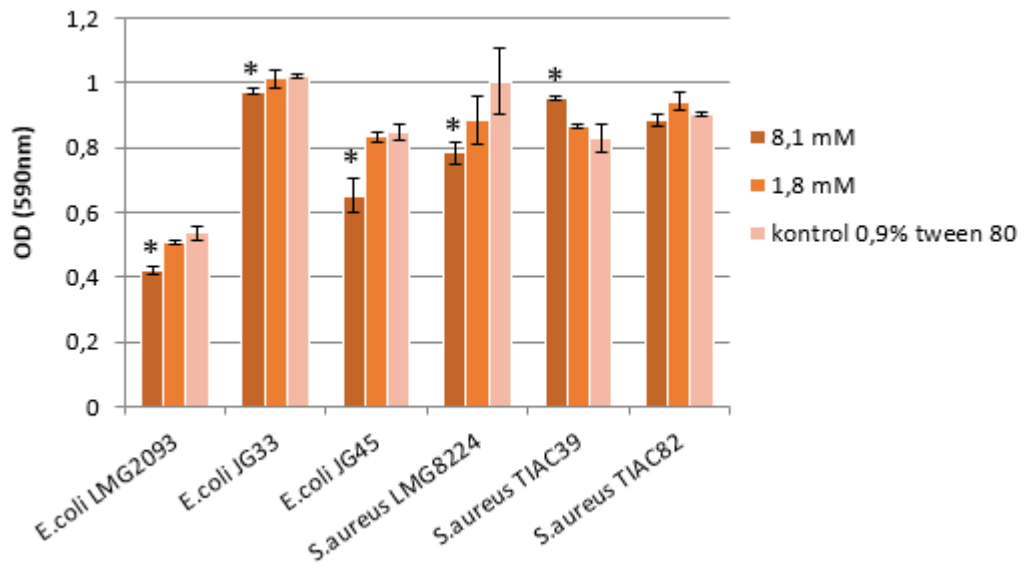
Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Önemli farklılıklar yıldız (*) ile gösterilmiştir (Bütün suşlar için, ANOVA, $n = 3$, $\alpha = 0,05$).

Literatürde yatık agar ile kombine edilmiş timolün, Gram (-) *E. coli*'ye karşı MİK değeri 100,32 mM, Gram (+) *S. aureus* (ATCC 21212) ve *B. cereus*'a karşı 50,13 mM olarak belirlenmiştir (Gallucci vd., 2009). Ayrıca, Ilić vd. (2014) çalışmasında %70'lik etanol ile hazırlanmış timolün, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. aureus* ATCC 29213'a karşı MİK değerlerini sırasıyla 10,39 mM, 0,65 mM ve 5,19 mM olarak saptamıştır.

Ancak Hussain vd. (2011) yaptığı çalışmada DMSO ile desteklenen timolün, *E. coli* (ATCC 8739), *E. coli* (NCTC 10418), *S. aureus* (NCTC 1803) ve *S. aureus* (NCTC 6571)'a karşı MİK değerlerini sırasıyla 6,06 mM, 5,93 mM, 3,67 mM ve 3,59 mM olarak belirlemiştir. Bir başka çalışmada %0,5 etanol ile hazırlanan timolün, *E. coli* CIP 105182'ye karşı MİK değeri 4,66 mM olarak belirlenmiştir (Bassolé vd., 2010). Belirtilen bütün çalışmalarda aynı cins bakteri ve mikrodilüsyon yöntemi uygulanmasına rağmen farklı MİK değerleri gözlemlenmektedir. Bu durum kullanılan timolün farklı yöntemlerle hazırlanmasıyla ilişkilendirilebilmektedir.

Monoterpenoit alkol olan mentol, test edilen bütün *E. coli* suşları ile *S. aureus*'un bir adet suşuna karşı 8,1 mM konsantrasyonda önemli derecede mikrobiyal gelişmeyi önleyici etki göstermiş olmasına rağmen inhibisyonun oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6.).

Ayrıca bu bileşenin aynı konsantrasyonda *S. aureus* TIAC39 üzerinde gelişmeyi pozitif yönde etkilediği saptanmıştır. Bu bileşen membran geçirgenliğine zarar vererek hücrel bileşenlerin dışarı sızmasını sağlamaktadır ve buna ek olarak hücre içi bileşenler ile de etkileşime girebilmektedir (Hyldgaard vd., 2012).



Şekil 4.6. Mentolün antimikrobiyal aktivitesi

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Önemli farklılıklar yıldız (*) ile gösterilmiştir (Bütün suşlar için, ANOVA, $n = 3$, $\alpha = 0,05$).

Gallucci vd. (2009) yatık agarda mikrodilüsyon yöntemi ile hazırlanan mentolün, *E. coli*, *S. aureus* (ATCC 21212) ve *B. cereus* bakterilerine karşı MİK değerlerinin 5695,27 mM'dan yüksek olduğunu tespit etmiştir. Bir başka çalışmada %0,5 etanol ile desteklenen ve mikrodilüsyon yöntemi ile hazırlanan mentolün, *E. coli* CIP 105182'ye karşı MİK değerinin 74,87 olduğu belirlenmiştir (Bassolé vd., 2010). Bu sonuçlar incelendiğinde yapılan birçok çalışmada oldukça büyük farklılıklar olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, timol ve mentolün etkileri incelendiğinde test edilen bakteriler karşısında gelişimi inhibe etmedikleri tespit edilmiştir. Önemli bir düşüş görüldüğünde bile etki oldukça düşük olup uygulamalarda önemsiz olabileceği düşünülmektedir (< 1 log azalma).

Yapılan bu çalışmada test edilen ökaliptol (22,5 mM), menton (6,3 mM), mentil asetat (2,7 mM), borneol (2,7 mM) ve kamfor (2,7 mM) gibi diğer diğer terpenoitler düşük ve yüksek miktarlarda bütün *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı etkisiz olarak belirlenmiştir (sırasıyla Ek C, D, E, F ve G).

Yapılan benzer bir çalışmada ökaliptolün *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı MİK değeri 74,6 mM olarak belirlenmiştir (Wang vd., 2012). Sıvı besiyeri mikrodilüsyonu, inkübasyon koşulları, sürfaktan çeşidi (Tween 80) ve son inokülüm konsantrasyonu bu tezde yapılan çalışma ile aynıdır. Sadece diğer çalışmadaki son Tween 80 konsantrasyonu %0,5 daha düşüktür.

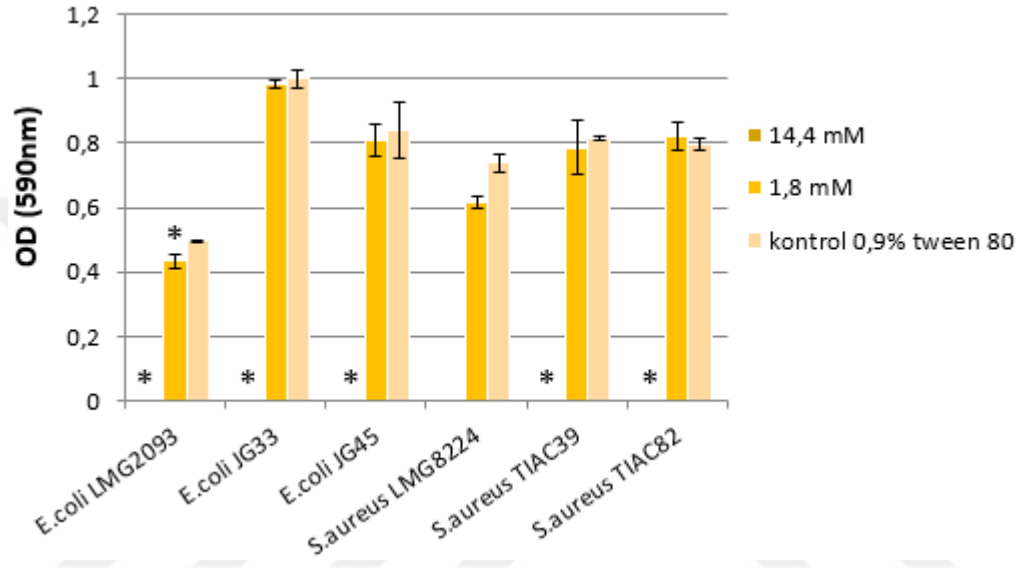
Bu tezdeki ile aynı koşullarda yapılan bir başka çalışmada *E. Coli*'ye karşı ökaliptolün MİK değerinin 51,8 mM'dan yüksek olduğu ve *S. aureus* için de 414,9 mM belirlenmiştir (Mulyaningsih vd., 2010). Özet olarak bu tezde kullanılan ökaliptol konsantrasyonunun (22,5 mM) test edilen bakterilere karşı gelişmeyi önleyici etkisini gözlemlemek için düşük olduğu sonucuna varılabilmektedir.

4.2.4 Fenilpropenlerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Fenilpropen aldehit olan sinnamaldehitin 14,4 mM konsantrasyonda bütün *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösteren etkili bir esansiyel yağ bileşeni olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7.). Buna ilaveten, 1,8 mM gibi düşük konsantrasyonlarda bile *E. coli* LMG2093 üzerinde küçük de olsa önemli bir gelişmeyi önleyici etki göstermiştir.

Bu çalışmada sinnamaldehitin MİK değeri bütün suşlar için 1,8 ve 14,4 mM konsantrasyon aralığında olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, bu bileşenin dama tahtası analizinde (n=2) bütün *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı MİK değeri 1,8-3,6 mM aralığında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 7).

Bu bileşen üç farklı olası etki mekanizmasına sahip olmaktadır. Düşük konsantrasyonlarda sitokin etkileşimlerinde veya daha az önemli hücre fonksiyonlarında işlevi olan enzimleri inhibe ettiği söylenmektedir. Öldürücü dozun altındaki konsantrasyonlarda ATPaz aktivitesini inhibe etmekte ve öldürücü dozda da membranın bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu bileşen hücre hareketliliğini de düşürmektedir (Hyldgaard vd., 2012).



Şekil 4.7. Sannamaldehyitin antimikrobiyal aktivitesi

Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Önemli farklılıklar yıldız (*) ile gösterilmiştir (Bütün suşlar için Mann-Whitney U testi, $n = 3$, sadece 4. suş için $n \geq 2^1$, $\alpha = 0,05$). ¹: 1,8 mM sannamaldehyit ile muamele gören *S. aureus* LMG8224 verilerinde bir adet dış veri vardır bu yüzden kombinasyonda $n = 2$ alınmıştır.

Pei vd. (2009) yaptığı çalışmada sannamaldehyitin *E. coli*'ye karşı MİK değerini 3,02 mM olarak tespit etmiştir. Çalışmada aynı inokülüm konsantrasyonları, yöntem ve emülgatör kullanılıp Tween 80 konsantrasyonu belirtilmemiştir. Ayrıca besiyerinin ve test edilen suşların da farklı olduğu bilinmektedir.

Bir başka çalışmada modifiye agar-kuyu difüzyon tekniği kullanılarak sannamaldehyitin, *E. coli* (DMST 4212)'ye karşı MİK değeri 99,28 mM; *E. coli* O157: H7 (DMST 12743) ve *S. aureus* (DMST 8840)'a karşı ise MİK değerleri sırasıyla 49,64 ve 12,39 mM olarak belirlenmiştir (Sanla-Ead vd., 2012).

Sinnamaldehytin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan bir başka çalışmada mikrodilüsyon yöntemi uygulanarak *E. coli*'nin *S. aureus*'a oranla bu bileşene daha hassas olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmadaki MİK değerleri sırasıyla 1,99 mM ve 2,48 mM olarak tespit edilmiştir (Ghosh vd., 2013). Bu durum esansiyel yağ bileşenlerinin Gram (-) bakteriler üzerinde daha az etkili olması gerçeği ile istisna oluşturmaktadır. Ancak sinnaldehytin Gram (+) bakterilere karşı daha etkili olduğu da vurgulanmaktadır (Domadia vd., 2007).

Başka çalışmalarda sinnaldehytin *E. coli*'nin farklı suşları üzerine MİK değerleri 1,5 µM ile 3,78 mM arasında değişmektedir. Bununla birlikte bu bileşenin üç farklı *S. aureus* suşuna karşı 1,89 mM MİK değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Guzman, 2014). Bu çalışmada sinamil alkol (31,5 mM), öjenol (1,8 mM) ve estragol (1,8 mM) gibi başka fenilpropenlerin de antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonucunda bu bileşenlerin düşük ve yüksek konsantrasyonlarının neredeyse tüm *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı etkisiz olduğu gözlemlenmiştir (sırasıyla Ek H, I ve J).

Özellikle *Cinnamomum* türleri ve *Lauraceae* bitkilerinde olup daha başka birçok esansiyel yağda bulunan sinamil alkol bakteri ve küf türlerine karşı çok az miktarda gelişmeyi inhibe edici etki göstermiştir (Guzman, 2014). Visvalingam vd. (2013) sıvı besiyeri mikrodilüsyon analizini kullanarak sinamil alkolün *E. coli* O157:H7'ye karşı MİK değerini 11,9 mM olarak belirlemiştir. Bu değer bu tezde bulunan sonuca göre düşük kalmıştır. Bu tezde farklı bir yöntem, DMSO yerine Tween 80 ve farklı suşlar kullanılmıştır. Bütün bu parametreler sinamil alkolün test edilen bakterilere karşı antimikrobiyal etkisini etkilemektedir.

Bütün *S. aureus* ve *E. coli* suşlarına karşı test edilen %0,9 Tween 80 ile kombine edilmiş en etkili bireysel esansiyel yağ bileşenleri geraniol, sitral ve sinnaldehyttir. Bu ürünlerin konsantrasyonları sırasıyla 11,25, 13,5 ve 14,4 mM olarak kullanılmıştır. Diğer esansiyel yağ bileşenleri aynı koşullarda belirgin bir antimikrobiyal etki göstermemektedir.

Buna ilaveten *Cinnamomum zeylanicum* yağı trans-sinnamaldehyti, temel bileşeni olarak yüksek oranda içermektedir (%62,79) (Simic vd., 2004). Bu tezde aynı konsantrasyonda (14,4 mM ya da 0,19%) sinnaldehytin kullanılması için %0,3 tarçın yağının sıvı besiyerine eklenmesi gerekmektedir.

Gupta vd. (2008) yaptığı çalışmada agar kuyu difüzyon yöntemini kullanarak marketten toplanmış *C. Zeylanicum*'un, *S. aureus* ve *S. Epidermidis*'e karşı MİK değerini %2,5 olarak tespit etmiştir.

Hammer ve Heel (2012) sıvı besiyeri mikrodilüson yöntemi ile sinnamaldehitin, *S. aureus* ATCC 10442, *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. epidermidis* ATCC 12228'e karşı MİK değerlerini sırasıyla %0,012 (0,91 mM), %0,006 (0,45 mM) ve %0,1 (7,57 mM) olarak belirlemiştir. Gupta vd. (2008) ve Hammer ve Heel (2012) neredeyse aynı deneysel materyalleri ve koşulları kullanmıştır. Sonuç olarak, ticari saf sinnamaldehit, tarçın yağındakine oranla bakterilere karşı daha fazla etki göstermektedir.

4.3 Esansiyel Yağ Bileşenleri Arasındaki Etkileşimler

Esansiyel yağ bileşenlerinin farklı kombinasyonları tekli etkileri ile kıyaslanır ise, daha düşük MİK değerine sahip oldukları durumda daha etkili ve tercih edilebilir duruma gelmektedirler. Ayrıca, esansiyel yağ bileşenlerinin kombinasyonu ham esansiyel yağlara oranla olumsuz tat profiline sahip olmayacağı düşünülmektedir.

Dama tahtası analizi ile belirlenen MİK değerleri FİKİ değerlerine dönüştürülerek iki esansiyel yağ bileşeninin etkileşimini sayısal bir değer ile ifade etmektedir. FİKİ değerleri etkileşimlerin doğasını açıklarken, literatürdeki değerlerin farklılık göstermesi çalışmalar arası kıyaslama yapmayı zorlaştırmaktadır (Bassolé ve Juliani, 2012). Çizelge 2'de yayınlar arasındaki FİKİ değerlerinin çevrimi gösterilmektedir.

Daha önce de bahsedildiği gibi, p-çimen gibi terpenler oldukça düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğundan farklı kombinasyonlarda kullanılıp bioaktiviteleri arttırılabilmektedir. Sinnamaldehit ile p-çimen kombine edildiğinde *E. coli* JG33 hariç bütün *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı 1,4 değerinden daha düşük FİKİ değerleri elde edilmiştir. Tek başına MİK değerleri test edilen kombinasyonların FİKİ değerleri Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Esansiyel yağ bileşenlerinin farklı bakteri suşlarına karşı tekli MİK değerleri ile kombinasyonlarının FİKİ değerleri

Sinnamaldehitin MİK değeri (mM)	p-çimennin MİK değeri (mM)	FİKİ	Mikroorganizma
≤ 3,6	>2,25	<1,4	<i>E. coli</i> LMG2093
≤ 3,6	>2,25	<2,4	<i>E. coli</i> JG33
≤ 3,6	>2,25	<1,4	<i>E. coli</i> JG45
≤ 3,6	>2,25	<1,4	<i>S. aureus</i> LMG8224
≤ 3,6	>2,25	<1,4	<i>S. aureus</i> TIAC39
≤ 3,6	>2,25	<1,4	<i>S. aureus</i> TIAC82
Sinnamaldehitin MİK değeri (mM)	Öjenolünün MİK değeri (mM)	FİKİ	Mikroorganizma
3,6	>7,2	<1,13	<i>E. coli</i> LMG2093
3,6	>7,2	<0,88	<i>E. coli</i> JG33
3,6	>7,2	<1,13	<i>E. coli</i> JG45
3,6	>7,2	<0,63	<i>S. aureus</i> LMG8224
3,6	>7,2	<1,13	<i>S. aureus</i> TIAC39
3,6	>7,2	<1,13	<i>S. aureus</i> TIAC82

p-çimen ve öjenolün tekli MİK değerleri FİKİ üzerinde belirsizliğe sebep olduğu için hesaplanamamıştır. Bu çalışmadaki FİKİ aralıkları; FİKİ ≤ 0,5 ise sinerjistik etki, 0,5 < FİKİ < 1 ise ilaveli, 1 < FİKİ < 4 ise etkisiz, FİKİ > 4 ise antagonistik etki olarak yorumlanmıştır (Arikan vd., 2002; Mulyaningsih vd., 2010; van Vuuren ve Viljoen, 2011). Bu yüzden sinnamaldehit ile p-çimen arasında etkileşim sinerjistik, ilaveli veya etkisiz olabilmektedir.

Aynı esansiyel yağ bileşenlerin etkileri incelenirken kullanılan aralıkların değişmesi yorumlamayı da zorlaştırmaktadır. Başka yazarlar tarafından kullanılan FİKİ referans değerlerine göre sinnamaldehit ve p-çimen kombinasyonu antagonistik etki göstermemektedir (Bassolé ve Juliani, 2012; De Sousa vd., 2012; Didry vd., 1994; Gallucci vd., 2009; Goñi vd., 2009; Pei vd., 2009; Pina-Vaz vd., 2004; van Vuuren ve Viljoen, 2011). Ancak 1,1'lik (Romano vd., 2009) veya >1'lik (Rosato vd., 2007) FİKİ değerleri antagonizm olarak da değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada sinnamaldehit ve p-çimen kombinasyonunun *E. coli* JG33'e karşı FİKİ değeri 2,4'ten düşük olarak belirlenmiştir. Bu sebeple bu bileşenlerin etkileşimi antagonizm olmamaktadır. Başka araştırmacılar tarafından kullanılan FİKİ aralıklarına göre de antagonistik etkinin görülmediği söylenebilmektedir (Bassolé ve Juliani, 2012; De Sousa vd., 2012; Goñi vd., 2009; Pina-Vaz vd., 2004; van Vuuren ve Viljoen, 2011). Ancak, 2'den yüksek FİKİ değerleri antagonizm olarak da belirtilmiştir (Didry vd., 1994; Gallucci vd., 2009; Pei vd., 2009). Ayrıca 1,1 (Romano vd., 2009) veya >1 FİKİ (Rosato vd., 2007) değerleri de antagonizm olarak değerlendirilmiştir.

Test edilen bakterilere karşı en etkin sinerjistik kombinasyon, sinnamaldehit ve öjenol olarak belirlenmiştir. FİKİ değeri *S. aureus* LMG8224'a karşı 0,63'ten düşük olarak tespit edilmiştir. Bu iki bileşenin etkileşimi sinerjistik veya ilaveli olabilmektedir. Başka araştırmacıların değerlendirmelerine göre de aynı etkileşim belirtilebilmektedir (Bassolé ve Juliani, 2012; Rosato vd., 2007). Diğer çalışmalardaki referans FİKİ değerlerine göre de bu kombinasyon sinerjizm olarak gösterilebilmektedir (Gallucci vd., 2009; Pei vd., 2009; Romano vd., 2009). Ayrıca Didry vd. (1994)'ye göre bu kombinasyonun kısmi-sinerjizm veya sinerjizm olarak yorumlanması da mümkün olmaktadır.

Sinnamaldehytin öjenol ile kombinasyonunun *E. coli* JG33'e karşı FİKİ değeri 0,88'ten düşük olarak tespit edilmiştir. Bu iki bileşenin etkileşimi sinerjistik veya ilaveli olabilmektedir. Bassolé ve Juliani (2012), Gallucci vd. (2009) ve Rosato vd. (2007) yazarları tarafından kullanılan FİKİ aralıklarına göre de aynı etkileşim söz konusu olmaktadır. Başka yazarlar da bu bileşenlerin etkileşimini sinerjizm olarak öngörmüştür (Pei vd., 2009; Romano vd., 2009).

E. coli ve *S. aureus*'un iki farklı suşuna karşı sinnamaldehit ve öjenol kombinasyonunun FİKİ değeri 1,13 olarak belirlenmiştir. Bu etkileşim antagonistik olmayıp, sinerjizm, ilaveli, veya etkisiz olabilmektedir. Bassolé ve Juliani (2012) ve De Sousa vd. (2012) yazarlarının değerlendirmelerine göre de aynı etkileşim yorumlanabilmektedir.

Öjenol ile kombine edilen sinnamaldehitin *E. coli* CGMCC 1.487 üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan benzer bir çalışmada FİKİ değeri 0,5 bulunup etkileşim sinerjizm olarak değerlendirilmiştir (Pei vd., 2009).

Bu tez çalışmasındaki ile inkübasyon sıcaklığı ve süresi, son ekim konsantrasyonu ve yöntem aynı olup farklı konsantrasyonlar, farklı besiyeri ve farklı suşlar kullanılmıştır. 1,89 mM sinnamaldehit ve 3,1 mM öjenol konsantrasyonlarında kombine edilen bir başka çalışmada bu bileşenler *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp. ve *Enterobacter* sp.'ye karşı ilaveli etki göstermiştir (Moleyar ve Narasimham, 1992). Yöntem, besiyeri, inkübasyon sıcaklığı ve son ekim konsantrasyonu yapılan bu tez çalışmasından farklı olmaktadır. Ayrıca bu bileşenlerin kombinasyonu farklı cins bakteriler üzerinde çalışılmıştır.

Üç farklı *Prevotella* suşu ile iki farklı *Streptococcus* ve *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 14956 suşları üzerinde etki gözlenmemiştir (FİKİ = 1). *Streptococcus milleri* (etkisiz) için FİKİ değeri 1,25, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 için de FİKİ değeri 0,75 belirlenmiştir (kısmi sinerjizm) (Didry vd., 1994). Bu tez çalışmasından farklı besiyeri, yüksek inokülüm ve yüksek inkübasyon süresi (*Streptococcus* hariç) uygulanmıştır. Bir başka çalışmada aynı kombinasyonun antifungal aktivitesi değerlendirilmiştir. *Laetiporus sulphureus* (BCRC 35305)'e karşı sinerjizm ve *Lenzites betulina* (BCRC 35296)'ya karşı ilaveli etki gözlenmiştir (Yen ve Chang, 2008). Sonuç olarak sinnamaldehit ve öjenolün etkileri, çalışmada kullanılan konsantrasyonlar, yöntem, bakteri cins ve suşu ile inokülüm konsantrasyonuna göre değişmektedir.

Son çalışma olarak, timol ve α -pinenin MİK değerleri altı farklı bakteri suşuna göre 1,8 mM'den yüksektir (n = 1). Bu sebeple tekli MİK ve kombinasyonun MİK değerleri belirlenemediği için FİKİ değerini hesaplamak mümkün olmamıştır. Klein vd. (2013) çalışmasında α -pinen ile farklı konsantrasyonlarda kombine edilmiş timolün antimikrobiyal aktivitesi üzerine odaklanmıştır (Çizelge 1).

Esansiyel yağ bileşenlerinin konsantrasyonlarına bağlı olarak *Escherichia coli* (DSM 10727) üzerinde bir sefer sinerjizm ve iki sefer etkisizlik gözlenmiştir. *P. fragi* (DSM 3456), *Brochothrix thomosphaeta* (DSM 20171) ve *Aeromonas hydrophila* (DSM 30187T) üzerinde de bu kombinasyon sinerjizm ve etkisizlik göstermiştir. Bu tez çalışmasından farklı yöntem, suş, besiyeri, Tween 80 yerine 2-propanol ve inkübasyon koşulları kullanılmıştır. Bu faktörler esansiyel yağ bileşenlerinin mikroorganizmalara karşı gösterdiği etkiyi değiştirmektedir.

Klein vd. (2013) ayrıca timol ile benzer kimyasal yapıya sahip olan karvakrol ile α -pinenin etkileşimini de incelemiştir. Konsantrasyona bağlı olarak *Aeromonas hydrophila* (DSM 30187T) üzerinde dört defa antagonistik etki gözlenmiştir. Ancak α -pinen ve timol kombinasyonu aynı bakteri üzerine antagonistik etki göstermemiştir. Ayrıca iki kombinasyonda kullanılan konsantrasyonlar oldukça yakındır. Bu yorumlar ışığında karvakrolün, α -pinen ile kombinasyonunda *Aeromonas hydrophila* (DSM 30187T) üzerindeki antagonistik etkisinde payı büyüktür.

Sonuç olarak, esansiyel yağlar ve bileşenlerinin etkileşimlerini sayısal olarak nitelendirebilecek standart bir yöntem yoktur. Farklı çalışmalarda, farklı yöntemler ve farklı FİKİ aralıkları kullanılmaktadır. Ayrıca, bileşenlerin kombinasyonları veya oranları ile sürfaktan/çözgen bilgileri de yazarlar tarafından açık olarak belirtilmemiştir. Bu yüzden farklı çalışmalardaki esansiyel yağ bileşenlerinin kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivitesinin karşılaştırmasını yapmak oldukça zor olmaktadır.

Esansiyel yağlar ve bileşenlerinin sinerjistik kombinasyonları daha ayrıntılı olarak araştırılmalı ve ticari olarak uygulanmalarından önce güven aralıkları test edilmelidir (Seow vd., 2014). Esansiyel yağlar ve bileşenleri üzerinde etkili olan iç ve dış faktörler (pH, protein, yağ, su oranı, inkübasyon sıcaklığı/süresi, fiziksel yapı ve ambalajlama prosedürü), sinerjistik, ilaveli ve antagonistik etki mekanizması ile muhtemel toksisitesi; gıda, ilaç ve kozmetik sanayisinde kullanımlarını optimize etmek açısından önemli rol oynamaktadır (Bassolé ve Juliani, 2012).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada öncelikli olarak saf esansiyel yağ bileşenlerinin sürfaktan ve/veya çözücü ile desteklenmiş BHI sıvı besiyerindeki maksimum çözünebilen konsantrasyonları araştırılmıştır. Terpenoit ve fenilpropen çözeltileri, terpenlere oranla daha homojen dağılım gösterip yüksek konsantrasyonlarda berrak olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sürfaktan ve/veya çözügen kullanımı ile ısı çoğu esansiyel yağ bileşeninin homojen dağılımını arttırdığı gözlenlenmiştir. Destekleyici olarak kullanılan etanol, Tween 80 ve/veya DMSO test edilen *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal etki göstermemiştir. %0,9 Tween 80 ile 11,25 mM geraniol, %0,9 Tween 80 ile 13,5 mM sitral ve %0,9 Tween 80 ile 14,4 mM sinnamaldehit tekli kullanımda test edilen tüm *S. aureus* ve *E. coli* suşlarına karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Geraniol, *E. coli*'ye kıyasla *S. aureus* üzerinde daha etkili olan esansiyel yağ bileşeni olarak belirlenmiştir.

Sinnamaldehit, p-çimen ile kombine edildiğinde test edilen bakteriler üzerinde antagonistik olmayan etkiler belirlenmiştir. Sinnamaldehit ve öjenolün kombinasyonu *E. coli* JG33 ve bu kombinasyona en hassas bakteri olan *S. aureus* LMG8224 üzerinde ilaveli veya sinerjistik etki göstermektedir. Aynı kombinasyonun test edilen diğer *E. coli* ve *S. aureus* suşlarına karşı antagonistik olmayan etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sinnamaldehitin öjenol ile kombinasyonunun p-çimen ile kombinasyonuna oranla test edilen bakteri suşlarına karşı daha düşük FİKİ değerlerine sahip olduğunu göstermektedir. Genel olarak, çözünürlük, konsantrasyon, esansiyel yağ bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal karakteristikleri ve test edilen suşlar; esansiyel yağların antimikrobiyal aktiviteleri üzerine önemli rol oynamaktadır.

Gelecekteki çalışmalarda farklı konsantrasyonlardaki sürfaktan ve/veya çözügen ile desteklenen esansiyel yağ bileşenlerinin çözünürlükleri üzerine odaklanılmasının gerektiği düşünülmektedir. Esansiyel yağ bileşenlerinin MİK değerlerinin, farklı mikroorganizma suşlarına karşı farklı yöntemler kullanılarak test edilmesi önemli olabilmekte ve böylece bu bileşenlerin aktivitelerinin ve dirençlerinin tahmin edilebileceği düşünülmektedir.

Ayrıca, mikroorganizmalar ile mücadele etmek için kullanılan esansiyel yağ bileşenlerinin kombinasyonları ile olası istenmeyen organoleptik etkiler önlenmektedir.

Bu bilgilere ilaveten, tekli esansiyel yağ bileşenlerinin antimikrobiyal etki mekanizmalarının daha iyi incelenmesi gerekmektedir. Bu faktörlerin daha iyi tanımlanmasıyla esansiyel yağ bileşenlerinin farklı koşullarda farklı mikroorganizmalar üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılmasının yanı sıra daha fazla esansiyel yağ bileşenin endüstriyel uygulamalarda kullanımının da önünü açabileceği düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Ahmad, A., Viljoen, A. M., ve Chenia, H. Y. (2014). The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing. *Letters in Applied Microbiology*, 60, 8–19.
- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., ve Pagán, R. (2011). The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 320–329.
- Andrews, J. M. (2001). Review Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5–16.
- Angienda, P. O., ve Hill, D. J. (2011). The Effect of Sodium Chloride and pH on the Antimicrobial Effectiveness of Essential Oils against Pathogenic and Food Spoilage Bacteria : Implications in Food Safety. *World of Academy of Science, Engineering and Technology*, 57, 1033–1038.
- Ankri, S., ve Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 1(2), 125–129.
- Apolónio, J., Faleiro, M. L., Miguel, M. G., ve Neto, L. (2014). No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. *FEMS Microbiology Letters*, 354, 92–101.
- Arikan, S., Lozano-Chiu, M., Paetznick, V., ve Rex, J. H. (2002). In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), 245–247.
- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., ve Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21, 33–42.
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., ve Kang, S. C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils. *Food Research International*, 45, 722–734.
- Bajpai, V. K., Rahman, A., Dung, N. T., Huh, M. K., ve Kang, S. C. (2008). In vitro inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *Food Microbiology and Safety*, 73(6), 314–320.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., ve Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.

- Bassolé, I. H. N., ve Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989–4006.
- Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., ... Dicko, M. H. (2010). Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. *Molecules*, 15, 7825–7839.
- Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., ve Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 149–154.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., ve Sinigaglia, M. (2010). Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Control*, 21, 172–177.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Burt, S. A., van der Zee, R., Koets, A. P., de Graaff, A. M., van Knapen, F., Gaastra, W., Veldhuizen, E. J. A. (2007). Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4484–4490.
- Cal, K. (2006). Aqueous Solubility of Liquid Monoterpenes at 293 K and Relationship with Calculated Log P Value. *Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 126(4), 307–309.
- Canillac, N., ve Mourey, A. (2001). Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18, 261–268.
- Chalova, V. I., Crandall, P. G., ve Ricke, S. C. (2010). Microbial inhibitory and radical scavenging activities of cold-pressed terpeneless Valencia orange (*Citrus sinensis*) oil in different dispersing agents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 870–876.
- CLSI. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard - Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cottarel, G., ve Wierzbowski, J. (2007). Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. *Trends in Biotechnology*, 25(12), 547–555.
- Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, D., Trombetta, D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6300–6308.

- De Sousa, J. P., De Azerêdo, G. A., De Araújo Torres, R., Da Silva Vasconcelos, M. A., Da Conceição, M. L., ve De Souza, E. L. (2012). Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 145–151.
- Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B., ve Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101–109.
- Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., ve Mauriello, G. (2010). Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10, 1040–1049.
- Didry, N., Dubreuil, L., ve Pinkas, M. (1994). Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 69, 25–28.
- Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J., ve Dasgupta, D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology*, 74, 831–840.
- Dorman, H. J. D., ve Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.
- Dougherty, P. F., Yotter, D. W., ve Matthews, T. R. (1977). Microdilution Transfer Plate Technique for Determining In vitro Synergy of Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(2), 225–228.
- Elion, G. B., Singer, S., ve Hitchhings, G. H. (1954). Antagonists of Nucleic Acid Derivatives: VIII. synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *The Journal of Biological Chemistry*, 208, 477–488.
- Feron, V. J., Til, H. P., de Vrijer, F., Woutersen, R. A., Cassee, F. R., ve van Bladeren, P. J. (1991). Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259, 363–385.
- Fichan, I., Larroche, C., ve Gros, J. B. (1999). Water Solubility, Vapor Pressure, and Activity Coefficients of Terpenes and Terpenoids. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 44(1), 56–62.
- Fisher, K., ve Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156–164.
- Fisher, K., ve Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1232–1240.

- Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E., ve Mandrell, R. E. (2004). Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6042–6048.
- Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygadlo, J., ve Demo, M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 24, 348–354.
- Ghosh, I. N., Patil, S. D., Sharma, T. K., Srivastava, S. K., Pathania, R., ve Navani, N. K. (2013). Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: A case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4721–4731.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-lus, R., Becerril, R., ve Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116, 982–989.
- Griffin, S. G., Markham, J. L., ve Leach, D. N. (2000). An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 249–255.
- Gupta, C., Garg, A. P., Uniyal, R. C., ve Kumari, A. (2008). Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. *African Journal of Microbiology Research*, 2(9), 247–251.
- Guzman, J. D. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity, 19 *Molecules* 19292–19349 (2014).
- Hammer, K. A., ve Heel, K. A. (2012). Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, 239–245.
- Hili, P., Evans, C. S., ve Veness, R. G. (1997). Antimicrobial action of essential oils : the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 269–275.
- Hill, L. E., Gomes, C., ve Taylor, T. M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *Food Science and Technology*, 51, 86–93.
- Holley, R. a., ve Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273–292. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2004.08.006>.

- Höferl, M., Buchbauer, G., Jirovetz, L., Schmidt, E., Stoyanova, A., Denkova, Z., ... Geissler, M. (2009). Correlation of Antimicrobial Activities of Various Essential Oils and Their Main Aromatic Volatile Constituents. *Journal of Essential Oil Research*, 21(5), 459–463.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Sarker, S. D., Moore, J. E., Rao, J. R., ve Mazumdar, A. (2011). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1199–1206.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., ve Meyer, R. L. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–24.
- Ilić, B. S., Kocić, B. D., Ćirić, V. M., Cvetković, O. G., ve Miladinović, D. L. (2014). An In Vitro Synergistic Interaction of Combinations of *Thymus glabrescens* Essential Oil and Its Main Constituents with Chloramphenicol. *The Scientific World Journal*, 1–12.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmidt, E., Stoyanova, A. S., Denkova, Z., Nikolova, R., ve Geissler, M. (2007). Purity, antimicrobial activities and olfatoric evaluations of geraniol/nerol and various of their derivatives. *Journal of Essential Oil Research*, 19, 288–291.
- Jocelyn Paré, J. R., Bélanger, J. M. R., ve Stafford, S. S. (1994). Microwave-assisted process (MAPTM): a new tool for the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry*, 13(4), 176–184.
- Klein, G., Rüben, C., ve Upmann, M. (2013). Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. *Current Microbiology*, 67, 200–208.
- Koutsoudaki, C., Krsek, M., ve Rodger, A. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7681–7685.
- Kurita, N., ve Koike, S. (1982). Synergistic Antimicrobial Effect of Sodium Chloride and Essential Oil Components. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(1), 159–165.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., ve Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453–462.
- Lis-Balcnin, M., Ochocka, R. J., Deans, S. G., Asztemborska, M., ve Hart, S. (1999). Differences in Bioactivity between the Enantiomers of α -Pinene. *Journal of Essential Oil Research*, 11, 393–397.

- Mejlholm, O., ve Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 27–31.
- Meletiadis, J., Pournaras, S., Roilides, E., ve Walsh, T. J. (2010). Defining Fractional Inhibitory Concentration Index Cutoffs for Additive Interactions Based on Self-Drug Additive Combinations, Monte Carlo Simulation Analysis, and in vitro-in vivo Correlation Data for Antifungal Drug Combinations against *Aspergillus fumi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), 602–609.
- Moleyar, V., ve Narasimham, P. (1992). Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 337–342.
- Mourey, A., ve Canillac, N. (2002). Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13, 289–292.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., ve Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17, 1061–1066.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., ve De Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 1451–1474.
- Ngan, L. T. M., Moon, J. K., Kim, J. H., Shibamoto, T., ve Ahn, Y. J. (2012). Growth-inhibiting effects of *Paeonia lactiflora* root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1575–1583.
- Nielsen, P. V., ve Rios, R. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 219–229.
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 1.
- Pei, R.-S., Zhou, F., Ji, B.-P., ve Xu, J. (2009). Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of Food Science*, 74(7), 379–383.
- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18, 73–78.

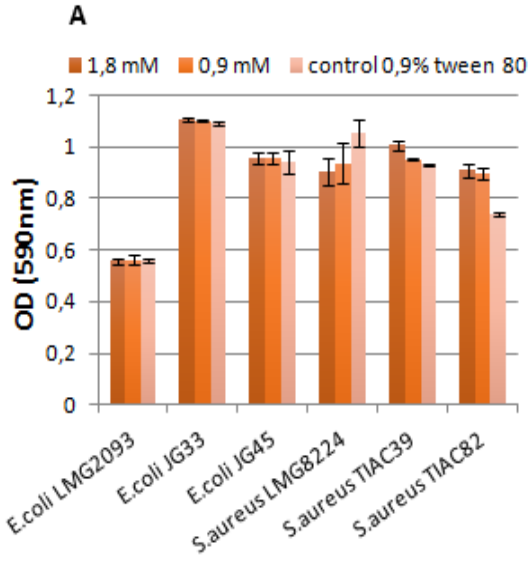
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., ve Rao, R. (2010). Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 5062–5069.
- Rattanachaikunsopon, P., ve Phumkhachorn, P. (2009). In vitro study of synergistic antimicrobial effect of carvacrol and cymene on drug resistant *Salmonella typhi*. *African Journal of Microbiology Research*, 3(12), 978–980.
- Romano, C. S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A. A., ve Moreno, S. (2009). Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chemistry*, 115, 456–461.
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., ve Antonietta Milillo, M. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine*, 14, 727–732.
- Sanla-Ead, N., Jangchud, A., Chonhenchob, V., ve Suppakul, P. (2012). Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose-based packaging films. *Packaging and Technology and Science*, 25, 7–17.
- Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., ve Yuk, H.-G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 625–644.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., ve Walker, S. (2010). *The Bacterial Cell Envelope*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 1–16.
- Simic, A., Sokovic, M. D., Ristic, M., Grujic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., ve Marin, P. D. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*, 18, 713–717.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., ve Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463–470.
- Soković, M. D., Vukojević, J., Marin, P. D., Brkić, D. D., Vajs, V., ve Van Griensven, L. J. L. D. (2009). Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. *Molecules*, 14, 238–249.
- Tassou, C. C., Drosinos, E. H., ve Nychasl, G. J. E. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 degrees C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 593–600.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O' Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., ve Cullen, P. J. (2009). Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5987–6000.

- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Bisignano, G. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474–2478.
- Ultee, A., Bennis, M. H. J., ve Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568.
- Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G., ve Smid, E. J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 63(5), 620–624.
- van Vuuren, S., ve Viljoen, A. (2011). Plant-based antimicrobial studies-methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica*, 77, 1168–1182.
- Veldhuizen, E. J. A., Tjeerdsma-Van Bokhoven, J. L. M., Zweijter, C., Burt, S. A., ve Haagsman, H. P. (2006). Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1874–1879.
- Visvalingam, J., Hernandez-Doria, J. D., ve Holley, R. A. (2013). Examination of the genome-wide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to cinnamaldehyde exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3), 942–50.
- Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., ve Efferth, T. (2012). Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*, 17, 2704–2713.
- Yen, T.-B., ve Chang, S.-T. (2008). Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 99, 232–236.
- Yvette, S. M. (2005). “Antimicrobial Modes of Action.” In Coyle MB (ed): *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing* (American Society for Microbiology, Washington, DC), ISBN 1-55581-349-6. (pp. 3–14).
- Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P., ve Biliaderis, C. G. (2009). Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82, 338–345.

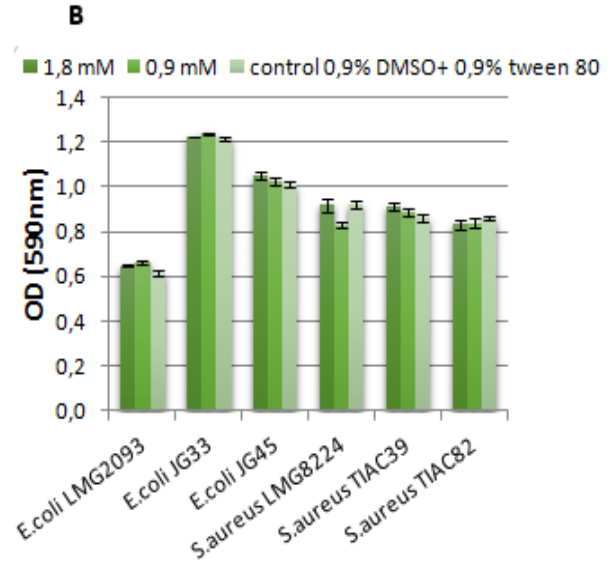


EKLER

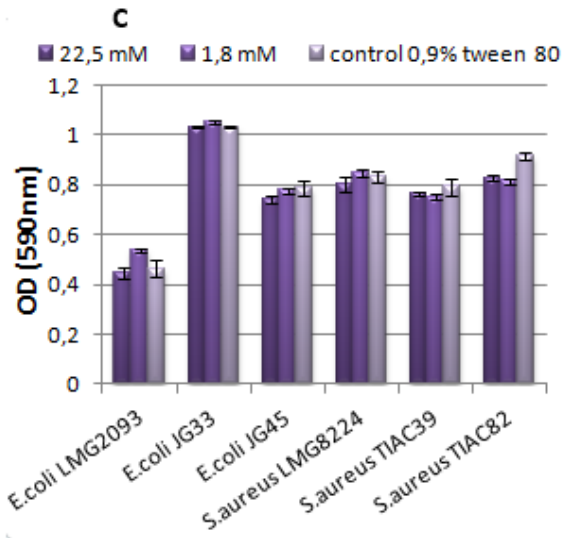
7. EKLER



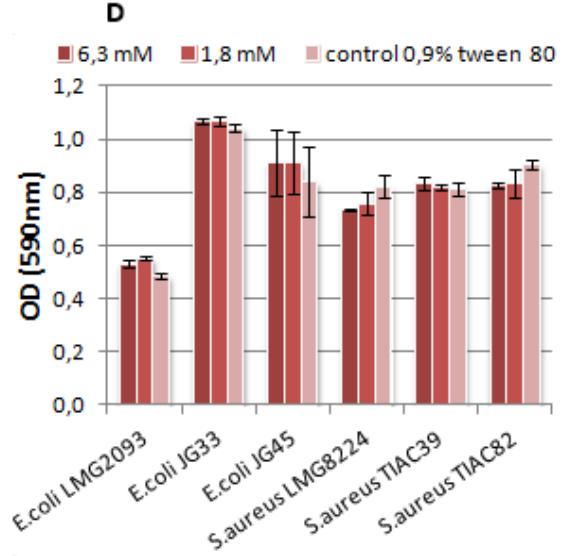
α -pinenin antimikrobiyal etkisi (n = 3)



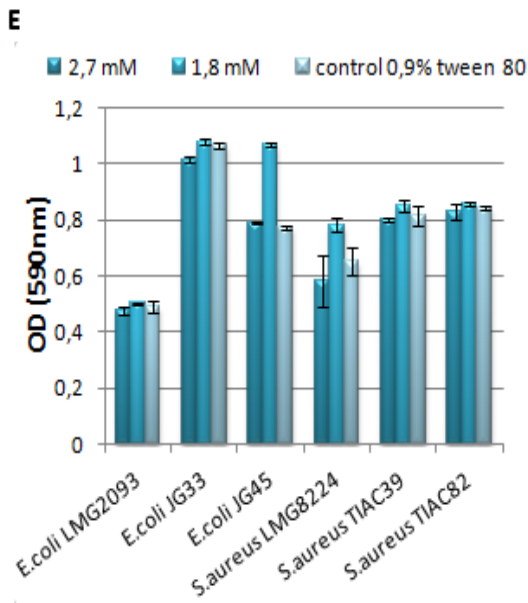
Ocimenenin antimikrobiyal etkisi (n = 3)



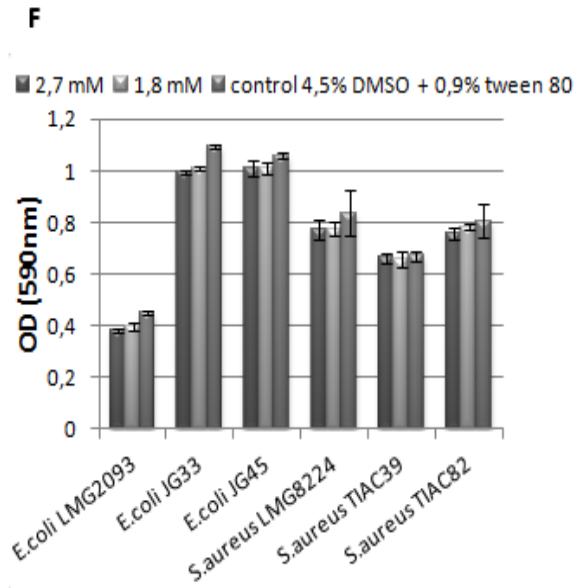
Ökalyptolün antimikrobiyal etkisi (n = 3)



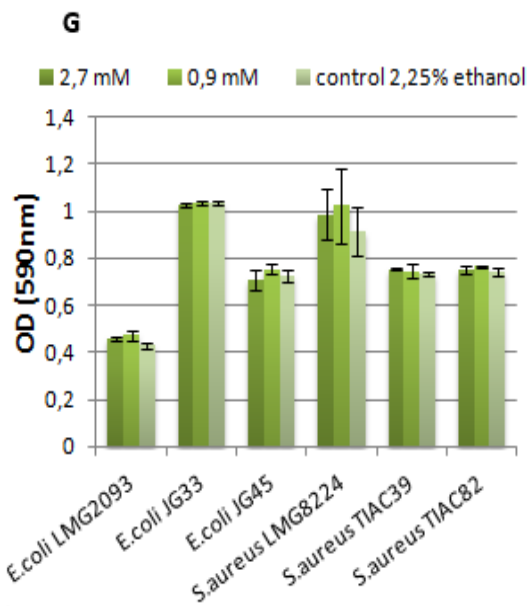
Mentonun antimikrobiyal etkisi (n = 3)



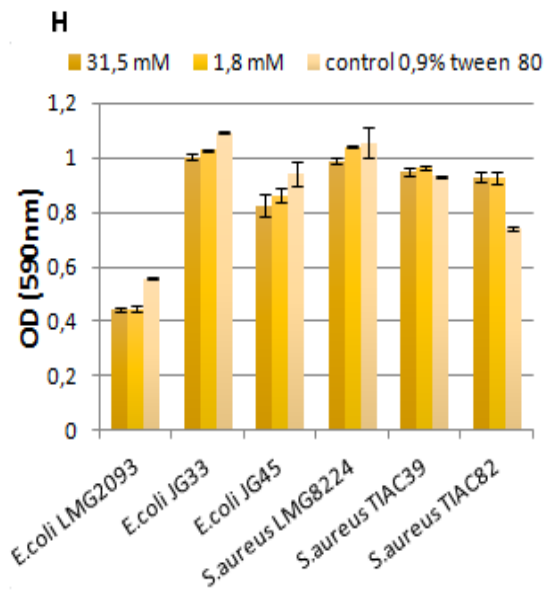
Mentil asetatın antimikrobiyal etkisi (n = 3)



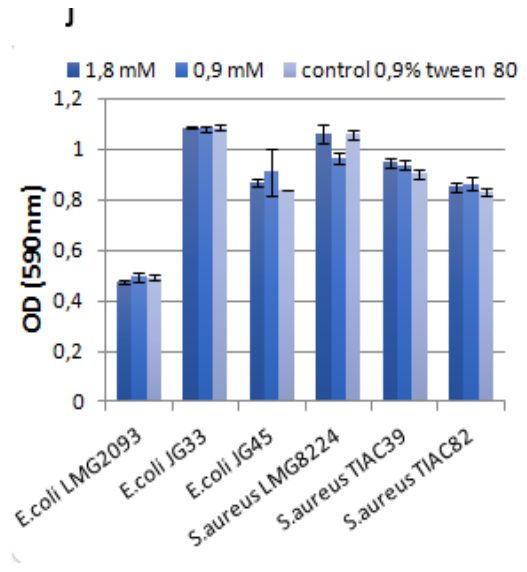
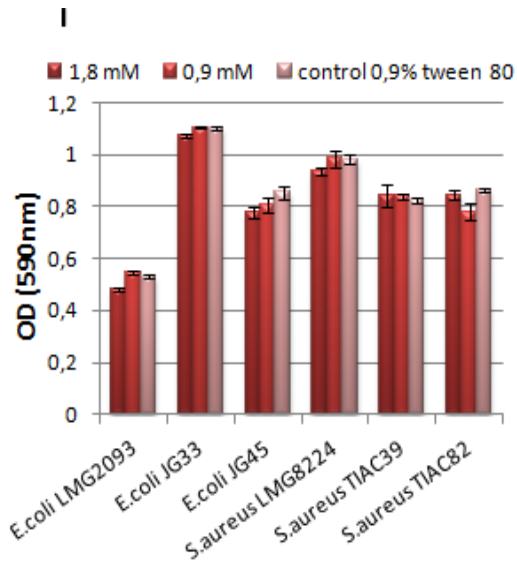
Borneolün antimikrobiyal etkisi (n = 3)



Kamforun antimikrobiyal etkisi (n = 3)



Sinamil alkolün antimikrobiyal etkisi (n = 3)



Öjenolün antimikrobiyal etkisi (n = 3)

Estragolun antimikrobiyal etkisi (n = 3)