



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE STUDIES



CHITOSAN
MICRO/NANOENCAPSULATION OF SOME
PHYTOCHEMICALS WITH
ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT
PROPERTIES

BUSE BERBER

(520113020)

MASTER THESIS

Department of Biology

Biology Program

THESIS SUPERVISOR

Assoc. Prof. Dr. N. Cenk SESAL

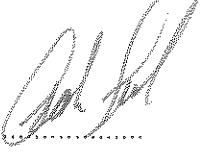
İSTANBUL, 2016

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

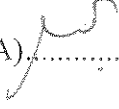
Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Buse BERBER
“Antimikrobiyal ve Antioksidan Özelliğe Sahip Bazı Fitokimyasalların Kitosan ile
Mikro/Nanoenkapsülasyonu” başlıklı tez çalışması, 08 Ağustos 2016 tarihinde
savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. N. Cenk SESAL (Danışman)

Marmara Üniversitesi(İMZA) 

Prof. Dr. Meral BİRBİR (Üye)

Marmara Üniversitesi(İMZA) 

Yrd. Doç. Dr. İskender KARALTI (Üye)

Yeditepe Üniversitesi(İMZA) 

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 05.09.2016 tarih
ve 2016/21-02 sayılı kararı ile Buse BERBER'in Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji
Programı'nda yüksek lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Uğur YAHSİ




TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGMENT)

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel çalışmalarında yanımda olup beni her zaman destekleyen ve yönlendiren sevgili danışmanım Doç. Dr. Cenk SESAL'a destekleri ve bana kattıklarından dolayı,

Tez çalışmalarım sırasında benden desteklerini esirgemeyen sevgili hocalarım Prof. Dr. Ahmet ASAN, Doç. Dr. Burhan ŞEN, Doç. Dr. Ilgaz AKATA, Yrd. Doç. Dr. İskender KARALTI'ya sabırla her soruma yanıt verdiklerinden dolayı,

Lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak yolumda ışık olan sevgili hocalarım Prof. Dr. Meral BİRBİR, Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN, Prof. Dr. Meral ÜNAL, Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN, Doç. Dr. Yıldız AYDIN, Doç. Dr. Filiz VARDAR ve Ar. Gör. Salim SÜNER'e emeklerinden dolayı,

Laboratuvar arkadaşlığı ile başlayıp bugün dostlarım olarak gördüğüm, maddi manevi desteklerini benden hiç bir zaman esirgemeyen Ezgi UÇARKUŞ, Nazlıhan YILDIRIM, Şevval MARAL ÖZCAN, Busëcan AKSOYDAN, Arda Deniz DOKUZOĞLU ve Neval YÜZGEÇ'e varlıklarından dolayı, Barış GÖKALSIN, Birkan AÇIKGÖZ ve Orçun TOKSÖZ'e yardımlarından dolayı,

Tez çalışmalarına FEN-C-YLP-121114-0363 nolu proje ile destek olan BAPKO, 2210-C "Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı" ile gıda alanında burs sağlayan ve 1511-Öncelikli Alanlar Araştırma Teknoloji Geliştirme ve Yenilik P. D. Programı dahilinde 1150079 nolu proje ile destek olan TÜBİTAK'a,

Yaptığım en gözü kara atılımlarda dahi bana destekleri bir an olsun eksilmeyen, yaşama sebeplerim canım kardeşim Cansın BERBER, canım annem Gülşen BERBER, canım babam Nahit BERBER'e ve nişanlım Arda ÖRÇEN'e ailem oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER/TABLE OF CONTENTS	SAYFA
TEŞEKKÜRLER(ACKNOWLEDGMENT)	i
İÇİNDEKİLER/TABLE OF CONTENTS	ii
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SEMBOLLER/SYMBOLS	viii
KISALTMALAR/ABBREVIATIONS	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ/LIST OF FIGURES	x
TABLO LİSTESİ/LIST OF TABLES	xiv
1. GİRİŞ/INTRODUCTION	1
1.1. Allisin	4
1.2. Kuersetin	8
1.3. Karvakrol ve Timol	11
1.4. Oleuropein	14
1.5. Kitosan	16
1.6. Kitosan Mikrokapsül Hazırlama Yöntemleri	21
1.6.1. Anyonlarla etkileşim esasına dayalı yöntemler	23
1.6.1.1. İyonotropik jelasyon	23
2. MATERYAL VE YÖNTEM / MATERIAL AND METHOD	26
2.1. Materyal	26
2.1.1. Bakteri suşları	26
2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar	26
2.1.3. Kullanılan cihazlar	28
2.2. Yöntem	29
2.2.1. Kitosan ile mikro/nanoenkapsülasyon işlemi	29
2.2.2. Mikrokapsüllerin karakterizasyonu	29
2.2.2.1 Mikrokapsül morfolojisinin SEM ile incelenmesi	29
2.2.2.2 Mikrokapsül boyut ve zetapotansiyel değerlerinin incelenmesi	29
2.2.3. Mikroenkapsülasyon veriminin tayini	30
2.2.4. Enkapsüle edilmiş etken maddelerin farklı çevresel koşullara maruz bırakılması	31
2.2.5. Antimikrobiyal Etkinlik Testleri	31
2.2.5.1. Antibakteriyel aktivitenin incelenmesi	32

2.2.5.2. Antifungal aktivitenin belirlenmesi	33
2.2.6. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi	34
2.2.6.1. CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite)	34
yöntemi	
2.2.7. Ames testi ile mutajenitenin belirlenmesi	36
2.2.7.1. Kullanılan test suşları	36
2.2.7.2. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı	37
2.2.7.3. Besiyerleri, tamponlar ve çözeltiler	37
2.2.7.3.1. Vogel-Bonner-E Ortamı (50xVB tuzları)	37
2.2.7.3.2. (0,5 mM) Histidin/Biyotin solüsyonu	37
2.2.7.3.3. Ampisilin solüsyonu	38
2.2.7.3.4. (%1) Kristal viyole solüsyonu	38
2.2.7.3.5. (% 0,13) Biyotin çözeltisi	38
2.2.7.3.6. (% 0,5) Histidin çözeltisi	38
2.2.7.3.7. (%20) Glukoz çözeltisi	38
2.2.7.3.8. 4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD)	39
2.2.7.3.9. Sodyum azid (AZS)	39
2.2.7.3.10. Top agar	39
2.2.7.3.11. Histidin / Biyotin agar (HB Agar)	39
2.2.7.3.12. Histidin / Biyotin / Ampisilin agar (HBA Agar)	40
2.2.7.3.13. Minimal glukoz agar (MGA)	40
2.2.7.3.14. Nutrient agar (NA)	40
2.2.7.3.15. Nutrient Broth sıvı kültür ortamı (NB)	41
2.2.7.3.16. Tuz çözeltisi	41
2.2.8.3.17. 1 M Glukoz-6-Fosfat çözeltisi	41
2.2.8.4. S9 (-) Ames testi	42
2.2.8.4.1. <i>Salmonella</i> suşlarının kültürlerinin master	43
petrilerinin hazırlanması	
2.2.8.4.2. <i>Salmonella</i> suşlarının saklanması ve stok kültürlerin	43
açılması	
2.2.8.4.3. <i>Salmonella</i> suşlarının genotiplerinin kontrol edilmesi	43
2.2.8.4.4. Histidin gereksinimi kontrolü	44

2.2.8.4.5. Rfa mutasyonu kontrolü	44
2.2.8.4.6. UVrB mutasyonu kontrolü	45
2.2.8.4.7. R faktör varlığı kontrolü	46
2.2.8.4.8. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması	46
2.2.8.4.9. Pozitif kontrol	46
2.2.8.4.10. Negatif (çözücü/DMSO) kontrol	46
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
3.1. Mikrokapsüllerin Karakterizasyonu	47
3.1.1. Allisin mikrokapsüllerin karakterizasyon verileri	47
3.1.2. Kuersetin mikrokapsüllerin karakterizasyon verileri	48
3.1.3. Karvakrol mikrokapsüllerin karakterizasyon verileri	49
3.1.4. Timol mikrokapsüllerin karakterizasyon verileri	50
3.1.5. Oleuropein mikrokapsüllerin karakterizasyon verileri	51
3.1.6. Mikroenkapsülasyon veriminin tayini	52
3.1.7. Mikrokapsüllerin SEM görüntüleri	52
3.2. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Fitokimyasallar ve Mikrokapsüllerin Antibakteriyel Etkinliği	53
3.2.1. Çevresel koşullara maruz bırakılmış fitokimyasallar ve mikrokapsüllerin <i>E.coli</i> 'ye karşı antibakteriyel etkinliği	57
3.2.2. Çevresel koşullara maruz bırakılmış fitokimyasallar mikrokapsüllerin <i>S. aureus</i> 'a karşı antibakteriyel etkinliği	58
3.3. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Fitokimyasallar ve Fitokimyasal İçeren Mikrokapsüllerin Antifungal Etkinliği	61
3.3.1. Çevresel koşullara maruz bırakılmış allisinin <i>Penicillium sp.</i> 'a karşı antifungal etkinliği	62
3.3.2. Çevresel koşullara maruz bırakılmış allisin mikrokapsüllerin <i>Penicillium sp.</i> 'a karşı antifungal etkinliği	63
3.3.3. Çevresel koşullara maruz bırakılmış allisinin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal etkinliği	64
3.3.4. Çevresel koşullara maruz bırakılmış allisin mikrokapsüllerin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal etkinliği	66
3.3.5. Çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetinin <i>Penicillium sp.</i> 'a	67

karşı antifungal etkinliği	
3.3.6. Çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetin mikrokapsüllerin <i>Penicillium sp.</i> 'a karşı antifungal etkinliği	68
3.3.7. Çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetinin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal etkinliği	70
3.3.8. Çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetin mikrokapsüllerin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal etkinliği	71
3.3.9. çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetinin <i>Aspergillus sp.</i> 'a Karşı Antifungal Etkinliği	73
3.3.10 Çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetin mikrokapsüllerin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal etkinliği	74
3.3.11. Çevresel koşullara maruz bırakılmış allisinin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal etkinliği	76
3.3.12. Çevresel koşullara maruz bırakılmış allisin mikrokapsüllerin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal etkinliği	77
3.3.13. Antifungal aktivite çalışması kontrol grupları	78
3.4. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Fitokimyasal ve Fitokimyasal İçeren Mikrokapsüllerin Antioksidan Etkinliği	81
3.4.1 Çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetinin antioksidan etkinliği	81
3.4.2. Çevresel koşullara maruz bırakılmış oleuropeinin antioksidan etkinliği	84
3.5. Fitokimyasal İçeren Mikrokapsüllerin Ames Mutajenite Analizleri	87
3.5.1. <i>S. Typhimurium</i> TA 98 sonuçları	87
3.5.2. <i>S.Typhimurium</i> TA 100 sonuçları	88
4. SONUÇLAR	90
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	108

ÖZET

ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİĞE SAHİP BAZI FİTOKİMYASALLARIN KİTOSAN İLE MİKRO/NANOENKAPSÜLASYONU

Hazır gıdaların raflarda uzun süre bozulmadan kalabilmesini sağlamak amacıyla katılan katkı maddelerinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilere sebep olduğunun ortaya çıkması ve bu konuda halkın bilinçlenmesi ile birlikte zararlı katkı maddeleri yerine doğal alternatifleri aranmaya başlanmıştır. Bitkilerin içerdiği bazı fitokimyasallar gıdaların raflarda uzun süre kalmasını sağlayabilecek özelliklere sahiplerdir. Ancak *in vitro* çalışmaların aksine, ürün içerisindeki stabilitelerinin düşük olması, tatları, oksidasyon, sıcaklık gibi çevresel etkenlerden etkilenebilmeleri kullanılabilirliklerini sınırlandırmaktadır. Enkapsülasyon işlemi, fitokimyasalları çevresel koşullara karşı korumak için kullanılan yöntemlerdendir. Kitosan, biyobozunur ve biyopolimer oluşundan dolayı enkapsülasyon çalışmalarında tercih edilen bir polimerdir. Çalışmamızda zararlı katkı maddelerinin yerine kullanılabilecek doğal ve zararsız katkı maddelerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmada, literatürde antioksidan, antibakteriyel ve antifungal özellikleri gözlenmiş fitokimyasalların kitosan ile nano/mikroenkapsülasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Çevresel koşullara maruz bırakılan enkapsüle edilmiş ve edilmemiş fitokimyasallar antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve mutajenite özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda enkapsüle edilmek üzere seçilmiş fitokimyasallar; çevre koşullarından etkilenebilen, antifungal özelliğe sahip allisin, karvakrol, antioksidan özelliğe sahip kuersetin, oleuropein antibakteriyel özelliğe sahip allisin, karvakrol ve timol olarak belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda fitokimyasallar çevresel koşullar altında etkinliklerini kaybederken, fitokimyasal yüklü mikrokapsüller çevresel koşullara karşı koruyucu bulunmuştur. Oleuropein yüklü mikrokapsüllerin antioksidan, karvakrol, timol ve allisin yüklü mikrokapsüllerin ise antimikrobiyal etkinlikleri yüksek bulunmuştur. Diğer analizleri de tamamlandıktan sonra elde edilen fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin günümüzde kullanılan katkı maddelerinin yerini alabileceği öngörülmektedir.

ABSTRACT

CHITOSAN MICRO/NANOENCAPSULATION OF SOME PHYTOCHEMICALS WITH ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES

Realizing that additives needed to keep food intact on shelves for a long time have negative effects on human health and the public consciousness, the search for natural alternatives began. Like in other fields, plants are the first to pop in mind. Some phytochemicals in plants have the properties to keep food unspoiled in shelves for a long time. However, contrary to *in vitro* studies, due to their low stability in the product, their taste, and vulnerability to environmental conditions such as oxidation and heat, limit their applicability. Today, encapsulation is employed to protect phytochemicals from negative conditions *in vitro* and *in vivo*. Chitosan -an organic polymer, encapsulation properties of which has been presented by academic studies, is odorless-tasteless, harmless to human health, and can successfully fulfill the need for natural additive products.

In this thesis study, phytochemicals with antioxidant, antibacterial and antifungal properties were nano/microencapsulated with chitosan. Capsulated phytochemicals were compared to their untreated counterparts for their antifungal, antioxidant and mutagenicity properties. Phytochemicals selected for encapsulation in this study are: allicin, carvacrol for their antifungal properties; quercetin, oleuropein for their antioxidant properties; allicin, carvacrol and thymol for their antibacterial properties. It is aimed to determine the protective properties of microencapsulation against heat and oxidation by exposing phytochemicals and microencapsulated phytochemicals to various environmental conditions.

Result of this work phytochemicals lose their activity in under the environmental conditions. Also phytochemical capsulated microcapsules are found as protective against environmental conditions. Oleuropein capsulated microcapsules are found as high antioxidant while carvacrol, thymol and allicin capsulated microcapsules are found as high antimicrobial activity. After other analysis has been completed it suggested that prepared phytochemical capsulated microcapsules can substitute instead using additives in nowadays.

SEMBOLLER / SYMBOLS

% :	Yüzde
°C :	Santigrat derece
dk.:	Dakika
g :	Gram
l :	Litre
µg :	Mikrogram
µl :	Mikrolitre
mg :	Miligram
ml :	Mililitre
mm :	Milimetre
Nm:	Nanometre

KISALTMALAR / ABBREVIATIONS

ABS:	Absorbans
AZS:	Sodyum Azid
ADI:	Günlük En Yüksek Alım Miktarı
BHA:	Butillenmiş Hidroksianazol
BHT:	Butillenmiş Hidroksitirozol
CECT :	Colección Española de Cultivos Tipo (İspanyol Tip Kültür
CUPRAC:	Cupric İon Reducing Antioxidant Capacity
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
FDA:	Food And Drug Administration
HBA:	Histidin Biyotin Agar
HB:	Histidinli Besiyeri
M.Ö:	Milattan Önce
MGA:	Minimum Glukoz Agar
MİK:	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MLC:	Minimum Öldürücü Konsantrasyon
MK:	Mikrokapsül
NA:	Nutrient Agar
NB:	Nutrient Broth
NK:	Negatif Kontrol
NPD:	4- Nitro-O- Fenilendiamin
SEM:	Taramalı Elektron Mikroskobu
TPP:	Tripolyphosphate (Tripolifosfat)
WHO:	World Health Organization

ŞEKİLLERİN LİSTESİ / LIST OF FIGURES

SAYFA

Şekil 1.1: Allisinin kimyasal formülü	4
Şekil 1.2: Kuersetinin kimyasal yapısı	8
Şekil 1.3: Timol (solda) ve karvakrolün (sağda) moleküler görüntüsü	10
Şekil 1.4: Hidroksitrizolün antioksidan mekanizması	13
Şekil 1.5: Kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapısı	15
Şekil 1.6: Kitosan mikrokapsül hazırlama yöntemleri	20
Şekil 1.7: Kitosan – TPP nanoparçacık birimlerinin iki boyutlu görüntüleri	21
Şekil 1.8: İyonotropik Jelasyon Yöntemi	22
Şekil 2.1: Zeta potansiyeli stabilite aralıkları ve süspansiyon özelliklerine etkisi	26
Şekil 2.2: <i>Penicillium sp.</i> ve <i>Aspergillus sp.</i> katı besiyerinde ve mikroskop altında görüntüleri	28
Şekil 2.3: BİOTEK- Cytation 3 mikropılaka okuyucu	29
Şekil 2.4: CUPRAC reaksiyonu	30
Şekil 2.5: Trolox standart eğrisi	31
Şekil 2.6: Fitokimyasallar ve fitokimyasal içeren mikrokapsüllerin oksidasyon düzenegi	31
Şekil 2.7: S9 (-) Ames testinin şematik görünümü	37
Şekil 2.8: <i>S. Typhimurium</i> TA 100 HBA ve MGA sonuçları	39
Şekil 2.9: <i>S. Typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 bakteri suşları için Rfa mutasyonunu kontrol sonuçları	40
Şekil 2.10: <i>S. Typhimurium</i> TA 98 (a) ve TA 100 (b) suşunda UvrB mutasyonu kontrol sonuçları	40
Şekil 3.1: Allisin mikrokapsüllerin zeta potansiyel verileri	42
Şekil 3.2 : Allisin mikrokapsüllerin boyut ölçümü verileri	42
Şekil 3.3: Kuersetin mikrokapsüllerin zeta potansiyel verileri	43

Şekil 3.4: Kuersetin mikrokapsüllerin boyut ölçümü verileri	43
Şekil 3.5 : Karvakrol mikrokapsüllerin zeta potansiyel verileri	44
Şekil 3.6: Karvakrol mikrokapsüllerin boyut ölçümü verileri	44
Şekil 3.7: Timol mikrokapsüllerin zeta potansiyel verileri	45
Şekil 3.8: Timol mikrokapsüllerin boyut ölçümü verileri	45
Şekil 3.9: Oleuropein mikrokapsüllerin zeta potansiyel verileri	46
Şekil 3.10: Oleuropein mikrokapsüllerin boyut ölçümü verileri	46
Şekil 3.11: Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm karvakrol(a) ve karvakrol mikrokapsüllerin (b) <i>E.coli</i> 'ye karşı antibakteriyel aktivitesi	49
Şekil 3.12: Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm timol(a) ve timol mikrokapsüllerin (b) <i>E.coli</i> 'ye karşı antibakteriyel aktivitesi	49
Şekil 3.13: Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm allisin(a) ve allisin mikrokapsüllerin (b) <i>E.coli</i> 'ye karşı antibakteriyel aktivitesi	49
Şekil 3.14: Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm karvakrol(a) ve karvakrol mikrokapsüllerin (b) <i>S.aureus</i> 'a karşı antibakteriyel aktivitesi	50
Şekil 3.15:Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm allisin(a) ve allisin mikrokapsüllerin (b) <i>S.aureus</i> 'a karşı antibakteriyel aktivitesi	50
Şekil 3.16:Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm timol(a) ve timol mikrokapsüllerin (b) <i>S.aureus</i> 'a karşı antibakteriyel aktivitesi	50
Şekil 3.17: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisinin <i>Penicillium sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri	53
Şekil 3.18: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisin mikrokapsüllerin <i>Penicillium sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri	54
Şekil 3.19: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisinin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri	55
Şekil 3.20: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisin mikrokapsüllerin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri	56

Şekil 3.21: Isı ve oksidasyon uygulanmış kuersetinin <i>Penicillium sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri	58
Şekil 3.22: Isı ve oksidasyon uygulanmış kuersetin mikrokapsüllerin <i>Penicillium sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri	59
Şekil 3.23: Isı ve oksidasyon uygulanmış kuersetinin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri	60
Şekil 3.24: Isı ve oksidasyon uygulanmış kuersetinin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi (3 nokta ekim yöntemi) petri görüntüleri	62
Şekil 3.25: Isı ve oksidasyon uygulanmış kuersetin mikrokapsüllerin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi (3 nokta ekim yöntemi) petri görüntüleri	64
Şekil 3.26: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisinin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi (3 nokta ekim yöntemi) petri görüntüleri	66
Şekil 3.27: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisin mikrokapsüllerin <i>Aspergillus sp.</i> 'a karşı antifungal aktivite testi (3 nokta ekim yöntemi) petri görüntüleri	67
Şekil 3.28: Petride antifungal etkinlik testi kontrol grupları	68
Şekil 3.29: Isı ve oksidasyon uygulanmış kuersetinin TEAC(mM) grafiği	71
Şekil 3.30: Isı ve oksidasyon uygulanmış kuersetin mikrokapsüllerin TEAC(mM) grafiği	72
Şekil 3.31: Isı ve oksidasyon uygulanmış oleuropeinin TEAC(mM) grafiği	74
Şekil 3.32: Isı ve oksidasyon uygulanmış oleuropein mikrokapsüllerin TEAC(mM) grafiği	75
Şekil 3.33: Fitokimyasallar ve fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin Ames testi <i>Salmonella Typhimurium</i> TA 98 görselleri	76
Şekil 3.34: Fitokimyasallar ve fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin Ames testi <i>Salmonella Typhimurium</i> TA 100 görselleri	77

TABLO LİSTESİ / LIST OF TABLES**SAYFA**

Tablo 1.1 : Allisinin antifungal aktivitesi	6
Tablo 1.2 : Allisinin antibakteriyel aktivitesi	7
Tablo 1.3: Kuersetinin özellikleri	8
Tablo 1. 4: Timol ve karvakrolün özellikleri	10
Tablo 3.1: Çevresel koşullara maruz bırakılmış fitokimyasal ve fitokimyasal içeren mikrokapsüllerin <i>S. aureus</i> ve <i>E.coli</i> 'ye karşı antibakteriyel etkinlikleri abs değerleri	47
Tablo 3.2: Karvakrol, allisin ve mikrokapsüle edilmiş formlarının çevresel koşullar altında antifungal MİK değerleri	74
Tablo 3.3: Çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetinin antioksidan etkinliği	70
Tablo 3.4: Çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetin mikrokapsüllerin antioksidan etkinliği	72
Tablo 3.5: Çevresel koşullara maruz bırakılmış oleuropeinin antioksidan etkinliği	73
Tablo 3.6: Çevresel koşullara maruz bırakılmış oleuropein mikrokapsüllerin antioksidan etkinliği	74

1. GİRİŞ

İnsanoğlu, varoluşundan itibaren hayatsal fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek ve hayatını idame edebilmek için beslenmeye ihtiyaç duymuştur. Geçmişte doğal besinler ile karşılanan beslenme ihtiyacımız, özellikle son yüzyılda daha pratik olmaları ve ilgi çekici görünmeleri sebebiyle hazır gıda ürünleri ile karşılanmaya başlamıştır. Hazır gıdaların raflarda uzun süre bozulmadan kalabilmesi ve tazeliğini koruyabilmesini sağlamak amacıyla bir takım kimyasal maddeler katılmaktadır.

Sağlık Bakanlığının gıda katkı maddeleri yönetmeliğindeki tanımı; "Tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, normal koşullarda tek olarak tüketilmeyen veya gıda hammaddesi olarak kullanılmayan, seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, taşınması, işlenmesi, ambalajlanması, hazırlanması, depolanması sırasında; gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddeleri tanımlar " şeklindedir [1].

Tarihte; gıdaları koruyabilmek ve kullanım süresini uzatabilmek için bilinçli kullanılan ilk kimyasal katkı maddelerinin tuz ve odun tütsüsü olduğu bilinmektedir. Ürünlerin uzun süre bozulmadan saklanmaları amacıyla tuzlanarak saklanması durumunun M.Ö 3000 yıllarında Mısırlılar tarafından geliştirildiği tahmin edilmektedir. Ortaçağda benzer olarak odun tütsüsü ve tuzun yanı sıra etlere nitrat ilave edilerek et renginin daha sağlıklı ve taze görünmesinin yanısıra botilizm de engellenmeye çalışılmıştır [2]. Kısaca açıklamak gerekirse; tarihte gıda katkı maddelerinin kullanımı iki şekilde gelişmiştir. Bunlardan birincisi; teknolojinin gelişmesiyle beraber gıda saklama teknolojilerinin de gelişmesine duyulan gereksinimdir. Bu etki uluslararası pazar düşünüldüğünde diğer ülkeler ile başabaş rekabet edebilmek açısından oldukça önemlidir. İkincisi ise; tüketici gözünde mevcut gıdanın daha cezbedici ve güvenilir görünebilmesini sağlamaktır. Bahsedilen avantajları gıda ürünlerine yaratabilmek ve eşit koşullarda rekabet edebilmek açısından gıda katkı maddelerinin kullanılması önemlidir. 1900'li yıllarda gıda katkı maddelerinin dünya pazarı 10 milyar dolara ulaştığı, günümüzde ise bu rakamın çok daha yüksek değerlere ulaştığı ifade edilmektedir [2].

Katkı maddeleri sistematik bir şekilde ilk WHO ve FAO tarafından 1956 yılında ele alınmış, bu çalışma 43 dünya ülkesini kapsayan bir tarama çalışması ile gerçekleştirilmiştir. 200'e yakın kimyasal maddenin gıda maddelerinde bu amaçla kullanımda olduğu tespit edildiği bu çalışmanın rakamları 2007 yılında 3,794 çeşide ulaşmış ve Amerika gibi çoğu ülkede yıllık katkı maddesi kullanımı 300.000 tonu geçmiştir [3, 4].

Gıda katkı maddelerinin insan sağlığı üzerindeki zararlı etkilerinin araştırılmasıyla beraber çarpıcı sonuçlar gözlenmeye başlamıştır. Yapılan çalışmalarla Avrupa nüfusunun % 0.03- 0.01' inin gıda katkı maddelerine karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir [5].

Besinlerin raf ömrünü uzatmak, bakteri, küf, maya gibi mikroorganizmalardan korumak, doğal renk ve aromanın değişimini engellemek amacıyla kullanılan koruyucu maddeler (E200– 297); zararlı etkileri üzerine çalışılan başlıca maddelerdir. Koruyucu maddelerden olan nitrit ve nitrat (E250 ve E251); sucuk, salam, pastırma gibi et ürünlerinde yaygın kullanıma sahiptir [1]. Nitratın ADI değeri 0-5mg/kg, nitritin ADI değeri ise 0-0.2mg/kg oranlarında belirlenmiştir. Günlük alınan nitrit ve nitratın %80'i su, sebze gibi diğer kaynaklardan gelirken %20'si ise gıda katkı maddelerinden gelmektedir. Yapılan çalışmalar; nitrit ve nitratın uzun süreli alımlarında kansere sebep olan nitrozaminlere dönüştüğünü ve kanın oksijen taşıma miktarını azalttığını göstermiştir. İzin verilen dozajda uzun süre kullanımlarının sebep olduğu etkilerin yanı sıra bu maddeler üzerinde yapılan bazı çalışmalar; sucuklardaki nitrat oranlarının 0-618 mg/ kg arasında, sebzelerdeki nitrat miktarının ise 2000 mg/kg üzerinde olduğunu göstermiştir [6]

Reçel, margarin, alkolsüz içecekler, zeytin ezmesi, gofret, bisküvi, jöle, kek kremaları ve soslarda kullanılan benzoik asit (E210); astım, deri döküntüsü ve migrene sebep olmaktadır. Sakız, fırın mamulleri, çeşni, mandıra ürünleri, peynir, yumuşak şekerlerde kullanılan parabenlerin (E218), duyarlı kişiler tarafından alındıklarında ağrı, ağır cilt bulguları veya kaşıntı, deride kızarıklık ve şişlik gibi etkilere neden olduğu bilinmektedir. Turuncgil meyveleri, elmalar, armutları korumak amacıyla kullanılan difenil ve o- fenilfenoller (E231- 232) tübüler dilatasyon, tübüler atrofi, dilatasyon, hidronefroza sebep olurken; kurabiye, gofret, kek, bisküvi, patates cipsi-püresi ve

sirkelerde bulunan sodyum meta bi sülfidin de (E223) bakterilerde mutasyon, astımlı hastalarda astım atağı gibi problemlere neden olduğu ve tiamini harap ettiği bilgiler arasındadır [7].

İstenmeyen koku, tat değişikliklerini, oksidasyon veya enzimatik kararmaya bağlı renk geçişini geciktirmek veya önlemek, yağların besin içerisinde acımasını önlemek, geciktirmek için kullanılan antioksidanlar, zararlı etkileri araştırılan diğer önemli kategoridir. Oksitatif değişiklikleri geciktiren antioksidanlar; besinin raf ömrünü uzattıklarından çoğu üründe kullanılırlar. Antioksidan olarak gıda ürünlerinde sıklıkla kullanılan butillenmiş hidroksiyanazolün (BHA) ve butillenmiş hidroksitolüenin (BHT) maddelerinin literatür çalışmaları ile kronik ürtikerde yanmalara neden olduğu rapor edilmiştir [8].

Katkı maddeleri insan sağlığına zararlı olmalarının yanı sıra, belirli dozlarda kullanılabildiklerinden dolayı bazı gıdalarda erken bozulmalara sebep olabilmektedir.

Hazır gıdalarda kullanılmak üzere geliştirilen pek çok gıda katkı maddesinin insan vücudunda kalıcı etkiler oluşturması, fazla alınımlarının obezite gibi pek çok sağlık problemine sebep olması günümüzde çok önemli bir problem haline gelmiştir [9].

Hasat sonrası süreçte gıda mahsullerini mikroorganizmalardan korumak ve uygun şekilde pazarlara sunabilmek amacıyla da birçok koruyucu madde kullanılmaktadır. Buna rağmen dünyadaki mahsul kaybının %50'den fazlası toprak kaynaklı organizma ve mikroorganizmalardan kaynaklandığı bilinmektedir. Küflenme; ürünün hasat öncesi ve sonrası kalitesini düşüren, ürün arındırılsa dahi salgıladıkları mikotoksinler sebebiyle ürün kaybıyla sonuçlanan bir olaydır. Mikotoksinler; *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Aspergillus* türleri başta olmak üzere belirli küf türlerinin ürettiği metabolitlerdir [10]. Aflatoksinler, okratoksin, trikotesen, zeralenon, patulin ve fumosin başlıca mikotoksinlerdir [11]. Baharatlar, süt, kuruyemişler, mandıra ürünleri, et ve et ürünleri, meyveler, sebzeler aflatoksinin en sık problem yarattığı ürünlerdir. Her yıl dünyadaki besinlerin %25'inin mikotoksinler tarafından kullanılmaz hale geldiği Amerikan Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından tespit edilmiştir [12]. Ülkemizde *Aspergillus* mikotosini olan aflatoksinler nedeni ile pek çok ürün kaybı yaşanırken, yıllık ortalama 40 bin ton fındığın sorumlusunun da aflatoksinler olduğu belirtilmektedir [13]. Tüm bu olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için fungusitler

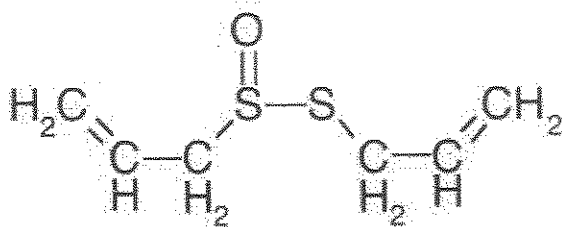
kullanılmaktadır. Fungisitler, pahalı olmalarının yanı sıra, karsinojenik, toksik ve çevreye zarar veren maddelerdir [14]. Aşırı kullanımlarının dirençli küflerin oluşmasına sebebiyet vermesinin yanında sebze ve meyvelerde daha fazla kimyasal kalıntı bırakması, insan sağlığı açısından tehdit edici bir hal almıştır [15, 16]. Sinha ve ekibinin 1994 yılında yaptıkları bir çalışmada soğanlarda *A. niger*'in zararlarına karşı fungusit ve ışınların birlikte kullanıldığında hasarın %79 oranında azaldığı, soğanın dış kabuklarında toksik derecede fungusit kalıntısı biriktiği rapor edilmiştir [17].

Gıda katkı maddelerinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri, bazı gıdalar için yeteri kadar koruyucu olmaması yeni, daha etkili ve daha sağlıklı katkı maddelerine ihtiyaç doğurmuştur. İnsanoğlunun varoluşundan itibaren pek çok sebeple kullanılan bitkisel bileşenlerin bu ihtiyacı karşılayabileceği literatürde bahsi geçen konulardandır [9].

Bu tez çalışmasında, etkileri literatürde yer alan fitokimyasalların gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Gıda katkı maddelerinin yerini alabileceği düşünülerek seçilmiş fitokimyasallar; antibakteriyel özellikli allisin, karvakrol, timol, antioksidan özelliğe sahip kuersetin ve oleuropein, antifungal özelliğe sahip allisin ve karvakroldür.

1.1 Allisin

Allisin, *Alliaceae* familyasında yer alan sarımsağın (*Allium cepa* L.) içerisinde 30'u aşkın organosülfür bileşiğinden birisidir. Kimyasal olarak 2-propen-1-sülfonik asit, thio-, S-allil ester; 2-propen-1-sülfinotioik asit, S-2-propenil ester (9CI); S-allil akrilo-1-sülfonotioat veya tio-2-propen-1-sülfonik asit S-allil ester isimleriyle bilinmektedir [17]. Allisinin kimyasal yapısı Şekil 1.1'de verilmiştir.



Şekil 1.1: Allisinin kimyasal yapısı [17]

Sarımsak ile ilgili 1844’de ilk kimyasal çalışmaları yapan Alman bilim adamı Theodor Wertheim, sarımsak ve yağında sülfür içeren bir kısım olduğunu belirtmiştir. Wertheim araştırmasında, sarımsağı özütlemiş, açığa çıkan keskin kokulu bileşikler içeren bu maddelere *Allium* familyasından esinlenerek ‘allil bileşikleri’ adını vermiştir. Cavallito ve Bailey sarımsaktaki karakteristik tadın allisinden kaynaklı olduğunu ve biyolojik etkinliklerinin de yine allisin ile bağlantılı olduğunu bildirmiştir [18, 19]. ‘Allisin’ Amerika Birleşik Devletlerinde “Cavallito” firması tarafından patentlenerek uzun süre satılmıştır, fakat bir tıbbi malzeme olarak kullanımı, kısa bir süre sonra keskin kokusundan ötürü durdurulmuştur [20- 24]

Doğal antibiyotik olarak tanımlanan allisinden kaynaklanan “sidal” veya “statik” antimikrobiyel aktivitelerin, hücre metabolizmasına etkisi, tiyollerin disüflitlere oksidasyonu ile proteinlerin inaktivasyonu, sistein ve glutatyon gibi sülfidril bileşikleri ile kompetitif inhibisyonu, allosterik yapıdaki grupların –SH bandlarının oksidasyonu ile enzim fonksiyonlarının kompetitif olmayan inhibisyonu şeklinde açıklanmaktadır [25].

Sarımsağın Gram pozitif ve negatif bakterilere karşı etkili olduğu literatürde yer alan çalışmalar ile bildirilmiştir. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus sp.*, *Helicobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Microoccus sp.*, *Clostridium sp.*, *Salmonella sp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, türlerinin sarımsağı karşı duyarlı bakteri grupları arasında oldukları literatürde bildirilmiştir. Antibiyotiklere karşı dirençli *E. coli*, *Enterococcus sp.*, *Shigella dysenteriae*, *S. paradyenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Vibrio comma*, *Salmonella enterica*, *S. Typhimurium*, *S. typhosa*, *H. pylori*, *C. perfringens* ve *E. agglomerans* türlerine karşı allisinin etkinliği farklı çalışmaların sonucunda raporlanmıştır. Tüm bu antibakteriyel özelliklerin sarımsakta bulunan allisinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalarda sarımsağın 0.8 – 40 mg/mL minimum inhibisyon konsantrasyonlarında pek çok bakteri ve mayaya karşı engelleyici etkiler gösterdiği belirlenmiştir [26- 37]. Lee ve ark. (2003)’ı biber, brokoli, kırmızı soğan, lahana, yeşil çay, sarımsak, havuç, salatalık gibi değişik sebze sularının bakteriler üzerine engelleyici etkilerini araştırdıkları çalışmada *Salmonella epidermidis*, *Salmonella marcescens*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* 0157: H7, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*’e karşı sarımsak ve su ekstraktlarının değişik dozlarda en yüksek

antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir [37].

Allisinin *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. neoformans*, *C. rugosa*, *C. tenuis*, *Rhodotorula rubra*, *Torulopsis candida*, *Trichosporon beigelii*, *T. glabrata* gibi mayalara karşı etkin olduğu da yine literatür bilgileri arasındadır [25, 35, 38- 40]. Arora ve Kaur (1999), su ile ekstrakte edilmiş sarımsak özütünün mayaları önemli ölçüde engellendiğini rapor etmiştir. Aynı çalışmada patojen bakteriler üzerinde de sarımsağın önemli ölçüde inhibe edici olduğu gözlenmiştir [41]. Naganawa ve ark. (1996) yaptığı bir araştırmada sarımsağın alkol ile ekstraksiyonu sonucu allisinin bir türevi olan öjoen bileşiğini elde etmiştir. Öjoen'in *A. niger*, *C. albicans* ve *Paracoccidioides brasiliensis*'in engellenebildiği bildirilmektedir. Öjoen'in antimikrobiyel etkisinin; iğerdiği sülfenil grup ve disülfid bağlarından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Sıvı besiyerine 20 µg öjoen/mL ilavesi ile *Lactobacillus plantarum*, *Streptomyces griseus* ve *C. albicans*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Pichia anomala*, *Schizosaccharomyces pombe* ve *S. cerevisiae* engellenirken, *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *Xanthomonas maltophilia*'nın 100- 160 µg/mL ile engellenebildiği belirtilmiştir [42]. Moore ve Atkins (1977) ile Yoshida ve ark. (1987) yaptıkları çalışmada, allisinin anti-maya özelliğini incelemiş *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *T. beigelii*, *T. mentagrophytes*, *S. cerevisiae* ve *T. glabrata* üzerinde yüksek inhibitör etkileri görölmüştür [43, 44].

Sarımsak ve antifungal aktivite ile ilgili olarak 1936'da ilk çalışmayı Schmidt ve Marquardt'ın yaptığı bildirilmektedir. Sarımsaktaki allisin, tiyuram sülfid, ditiyokarbamat gibi bileşiklerin *P. italicum*, *P. cyclopium*, *P. chrysogenum*, *A. niger*, *A. alutaceus*, *A. terreus*, *Cladosporium macrocarpum*, *A. fumigatus*, ve *A. flavus* gibi mikroorganizmalara fungistatik aktivite gösterdikleri ifade edilmiştir. Sarımsak ekstraktının, mikroorganizmanın oksijen alımını engelleyerek nükleik asit, yağ ve protein sentezini durdurduğu ve hücre zarına hasar verdiği rapor edilmiştir [24, 25, 40, 45-48].

Holt ve Al-Monte (1995), sarımsağın küf önleyici özelliklerini araştırmak amacıyla küflü materyallerden izole edilmiş olan 4 tür *Alternaria*, 2 tür *Fusarium* ve 2 tür *Penicillium* ve 1 tür *Rhizopus* üzerine sarımsak ekstraktının inhibitör etkileri

araştırmıştır. Çalışmada sarımsağın ekstraksiyonunda su ve % 50 etanol solüsyonu kullanılmıştır. Sarımsağın etanol ve su ile olan ekstraktının küfler üzerinde daha engelleyici olduğu laboratuvar çalışmasında saptanmıştır. Hasat sonrası çalışmalarda sarımsak ekstraktının domatesler için küflenmeyi önleyici olarak kullanılabileceği raporlanmıştır [48]. Sarımsak yağının çok iyi bir antimikrobiyel olduğu literatürde yer alan çalışmalar ile desteklenmiştir. Yapılan çalışmalarda *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *L. acidophilus*, *E. coli*, *B. cereus*, *Shigella boydii*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. metschnikovii*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. senftenberg*, *Campylobacter jejuni*, *C. lari*, *Bacterioides fragilis*, *E. aerogenes*, *E. faecalis*, *K. aerogenes*, *P. vulgaris*, *S. faecalis*, *S. mutans*, *S. pyogenes*'in gelişiminin sarımsak yağı ile engellenebildiği rapor edilmiştir. Gıda alanında yapılan model çalışmalarda sarımsak uçucu yağının, *A. niger*'e fungistatik etkiler gösterdiği, domates sularında *B.thermoacidurens*'in gelişimini engellediği, tavuk sosislerinde doğal bir antimikrobiyel katkı maddesi olarak çok iyi sonuçlar verdiği, balık filetolarında *Acitenobacter sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Moraxella sp.*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* gibi pek çok mikroorganizmaya etkili olduğu belirtilmiştir [20, 22, 26, 27, 49, 50].

Tablo 1.1 : Allisinin antifungal aktivitesine yönelik yapılan çalışmalar [24]

Fungal Tür	Allisin konsantrasyonu (MIC µg/mL)	Özellikler
<i>Candida albicans</i>	0.3	Klinik izolat
<i>Candida albicans</i>	0.8	Klinik izolat
<i>Candida neoformans</i>	0.3	Klinik izolat
<i>Candida parapsilosis</i>	0.15	Klinik izolat
<i>Candida tropicalis</i>	0.3	Klinik izolat
<i>Candida krusei</i>	0.3	Klinik izolat
<i>Torulopsis glabrata</i>	0.3	Klinik izolat
<i>Torulopsis glabrata</i>	1.9	Klinik izolat

Tablo 1.2: Allisinin antibakteriyel aktivitesine yönelik çalışmalar [24]

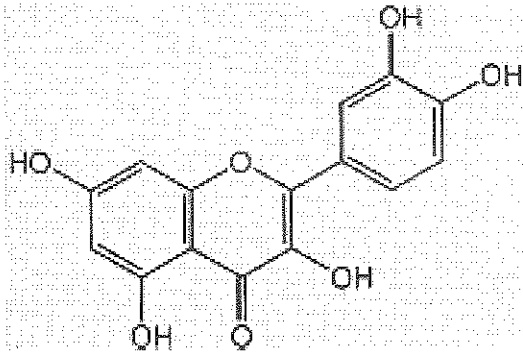
Bakteri türü	Allisin Konsantrasyonu (LD ₅₀ µg/mL)	Özellikleri
<i>Escherichia coli</i>	15	Çoklu ilaç direnci

<i>Escherichia coli</i>	15	Antibiyotiklere duyarlı
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	Metisilin dirençli
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	Duyarlı
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	Duyarlı
<i>Streptococcus β hemolyticus</i>	> 100	Klinik çoklu ilaç direnç geliştirmiş suş
<i>Proteus mirabilis</i>	15	Duyarlı
<i>Proteus mirabilis</i>	> 30	Klinik çoklu ilaç direnç geliştirmiş suş
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	Cefprozil duyarlı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	Çoklu ilaç dirençli mukoid suş
<i>Acinetobacter baumannii</i>	15	Klinik izolat
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	Klinik izolat
<i>Enterococcus faecium</i>	>100	Klinik çoklu ilaç dirençli izolat

Literatürde yapılan çalışmalar allisin fitokimyasalının *Aspergillus fumigatus*, *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Trichophyton sp.*, *Epidermophyton sp.* ve *Microsporum sp.* funguslarına karşı etkili olduğunu ancak besiyerindeki sıcaklık gibi değişiklikler sebebiyle etkinliğinin azalabildiği belirtilmektedir [18]. Fujisawa ve ark. yaptığı çalışmada allisinin farklı sıcaklardaki kimyasal ve biyolojik yollar ile miktarının değişimi incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda allisinin sıcaklıktan etkilenecek degrade olduğu biyolojik ve kimyasal olarak tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada allisinin sıcaklık değişimindeki antibakteriyel aktivitesi araştırılmış ve sıcaklığın artmasıyla beraber antibakteriyel etkinliğinin azaldığı tespit edilmiştir [51]. Dolayısı ile ticarileşebilme aşamasında karşılaşılan problemleri ısı ile bozunabilmesi ve istenmeyen kokusu olarak belirtmek mümkündür.

1.2 Kuersetin

Kuersetin, (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroksflavon) olarak adlandırılan flavonoidlerin flavon grubunda yer alan yapısında 3, 3', 4' ve 5, 7 pozisyonlarında –OH grubu bağlı bir fitokimyasaldır. 3. ve 4. pozisyonlarda bir şeker grubu içeren iki farklı formu vardır. Kuersetinin 3. pozisyonunda şeker grubu içeren 3-o-β-glucosid formu 4. pozisyonunda bir şeker grubu içeren 4'-o-β-diglucosid formuna göre doğada daha yaygın olarak bulunmaktadır. Kuersetinin yapısal formülü Şekil 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2: Kuersetinin kimyasal yapısı

Kuersetin kapari, kayısı, elma, çay, soğan, özellikle kırmızı soğan, kırmızı üzüm, domates, brokoli ve diğer yeşil sebzeler, çilek türleri, meyve kabukları vb. bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır [52- 57]. Serbest radikalleri yakalama özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidan olduğu literatürde yer almaktadır. Bu özelliğiyle vücudu kardiyovasküler hastalıklardan, oksijene bağlı hücresel hasarlardan koruduğu bilinmektedir [58].

Literatürde pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma kuersetinin antioksidan potansiyeli üzerinde durmuştur [59- 70] *In vivo* çalışmalarda kuersetinin sahip olduğu antioksidan etki sayesinde beyin, kalp ve diğer hücrelerin korunabileceği, toksik bileşenler ve diğer faktörlerin sebep olabileceği oksidatif stresin azaltılabileceği gözlenmiştir [71]. Kuersetin serbest radikalleri yakalama ve bağlama konusunda kuvvetli bir antioksidan olarak bilinmektedir [72, 73]. Bu özellikleri sayesinde kuersetinin yağlardaki oksidasyonu engelleyerek lipid peroksidasyonunun önüne geçebildiği deneysel çalışmalar ile kanıtlanmıştır [74].

Tablo 1.3: Kuersetinin özellikleri [75]

KUERSETİNİN ÖZELLİKLERİ

IUPAC İsmi	2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksikromen-4-one
MeSH Sinonimleri	1. 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone 2. dikvertin 3. quercetin
Diğer Kimyasal İsimleri	Sophoretin; Xanthaurine; Meletin
Moleküler Ağırlığı	302.2357 g/mol
Moleküler Formül	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Fiziksel Tanımlanması	Sarı toz. 203-207 °F aralığında susuz forma dönüşür. Alkolik solüsyonları oldukça acıdır.
Yoğunluk	1.799 g/cm ³
Renk	Sarı
Kaynama Noktası	Süblim
Erime Noktası	316.5 °C
Çözünürlük	Suda: 60 mg/mL 16 °C'de; < 1mg/mL 70 °F'da Eter, metanolde çok çözünür; etanol, aseton, piridin ve asetik asitte çözünür.
Buhar Basıncı	2.81x10 ⁻¹⁴ mm Hg at 25 °C
Bozulma	Isıtıldığında rahatsız edici bir koku ve tahriş edici bir duman olur.
Spektral Özellikler	Maks. Absorbsiyon: 256 nm (log E= 4.32); 301 nm (log E= 3.89); 373 nm (log E= 4.32); Sadler Ref. Numarası: 594 (IR, PRISM)

Kuersetin, güçlü bir antioksidan olmanın yanı sıra antifungal, antiviral, antibakteriyel, antikarsinogenik özellikler gösteren acı tatlı bir fitokimyasaldır [75]. Acı

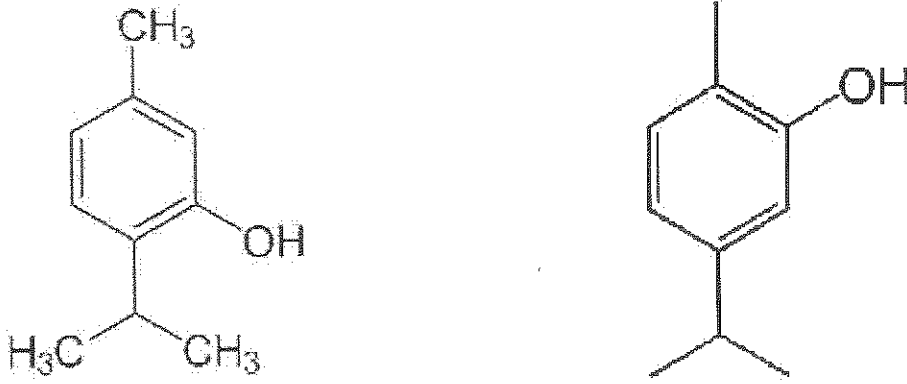
tadından dolayı bazı sektörlerde kullanımı kısıtlıdır.

1.3 Karvakrol ve Timol

Zengin Türkiye florasında bulunan birçok bitki gıda, tıbbi veya diğer amaçlarla toplanmaktadır. Bunların içerisinde *Lamiaceae* familyasına dahil kekik bitkisi önemli bir yere sahiptir. Kekik uçucu yağlarının ana bileşenlerinin büyük kısmını karvakrol ve timolün oluşturduğu bilinmektedir. Bu iki madde monoterpenoid fenol bileşik olup, birbirinin izomeridir. Timol kristalleşebilir özellikte olduğundan ilaç sanayinde de kullanımı yaygındır. Karvakrol kristalleştirilemediğinden ilaç sanayinde kullanımı sınırlıdır [76]. Bu iki maddenin kimyasal yapısı Şekil 1.3'te, özellikleri ise Tablo 1.3'te verilmiştir [77].

Tablo 1. 3: Timol ve karvakrolün özellikleri

Özellikler	Timol	Karvakrol (İzotimol)
Bilinen Adları	5-metil-2-(1-metiletil) fenol	2-metil-5-(1-metiletil) fenol
Kapalı Formülü	C ₁₀ H ₁₄ O	C ₁₀ H ₁₄ O
Molekül Ağırlığı	150.22 g/mol	150.22 g/mol
Erime Sıcaklığı	49-51°C	0°C
Kaynama Sıcaklığı	232 °C	236-237 °C
Yoğunluğu	0.965 g/cm ³	0.976 g/cm ³
Suda Çözünürlüğü	~900 mg/l-1 g/l (25°C)3g/L çok az	1.25 g/l (25°C) çok az
Fiziksel Durumu	İnce toz	Sıvı
Renk	Beyaz	Açık sarı
Sıçan oral LD50	980 mg/kg	810 mg/kg
Sıçan i.v. LD50	100 mg /kg	73 mg/kg
Sıçan i.p. LD50	110 mg/kg	80 mg/kg
Buhar basıncı	0.29 Pa (25°C)	-
Saflık düzeyi	% 99.6	% 98



Şekil 1.3: Timol (solda) ve karvakrolün (sağda) moleküler görüntüsü [77]

Eftekhar ve ark. (2009), İran bölgesinden toplanan kekiklerden elde ettiği uçucu yağların analizini gerçekleştirmiş, bu bileşenlerinin, % 53.74'ünü karvakrol, % 36.03'ünü timol olarak tayin etmiştir. Kekik uçucu yağı disk difüzyon yöntemi ile *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, ve *P.aeruginosa* türlerine karşı test edilmiş, uçucu yağın bakteri gelişimini önleyici etkisi olduğu gözlenmiştir. Gram negatif bakteriler arasından *E. coli* ve *K. pneumoniae* disk difüzyon metodundaki farklı konsantrasyonlara duyarlılık göstermişlerdir. Uçucu yağı özellikle *P. aeruginosa* gibi antibiyotiklere dirençli türlerde orta derecede dayanıklılık göstermişlerdir [78].

Sokovic ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada (2010), *Citrus aurantium*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia*, *C. limon*, *Mentha spicata*, *M. piperita*, *Ocimum basilicum*, *Matricaria chamomilla*, *O. vulgare*, ve *S. officinalis* 'ten oluşan on farklı tıbbi ve aromatik bitkiye ait uçucu yağ kompozisyonlarını ve antibakteriyel etkilerini araştırmıştır. Antibakteriyel etkiyi gösteren temel bileşenlerin; kamfor, karvakrol, 1,8-cineol, linalool, linalil acetat, limonen, mentol, a-pinen, b-pinen, ve timol'un insanda patojenite oluşturan bakteriler olan *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus flavus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* ve *S. Typhimurium*'a karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Test edilen bileşenler arasında en fazla antibakteriyel etkiyi kekikte bulunan karvakrolün gösterdiği bildirilmiştir [79].

Kekik yağı ile yapılan bir çalışmada *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L.*

monocytogenes, ve *S. aureus* gibi gıda patojenlerine karşı yağın etkinliği araştırılmış ve bu mikroorganizmalara karşı yüksek oranda inhibitör etki gözlenmiştir. 1/100 konsantrasyonunda kekik yağının *E. coli* üzerinde inhibitör etki gösterdiğini rapor edilmiştir. Araştırmacılar inhibitör etkinin karvakrolden kaynaklandığını belirtmiştir. Karvakrolün, Gram negatif bakterilerin dış membranlarını parçalayarak lipopolisakkaritleri hücreden ayırırken sitoplazma membranından ATP geçişini arttırdığı bilimsel çalışmalar ile kanıtlanmıştır [80].

Zivanovic ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada kekik yağı ile zenginleştirilmiş kitosan filmlerin *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes* türlerine karşı antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Kekik yağının her iki bakteri türüne karşı yüksek inhibitör etki yarattığı gözlenmiş ve Bologna tipi sosis dilimlerine kekik esansiyel yağı (%1- % 2), ilave edilerek uygulanarak ambalajlandığında 10°C'de 5 gün süreyle depolanmış ürünlerde kitosan filmler, *L. monocytogenes* sayısını 2 logaritmik faz azaltırken, %1 ve %2 oranında kekik esansiyel yağı içeren kitosan filmlerin *L. monocytogenes* sayısını 3,6 ve 4,0 logaritmik faz azalttığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak; kitosan ile karvakrolün birlikte uygulanması ile sinerjik etki yakalandığı belirtilmiştir.[81].

Bagamboula ve Uyttendaele (2004) kekik, fesleğen esansiyel yağı ve ana bileşenlerinin *Shigella spp.*'e karşı antimikrobiyal etkisini agar difüzyon metodu kullanarak yaptıkları çalışmada kekik yağı, timol ve karvakrolün inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir [82].

Timolün Gram negatif bakterilerde dış zarı parçalayarak, lipoprosakkaritlerin serbest kalmasına yol açtığı rapor edilmiştir [83]. Tippayatum ve ark., (2007) eugenol, timol ve nisin *S.aereus*, *E.coli*, *L. monocytogenes* ve *B.cereus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi karşılaştırılmış ve en yüksek antimikrobiyal etkiyi timolün gösterdiğini bildirilmiştir [84].

Timol ve karvakrol fitokimyasallarının mikrobiyal membranı parçalamada etkiği olduğu için hücresel metabolik mekanizmalar ile etkileşim halinde bulundukları hücre içerisinde antimikrobiyal etki gösterdikleri bilinmektedir [85].

Sokolic Mihalak ve ark. (2012) kekik yağının *A. carbonarius* üzerindeki

etkinliğini araştırmıştır. Çalışmaları sonucunda *A. carbonarius* türüne karşı MİK değeri 1,25 µl/ mL olarak bulunmuştur. Bir diğer çalışmada Kocic-Tanackov ve ark. (2012) kekik yağının *A. niger*, *A. wentii* ve *A. carbonarius* türlerine karşı 2500 ppm dozunda etkili olduğunu gözlemlemiş ve çalışmada fungal gelişimin % 95,6 oranında azaldığını rapor etmişlerdir [86]. Carmo ve ark. (2008) *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* ve *Fusarium spp.* türlerine karşı kekik yağının etkinliğini araştırmış ve MİK değerini 80-20 µl/ mL olarak bildirmişlerdir. Ayrıca kekik yağı kullanımının spor oluşumunu engellediği de rapor edilmiştir [87].

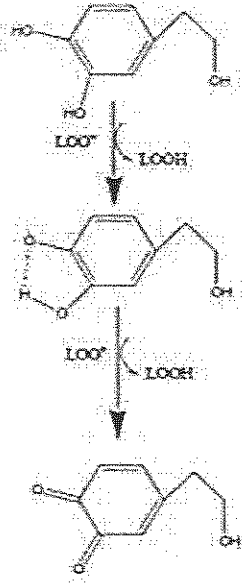
Literatürde karvakrolün antioksidan, antibakteriyel ve antifungal etkinliklerine ait pek çok çalışma olmasına rağmen uygulanması ve kullanımı ile ilgili bir takım zorluklar vardır. Guimaraes ve Oliveira (2014) karvakrolün kansere bağlı acıların giderilmesinde kullanımı üzerinde çalışmış, çalışma sırasında sıcaklığa bağlı miktar değişimi incelenmiştir. 168°C sıcaklıkta karvakrolde hızlı bir şekilde ağırlık kaybı gözlenmiştir. Uçucu bir yağ olan karvakrolün sıcaklık ile ağırlık kaybetmesi, uçarak ortamdan uzaklaştığını göstermektedir. Karvakrolün uçmasını engelleyebilmek amacıyla Higuera ve arkadaşları karvakrol ve hidroksipropil beta siklodekstrin katkılı kitosan filmi üzerinde çalışmalar gerçekleştirmiştir. Kitosan filmleri ile karvakrol absorpsiyonunun, karvakrolün mekanik direncini arttırdığı, su buharına karşı bariyer özelliği kattığı ve termal bozulmayı engellediği tespit edilmiştir [88].

1.4 Oleuropein

Zeytin ağacı, günümüzde bilinen en uzun yaşayan ağaçlardan birisidir. Uzun yaşam ve sahip olduğu diğer önemli biyolojik özelliklerin etkeni olarak içerdiği oleuropein fitokimyasalı görülmektedir [89- 92]. Oleuropein *Cornaleae*, *Oleaceae* ve *Gentianaceae* familyalarında yüksek oranlarda bulunmaktadır. [93].

1908 yılında Bourquelot ve Vintilesco tarafından keşfedilen oleuropeinin yapısı 1960 yılında ancak tanımlanabilmiştir [94]. Zeytinin hasattan hemen sonra tüketilememesinin nedeni olan acı tada sahip oleuropein, suda çözünbilme özelliğine sahiptir. Alkali uygulaması, salamura, enzimatik yöntem gibi uygulamalar sonucu hidrolize edilerek zeytinden uzaklaştırılmaktadır [95, 96]. Hidroliz ile parçalanma olayında, oleuropeinin β-glikozidaz enzim aktivitesiyle glikoz ve oleuropein aglikona parçalanmakta, daha sonra esteraz enziminin etkisiyle hidroksitriosol ve elenolik asidi

oluşturduğu bilinmektedir [97].



Şekil 1.4: Hidroksitrizolün antioksidan mekanizması

Oleuropeinin antioksidan, antimikrobiyal, antiaterojenik, anti-enflamatuar, antiviral, antikarsinojenik aktiviteler dahil olmak üzere pek çok farmakolojik özelliğe sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından deneysel çalışmalar ile belgelenmiştir [97-103]. Oleuropeinin anti-kanser, anti-inflamatuvar gibi etkilerinin yanında, güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu belirtilmektedir [104].

Zeytin yapraklarından elde edilen oleuropeinin diyabetik tavşanlar üzerinde oksidatif stres, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar üzerine etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak oleuropeinin diyabet ile indüklenen hiperglisemi ve oksidatif stresini inhibe etme potansiyeli olduğu ve oksidatif stres kaynaklı hastalıkların önlenmesinde etkili olabileceği rapor edilmiştir [105].

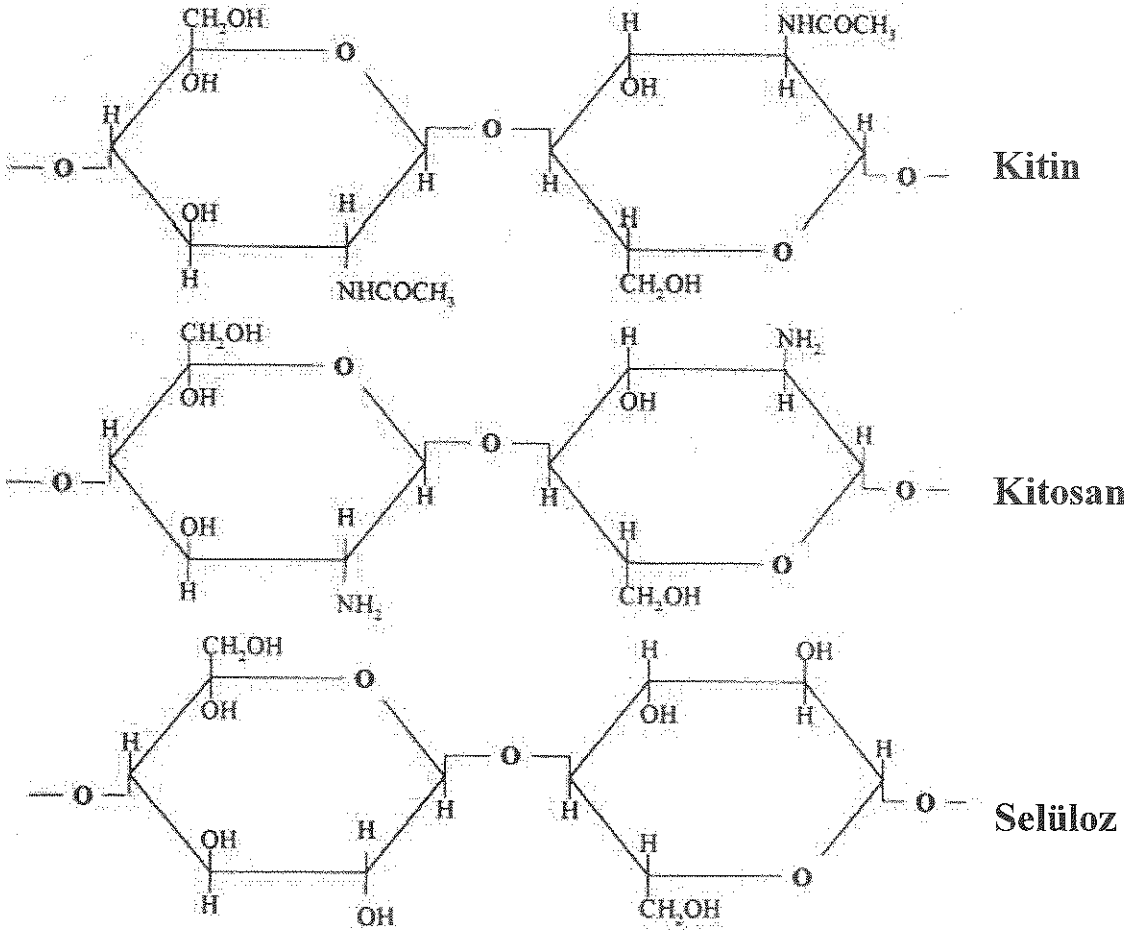
Literatürde yer alan sayısız etkisinin yanında oleuropeinin acı bir tada sahip olması ve sıcaklığa karşı duyarlı olması pek çok sektörde kullanımını sınırlandırmaktadır [75]. Stamatoopoulos ve Katsoyannos (2014) zeytin yapraklarından ekstrakte edilen oleuropein ve diğer fenolik bileşiklerin termal stabilitesini araştırmıştır. Oleuropeinin 80°C'den sonra bozulduğu, antioksidan etkinliğinin azaldığı gözlenmiştir [106].

Bahsi geçen moleküller, literatür tarafından etkileri kanıtlanmış, antibakteriyel,

antifungal ve antioksidan özelliklere sahip fitokimyasallardır. Ancak sıcaklık ve oksidasyon gibi çevresel etmenlerin bu fitokimyasalların özelliklerine etki etmesi, çeşitli sektörlerde kullanılabilirliklerini kısıtlamaktadır. Bu tez çalışmasında, etkileri literatürde kanıtlanmış bu fitokimyasalların sahip oldukları özelliklerin korunabilmesi amacıyla enkapsüle edilmesi hedeflenmiştir. Enkapsülasyon işleminin gıda sektöründe de kullanılabilmesi hedeflendiğinden, biyouyumlu, biyobozunur ve toksik etkiye sahip olmadığı bilinen, FDA ve GRAS onaylarına sahip kitosan biyopolimeri seçilmiştir [107].

1.5 Kitosan

Kitosanın keşfi, 1811 yılında kitinin keşfine dayanmaktadır. Fransa- Nancy’de yer alan bir botanik bahçesinde Profesör Henri Braconnot’un mantarların hücre duvarından “fungin” adını verdiği maddeyi izole etmiştir. Selülozun keşfinden yıllar önce Odier, bu yapının bitki hücrelerinde de bulunduğunu söyleyerek fungine “kitin” adını vermiştir. Lassaigne’nin 1843 yılında kitinin yapısında azot bulunduğunu kanıtlamasıyla kitin daha anlaşılır bir hal almıştır. Kabuklu deniz hayvanları, kitinin başlıca kaynağıdır. Bununla beraber deniz yosunları, sölenterler, yumuşakçalar, prokaryotlar, eklembacaklılar, bakteriler, mantarlar, halkalılar, solucanlar ve bazı bitkiler de yapılarında kitini barındırırlar. En zengin kitin kaynakları; ıstakoz, pasifik karidesi ve dungeness yengeci olarak sıralanabilir [107].



Şekil 1.5: Kitin, kitosan ve selülozun kimyasal yapısı

Rouget'in 1859 yılında suda çözünmeyen kitine ısı ve kimyasal işlemler uygulayarak çözünür hale getirmesiyle kitosanın keşfi başlamıştır [108]. Keşfinden sonra kırmızı kan hücrelerini bağlama yeteneği, daha sonrasında da su arıtma tesislerinde zararlı maddeleri tutucu olarak kullanılan kitosan, günümüzde pek çok konuda araştırmalara konu olmuştur. Kitosan ile ilgili 2013 yılı Ekim ayına dek 101340 adet patent başvurusu yapılmıştır. Literatürde kitosan ile ilgili toplam 40,149 olmak üzere; gıda sektörüyle alakalı 16.626, tekstil sektörüyle alakalı 4.368, tarım sektörü ile alakalı 4.260 çalışma yer almaktadır [109].

Kitosan, kitinin deasetilleştirilmesiyle elde edilmiş - (1,4)- 2-asetoamido-2-deoksi-D-glikoz ve-(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glikoz ünitelerinin bir kopolimeridir.

Kabuklu hayvanların ve mantarların hücre duvarlarında yapısal polimer olarak bulunmaktadır. Bu canlıların kabukları kuru kütle göz önüne alındığında %14-35 oranında kitosan içerebilmekte, atık maddelerden geri kazanımla da her yıl $1.2 \cdot 10^5$ tondan fazla kitosan üretilmektedir. Rakamlara bakıldığında kitosanın kolay bulunmasından dolayı pek çok çalışmaya konu olabileceği düşünülmüştür. Bunun yanısıra literatürde sudaki kısmi çözünürlüğünden dolayı pek çok yararının yeni keşfedildiği belirtilmektedir [110]. Kitosan; formik asit, asetik asit, laktik asit, tartarik asit, malonik asit ve sitrik asit gibi organik asitlerin olduğu ortamlarda çözünerek polikasyonik bir polimer haline gelmektedir [111].

Kitosanın moleköl ağırlığı 50-2000 kilodalton (kDa) arasındadır ve genellikle moleköl ağırlığına göre isimlendirilirler. Orta moleköl ağırlıklı, düşük moleköl ağırlıklı ve yüksek moleköl ağırlıklı olmak üzere üç farklı moleköl ağırlıkta kitosan bilinmektedir.

Çözünürlük deasetilasyon derecesine, derişime, çözücü olarak kullanılan asitin cinsine, pH ve sıcaklığa bağı olarak değışebilmektedir. Deasetilasyon derecesi kitosanın azot içeriğini etkilemektedir. Buna bağı olarak azot içeriğı genellikle %5-8 arasındadır. Kitosan, kitinin deasetilasyonu ile elde edildiğinden farklı deasetilasyon seviyelerinden de bahsetmek mümkündür. Bu özellikleri % 40-100 aralığında değışebilmektedir. Ancak suda daha kolay çözünebilmesi için deasetilasyon seviyesinin %75'ten yüksek olması gerekmektedir [112- 114].

Kitosan genellikle birincil alifatik amino gruplarına sahiptir. Bu özelliğı sayesinde de kimyasal modifikasyonlar için uygundur. Kitin ve selülozdan farklı olarak kitosanın sahip olduğı amin grupları çözünürken protonlanır ve bu protonlanma kitosana pozitif yük kazandırır [115]. Bu özellik, pek çok polisakkaritin aksine kitosanın pozitif yüklü bir polimer olduğunu göstermektedir [116]. Bu özelliğı sayesinde kitosan negatif yüklü lipidler, proteinler ve birçok biyoaktif moleküllere kolaylıkla bağlanabilmekte, alginat, TPP gibi negatif yüklü polimerlerle ağı ve matris oluşumu gerçekleştirebilmektedir. Bunun yanısıra vücuttaki hyalüronik asit gibi önemli fonksiyonel karbohidratlarla uyumlu olduğı belirtilmektedir [117].

Kitosanın; bol miktarda temin edilebilme kolaylığı, toksik değil biyouyumlu ve biyobozunur olması, antibakteriyel, antiülser, asitlik giderici, antioksidan, antitümör ve antifungal etki oluşturma gibi özellikleri de literatürde belirtilmektedir [118].

Gıda ürünlerinde koruyucu katkı maddesi olarak kullanılabileceği düşünülen kitosanın antimikrobiyal aktivitesinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak konu ile ilgili öne çıkan bazı teoriler vardır. Konu ile ilk teori; kitosanda bulunan pozitif yüklü amino ($-NH_3^+$) gruplarının bakterinin hücre membranında bulunan negatif yüklü karboksilat ($-COO^-$) grupların bağlanması ile hücre membranında sızıntıya sebep olarak protein yapılarının dışarıya çıkmasına yol açması üzerinedir. Diğer bir teori; kitosanın iz metaller (bakır, selenyum, çinko gibi) bağlanarak şelat oluşturmaya üzerinedir. Yapılan diğer çalışmalarda da kitosanın, ortamda bulunan su ve besini bağlayarak yaşamsal faaliyetleri engellediği, böylece mikrobiyal gelişmenin de yavaşladığı yönündedir. Bir diğer teori; düşük moleküler ağırlıklı kitosanın, mikroorganizmanın hücre duvarından geçerek DNA'sına bağlandığı, mRNA ve protein sentezi inhibisyonuna neden olduğu yönündedir. Bir başka teoriye göre de; hücrede bulunan negatif yüklü maddeleri adsorplayarak çöktürmesi ve hücrenin fizyolojik aktivitelerine zarar vererek devamında hücre ölümüne sebep olduğu şeklindedir [119-123].

Kitosanın antimikrobiyal etkisi deasetilleme derecesi, molekül ağırlığı, sıcaklık, pH, gibi iç ve dış faktörlerden etkilenmektedir. Tanigawa ve ark., kitosanın etkili olmasına karşın monomeri olan D-glukozamin hidroklorürün birçok bakteriye karşı antibakteriyel etki göstermediğini rapor etmiştir. Bu durum karşısında, kitosanın sahip olduğu antimikrobiyal etkinin sadece pozitif yükünden değil, aynı zamanda zincir uzunluğundan da kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarla düşük moleküler ağırlıklı kitosanın Gram negatif bakterilerde, yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın ise Gram pozitif bakterilerde daha etkili olduğu görülmüştür [124].

Kitosanın deniz mahsullerinin raf ömrünü arttırmaya yönelik çalışmalarında olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Tsai ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan bir başka çalışmada, balıkların korunmasında kitosanın etkileri üzerinde durulmuş ve bu çalışmada kitosanın deasetilasyon dereceleri test edilmiştir. Uygun MLC değerleri bildirilmiştir [125]. *MLC, uygun çevre ve ortam koşullarında tanımlanmış test*

organizmalarını öldüren madde konsantrasyonu olarak tanımlanabilir [126].

Tsai ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışma sonuçlarında kitosanın yüksek deasetilasyon derecelerinde (DD95 ve DD98) Gram negatif bakterilere (*E. coli* , *P. aeruginosa* , *S. dysentriae* , *V. cholerae* ve *V. parahaemolyticus*) ve Gram pozitif bakterilere 50- 200 ppm civarlarında, *S. Typhimurium* ve *Aeromonas hydrophila* için 500- 1500 ppm civarlarındadır. Yapılan bu çalışmada balık filetosu (*Oncorhynchus nereka*) 3 saat boyunca %1'lik yüksek deasetilasyon seviyeli kitosan ile muamele edilmiş ve bahsi geçen mikroorganizmaların üremelerini inhibe ettiği için balığın raf ömrünü 5 günden 9 güne uzaması sağlanmıştır [127].

Darmadji ve Izumimoto (1994) nin yaptığı çalışmada sıvı ortamda (maya özü pepton, glikoz suyu veya YPG) ve et (kıyma) içeriğinde oluşabilecek antimikrobiyal aktivite kitosan kullanılarak engellenmeye çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda sıvı ortamda 24 saat boyunca 30 ° C'de inkübe edilen *P. fragi*, *B. subtilis* ve *S. aureus* üremesi % 0.01 kitosan ile önlenebilmiştir. *E.coli*, *L. plantarum* ve *P. pentosaceus* üremeleri için ise kitosanın % 0.1 'lik konsantrasyonları gerekmiştir. *Staphylococci*, koliform, Gram-negatif bakteriler, *Pseudomonas* ve mikrokoklar dahil bozulma etkeni bakterilerin çoğalmasını engellemek için,% 1.0 konsantrasyon yeterli olmuştur. Ancak bu etkinin 10 gün boyunca 4 ° C'de saklanabilmesi için kitosan derişiminin 0.5 kat artırılması gerektiği görülmüştür.

Tsai ve Su (1990) *E.coli* inhibisyonunun kitosanın pH'ı ile alakalı olduğunu düşünmüş ve bu doğrultuda çalışmalar yapmıştır. Kitosanın pH 9.0 da çok az antimikrobiyal aktiviteye sahipken pH 5.0- pH 7.0 arasında ise maksimum etkiye sahip olduğu görülmüştür [127].

Kitosanın antifungal aktivitesinin mekanizması üzerindeki düşünceler plazma membranının iyonik dengesini değiştirmesiyle ilişkilendirilmektedir. Kitosanın moleküler ağırlığı, antifungal duyarlılığını da etkilemektedir. *Rhizopus* türleri ile yapılan çalışmalarda düşük moleküler ağırlıklı kitosanın misel gelişimini durdurduğu, yüksek moleküler ağırlıklı kitosanın ise spor oluşumunu inhibe ettiği görülmektedir [127- 131]. Fang, S.W kitosanın farklı pHlardaki etkilerini araştırmış ve *A. niger*'e karşı asidik ortamda etkili olduğu gözlenmiştir. 5 mg/ml konsantrasyondaki kitosanın *A. niger*'den protein içeriğinin sızmasına neden olduğu, bununla beraber fungal üremeyi

%100 engellediği rapor edilmiştir. Nötr pH'da (pH 7.6) kitosanın bu tür bir etki göstermediği gözlenmiştir [128].

Literatür çalışmalarına göre kitosan ve türevleri *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *R. stolonifer*, *Byssoschlamys spp.*, mayalara *Candida albicans*, *C. lambica*, *S.s cerevisiae*, *Rhodotorula glutensis* türlerine karşı antifungal aktivite gösterebilmektedir [112, 132- 138]

Literatürde kitosan ile biyoaktif maddelerin mikro/nanokapsüle edilmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda kitosanın omega 3 gibi kokusundan dolayı gıdalarda kullanılmayan biyoaktif maddelerin kokusunu perdelediği, kuersetin gibi düşük biyoyararlanımlı biyoaktif maddeleri çevresel ve enzimatik reaksiyonlara karşı koruyarak biyoyararlanımını arttırdığı gözlenmiştir.

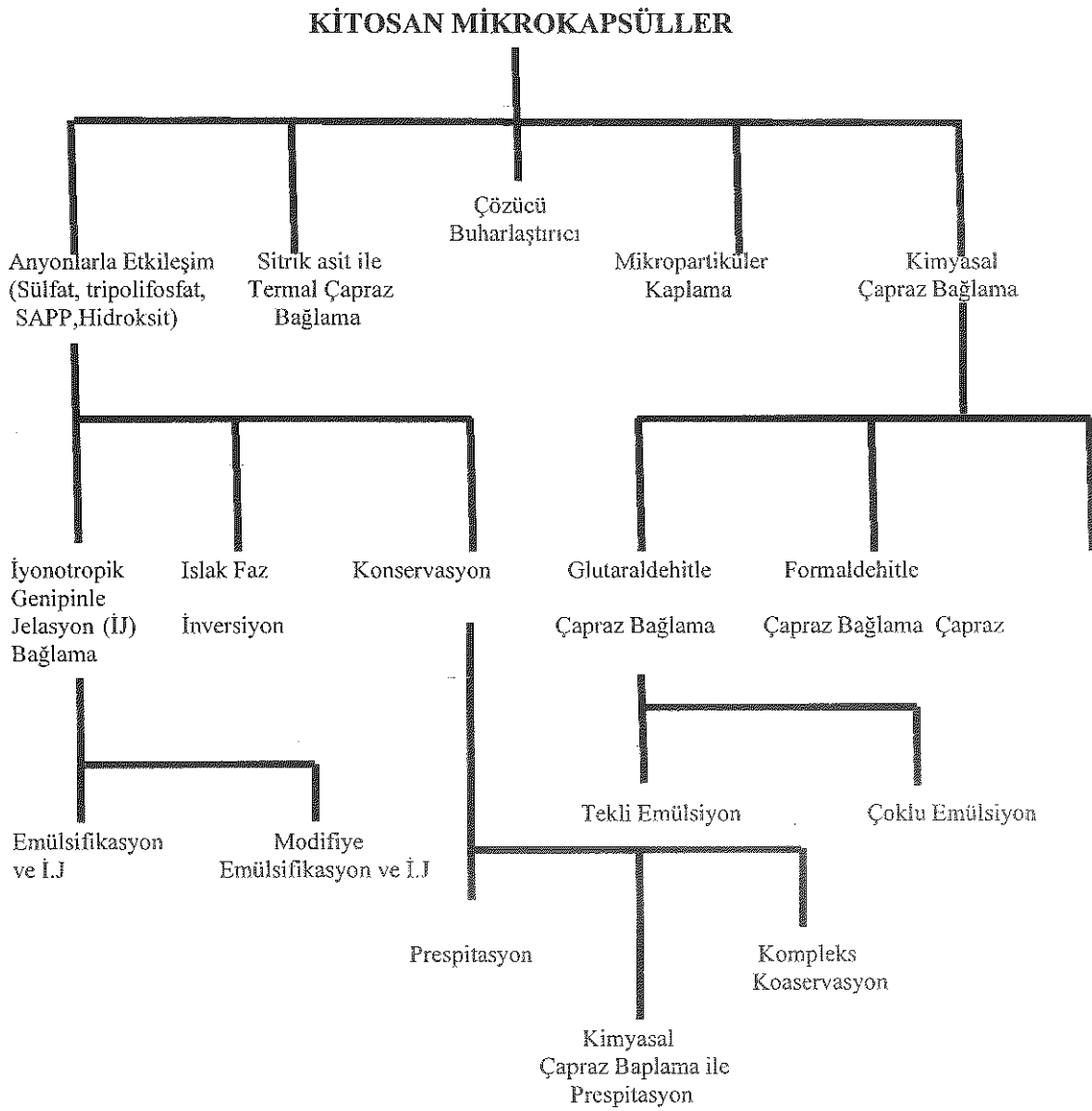
Organik, toksik olmayan ve biyoyoumlu olan kitosanın enzim, antijen ve esansiyel yağlar gibi hassas bileşenleri muhafaza edebilmesi, enkapsülasyon işlemi için önemli bir kaplama maddesi olmasını sağlamıştır. Kapsüllenmeden kokulu bir yapıya sahip olan balık yağının kitosan ile kaplandıktan sonra kokusunu kaybettiği, dolayısıyla katıldığı gıda ürünlerinin kalitesini bozmadığı görülmüştür [139- 141].

Klinkesorn ve arkadaşları (2005) lesitin/kitosan filmlerini fonksiyonel gıdalarda kullanılacak suda çözünen balık yağını stabilize etmede ve okside olmasını engellemede kullanmıştır. Hsieh ve arkadaşları (2006) dereotu yağının uçmaması ve kontrollü salınımının sağlanabilmesi için ısıyla salınım gerçekleştirebilen kitosan mikrokapsüller üretmiştir [142, 143]

Swarf ve arkadaşlarının (2010) gentamisin'in yarılanma ömrünü arttırmak üzerine yaptıkları çalışmada kitosan ile nanoenkapsülasyon işleminin antimikrobiyal aktiviteyi değiştirmeden yarılanma ömrünü arttırdığı gözlenmiştir. Bir başka çalışmada kuersetinin biyoyararlanımını arttırmak amacıyla yapılan çalışmada kitosan ile enkapsülasyon işleminin antioksidan özelliklerini koruyarak biyoyararlanımını arttırdığı gözlenmiştir [144, 145]

1.6 Kitosan Mikrokapsül Hazırlama Yöntemleri

Kitosanın çok değerlikli anyonlar ile reaksiyona sokulması, çapraz bağlanma ile sonuçlanır. Çapraz bağlanma yöntemi kitosan mikrokapsüllerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Şekil 1.6'da kitosan mikrokapsüllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemler yer almaktadır.

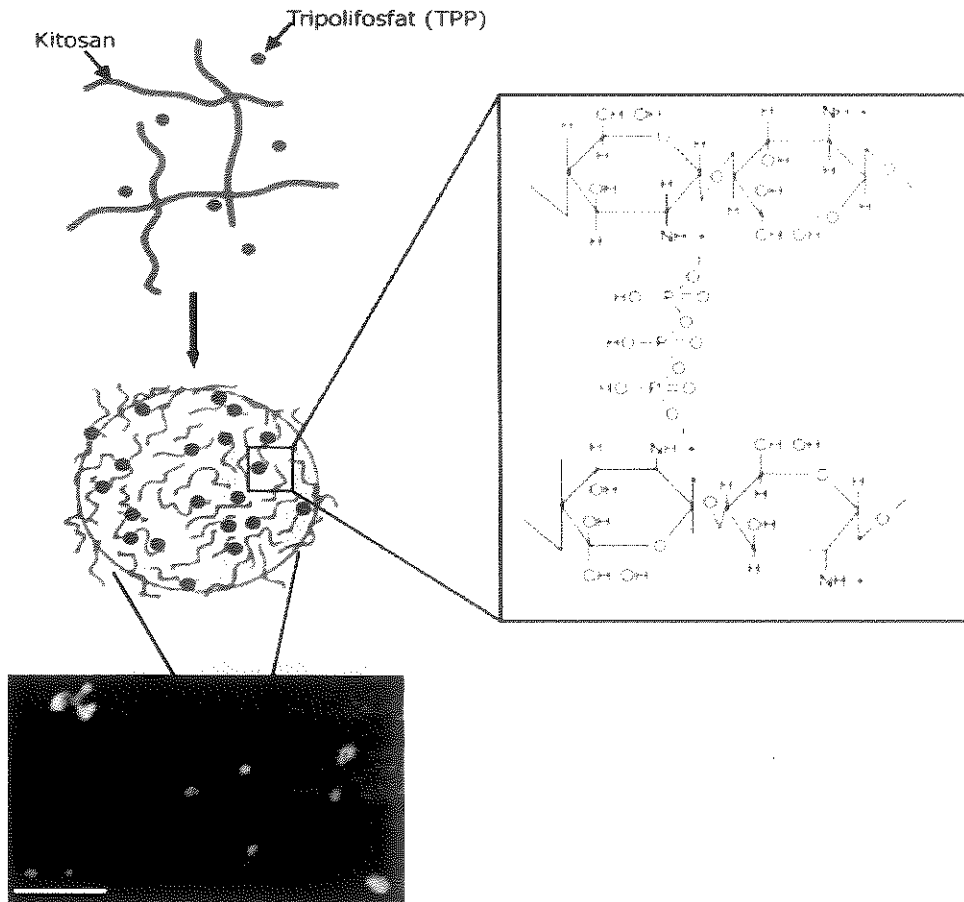


Şekil 1.6: Kitosan mikrokapsül hazırlama yöntemleri [146]

1.6.1 Anyonlarla Etkileşim Esasına Dayalı Yöntemler

1.6.1.1 İyonotropik jelasyon

Çalışmamızda da kullanılan bu yöntemde kitosan mikrokapsülleri hazırlamak için ters yüklü moleküller arasında çapraz bağlanma oluşumundan yararlanılmıştır. Tripolifosfat (TPP), pozitif yüklü kitosan ile elektrostatik olarak etkileşime girebilen bir polianyondur. Bodmeier ve ark.'nın kitosan mikrokapsülleri hazırlamak için kitosana damlatma yöntemiyle TPP eklemesi sonrasında bu yöntem günümüzün en çok tercih edilen yöntemlerinden biri haline gelmiştir.



Şekil 1.7: Kitosan – TPP nanoparçacık birimlerinin görüntüsü [147]

İyonotropik jelasyon için kullanılan çapraz bağlayıcılar üç grupta incelenebilir:

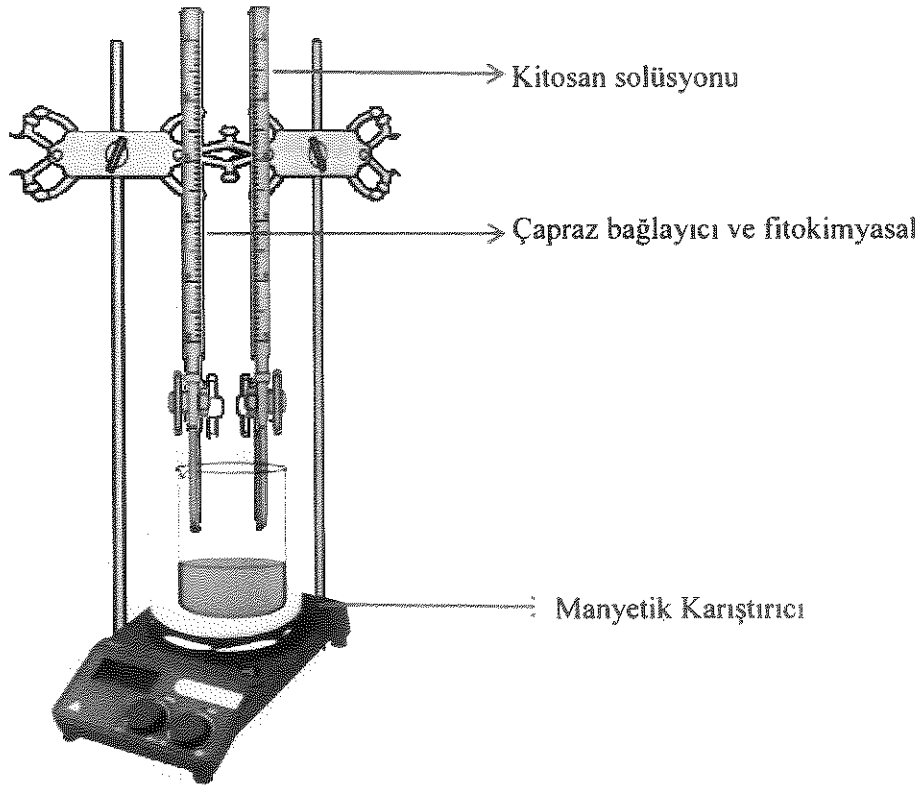
- düşük moleküller ağırlıklı iyonlar (Pirofosfat, tripolifosfat, tetrapolifosfat, oktapolifosfat, heksametafosfat gibi...),
- hidrofilik ajanlar (alginat, k-karagenan, poli-1-hidroksi-1-sülfonat-propen-2,

polialdehidro-karbonik asit gibi...),

c) yüksek moleküler ağırlıklı iyonlar (Oktil sülfat, lauril sülfat, hakzadesil sülfat, setilsteril sülfat gibi...) [148]

İyonotropik jelasyon yöntemi ile sentelenen mikrokapsüllerin salınımını etkileyen parametreler;

- Polimer tipi ve viskozitesi,
- Polimer konsantrasyonu,
- Çapraz bağlayıcı ajan konsantrasyonu,
- Yüklenen etkin madde miktarı,
- Jelleşme süresi,
- Kurutma süresi ve şekli olarak sıralanabilir.



Şekil 1.8: İyonotropik Jelasyon Yöntemi

İyonik jelleşme yönteminde; kitosan, asidik çözücüde çözülür. Bu çözelti daha sonra damlatma yoluyla sabit bir karıştırma hızında, poli-anyonik TPP çözeltisine

karıştırılır. Zıt yükler arasındaki kompleks oluşumuna bağlı olarak, kitosan iyonik olarak jelleşir ve küresel partiküller oluşturur [149]. Yöntemin uygulanışı kısaca şematik olarak Şekil 1.8’de verilmiştir.

Günümüzde kullanılan gıda katkı maddelerinin gıdaları yeteri kadar koruyamaması, insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler oluşturması, yeni, etkili ve insan sağlığına dost katkı maddelerinin geliştirilmesine ihtiyaç doğurmuştur. Literatürde yer alan antibakteriyel etkinliği yüksek allisin, karvakrol, timol, antifungal etkinliği yüksek allisin ve karvakrol, antioksidan etkinliği yüksek oleuropein ve kuersetinin, zararlı katkı maddelerine alternatif olarak sunulabilecek doğal ürünler olduğu düşünülmektedir. Ancak bahsi geçen fitokimyasalların acı/ kötü tada sahip olması, ısı ve oksidasyon gibi çevresel etmenlerden etkilenmesi, gıda sektöründe kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bu sebeple tez çalışmasında, tüm fitokimyasallar kitosan ile stabil bir şekilde mikrokapsüle edilerek etkinliklerinin korunabilmesi amaçlanmıştır. Pişmiş gıdalar için genellikle kullanılan sıcaklık baz alınarak 180°C’de sıcaklık uygulaması ve 1 hafta hava ile oksidasyona uğratma çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen deney gruplarının biyolojik etkinliklerinin test edilebilmesi amacıyla antibakteriyel, antifungal, antioksidan ve mutajenite testleri yapılmıştır. Fitokimyasal ve fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin çevresel etmenler altında antibakteriyel etkinliğindeki değişimlerin gözlemlenebilmesi amacıyla Gram pozitif *S. aureus*, Gram negatif *E.coli* bakterileri seçilmiştir. Gıdaların raf ömrünü belirleyen en önemli etkenlerden olan antifungal aktivitenin araştırılabilmesi amacıyla gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus* sp. ve *Penicillium* sp.’a karşı antifungal etkinlik testleri gerçekleştirilmiştir. Gıdaları oksidasyona karşı koruması için katılan antioksidan maddelere alternatifler sunulabilmesi amacıyla çevresel etmenler uygulanmış fitokimyasal ve fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin antioksidan etkinliği CUPRAC yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen mikrokapsüllerin insan sağlığına zararlı etkisi olup olmadığını araştırabilmek amacıyla Ames mutajenite testinin uygulanması ve toksisitesi hakkında ön izlenim elde edilebilmesi hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bakteri suşları

1. *S. aureus* ATCC 25923
2. *E. coli* ATCC 25922
3. Gıda kaynaklı *Penicillium sp.*
4. Gıda kaynaklı *Aspergillus sp.*
5. *S. Typhimurium* TA 98
6. *S. Typhimurium* TA 100

2.1.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

1. LB Broth Besiyeri (Sigma-Almanya)
2. Bacto Agar (Sigma-Almanya)
3. Etil Alkol (Merck-Abd)
4. Nitril Eldiven (Pudrasız) (Broche-Türkiye)
5. Alüminyum Folyo
6. Cam Deney Tüpleri
7. Tüp Sporu
8. Plastik Petri Kapları (Firatmed-Türkiye)
9. Bek Alevi
10. Platin Öze (İsolab-Türkiye)
11. Eküvyon Çubuk (İsolab-Türkiye)
12. Cam Baget

13. Pipet Ucu (10µl, 100 µl, 1000 µl) (Axygen-Abd)
14. Quartz Spektrofotometre Küveti (1400 ml) (Hellma-Almanya)
15. Ultra Saf Su (DDH₂O)
16. 0.45 µm'lik Filtre (Whatman-İngiltere)
17. Dimetil Sülfoksit (Sigma-Almanya)
18. MMW Kitosan (Sigma-Almanya)
19. TPP (Sigma-Almanya)
20. Asetik Asit (Sigma-Almanya)
21. 4_Nitro_O_Fenilendiamin (Sigma-Almanya)
22. Sitrik Asit Monohidrat (Sigma-Almanya)
23. K₂HPO₄ (Merck- ABD)
24. NaOH (Sigma-Almanya)
25. Bacto Agar (Sigma-Almanya)
26. MgSO₄.7H₂O (Merck- ABD)
27. NaCl (Merck- ABD)
28. L-Histidin.HCl (Sigma-Almanya)
29. D-Biyotin (Sigma-Almanya)
30. Ampisilin Trihidrat (Sigma-Almanya)
31. Sodyum Azid (Sigma-Almanya)
32. KCl (Merck- ABD)
33. NaH₂PO₄.4H₂O,
34. Neokuproin (Sigma-Almanya)
35. CuCl₂ (Merck- ABD)

36. Potato Dextrose Agar (Sigma-Almanya)
37. Sabouroud Dextrose Agar (Sigma-Almanya)
38. LB Agar (Sigma-Almanya)
39. Quercetin (Sigma-Almanya)
40. Allicin (Jinan Tiantianxiang Co., Çin)
41. Timol (Sigma-Almanya)
42. Karvakrol (Sigma-Almanya)
43. Oleuropein (Sigma-Almanya)

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

1. **Multimod Mikroplaka Okuyucu ve Görüntüleyici (Biotek-ABD):** Çevresel koşullara maruz bırakılan fitokimyasal ve fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin antibakteriyel ve antioksidan özelliklerinin araştırılması için kullanılmıştır.
2. **Soğutmalı Santrifüj (Beckman-Coulter-ABD):** Mikrokapsüllerin sentezi aşamasında çözünmeyen kitosan ve fitokimyasalların çöktürülmesi için kullanılmıştır.
3. **pH Metre (Thermo-ABD):** Asetik asit ve NaOH kullanılarak kimyasalların pH ayarlamasında kullanılmıştır.
4. **Ultra Derin Dondurucu (Esco-Singapur):** Suşların -86°C'de uzun süreli saklanması (3-6 ay) için kullanılmıştır.
5. **Manyetik Karıştırıcı (WiseStir-Almanya):** Besiyerleri otoklava atılmadan önce karışımın homojenize edilmesi için kullanılmıştır.
6. **UV-VIS Spektrofotometre (Beckman-Coulter-ABD):** Sıvı bakteri ve küf kültürlerinin optik yoğunluklarının ölçümünde kullanılmıştır.
7. **Dijital Hassas Terazi (Ohaus-ABD):** Besiyeri ve katı kimyasalları tartmak için kullanılmıştır.
8. **İnkübatör (Mettler-Almanya):** Bakteri ve küflerin inkübasyonu için kullanılmıştır.

9. **Vorteks (Heidolph-Almanya):** Sıvı besiyerleri, fitokimyasal ve mikrokapsül çözeltilerinin karıştırılması için kullanılmıştır.
10. **Otoklav (Nüve-Türkiye):** Besiyeri hazırlama ve tüm sterilizasyon işlemleri sırasında kullanılmıştır.
11. **Mikropipetler (1000µl, 100µl, 10µl) (Thermo/ Finnpiette-ABD):** Besiyerleri, sıvı bakteri ve küf kültürleri ve sıvı kimyasalların aktarımında kullanılmıştır.
12. **Mikrodalga Fırın (Phillips-ABD):** Besiyeri hazırlanmasında kullanılmıştır.
13. **Class II Ayaklı Steril Güvenlik Kabini (Esco ve Faster-Singapur ve İtalya):** Bakteri ve küf çalışmalarının steril ortamda gerçekleştirilebilmesi için kullanılmıştır.

2.2 YÖNTEM

2.2.1 Kitosan ile Mikro/Nanoenkapsülasyon İşlemi

Fitokimyasalların mikro/nanoenkapsülasyonu, iyonotropik jelasyon yöntemi ile yapılmıştır [151]. Suda çözünmeyen kitosan, organik asitlerin olduğu sulu ortamlarda çözünebilmektedir. Kitosan asetik asitin bulunduğu sulu ortamda tamamen çözündükten sonra pH 4- 5 aralığında bir değere ayarlanarak protonasyonu sağlanmıştır. Negatif yüklü TPP (sodyum tripolifosfat) kullanılarak sulu ortamda tamamen çözünmüş olan pozitif yüklü kitosanın çapraz bağlanmalar yapması sağlanmıştır. Bu çapraz bağlanmalarla beraber nanoparçacıklar üretilmiştir. Etken maddeler, kitosan ve TPP manyetik karıştırıcı ile 24 saat 800 rpm hızda manyetik karıştırıcı karıştırılmıştır. Kontrol olarak kullanılan kitosan çözeltisi ise %1'lik asetik asitte kitosanın çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

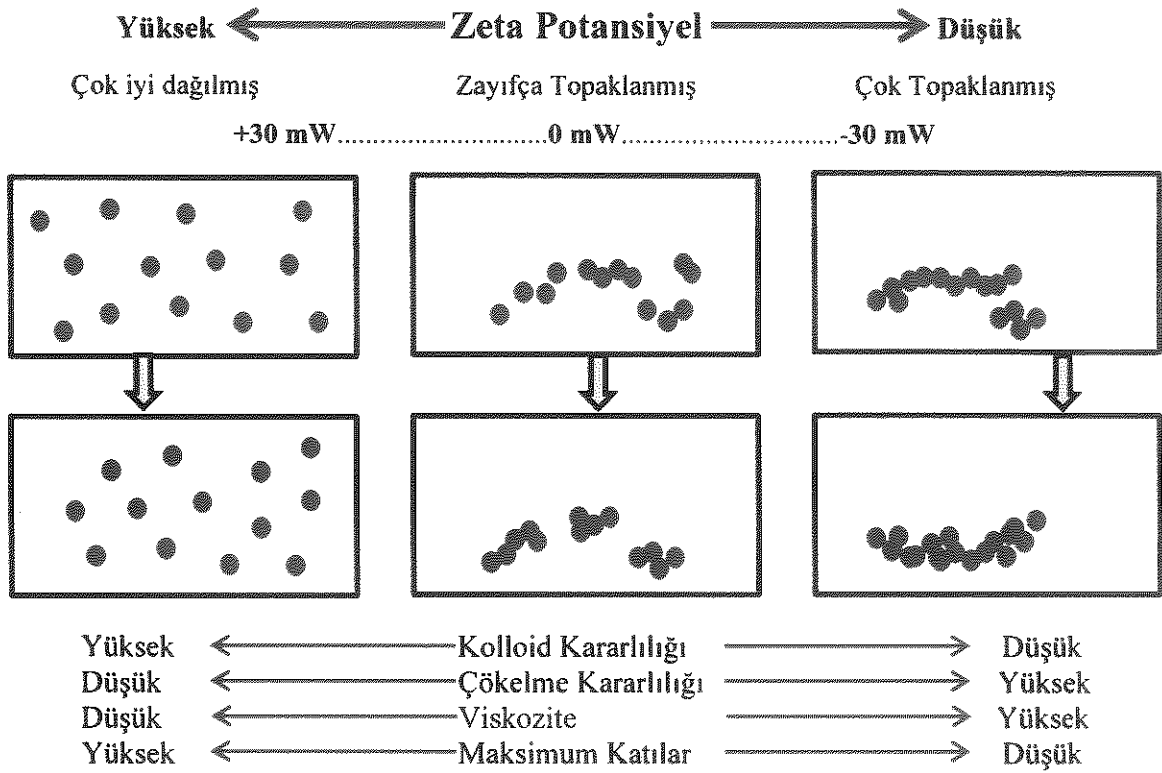
2.2.2. Mikrokapsüllerin Karakterizasyonu

2.2.2.1 Mikrokapsül Morfolojisinin SEM ile İncelenmesi

Mikrokapsüller hazırlandıktan sonra taramalı elektron mikroskobu tekniğine uygun olarak altınla kaplanması suretiyle görüntüleri alınmıştır. SEM (Zeiss- EVO LS 10) analizleri Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarları'ndan hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.2 Mikrokapsül Boyut ve Zetapotansiyel Değerlerinin İncelenmesi

Mikrokapsüllerin boyut, zetapotansiyel ve elektroforetik mobilite analizleri Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarları'ndan SEM ve Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.1: Zeta potansiyeli stabilite aralıkları ve süspansiyon özelliklerine etkisi

2.2.3. Mikroenkapsülasyon Veriminin Tayini

Hazırlanan mikrokapsüllerin fitokimyasal içeriğinin tayin edilebilmesi için spektrofotometrik yöntemden yararlanılmıştır [150]. Mikrokapsüller, verim hesaplamasından önce %1 lik asetik asit ile muamele edilerek kitosan kapsülün çözünmesi sağlanmıştır. Spektrofotometrede miktar değişiminin kolayca anlaşılabilmesi amacıyla kuersetin ve kuersetin mikrokapsüller üzerinde çalışılmıştır. Standart olarak kullanılan fitokimyasal solüsyonu, mikrokapsüller ile aynı oranda asetik asit ile muamele edilmiştir. % verim aşağıdaki formül doğrultusunda hesaplanmıştır.

$$\% \text{ verim} = \frac{\text{OD kontrol} - \text{OD örnek}}{\text{OD kontrol}} \times 100$$

2.2.4. Enkapsüle Edilmiş Etken Maddelerin Farklı Çevresel Koşullara Maruz Bırakılması

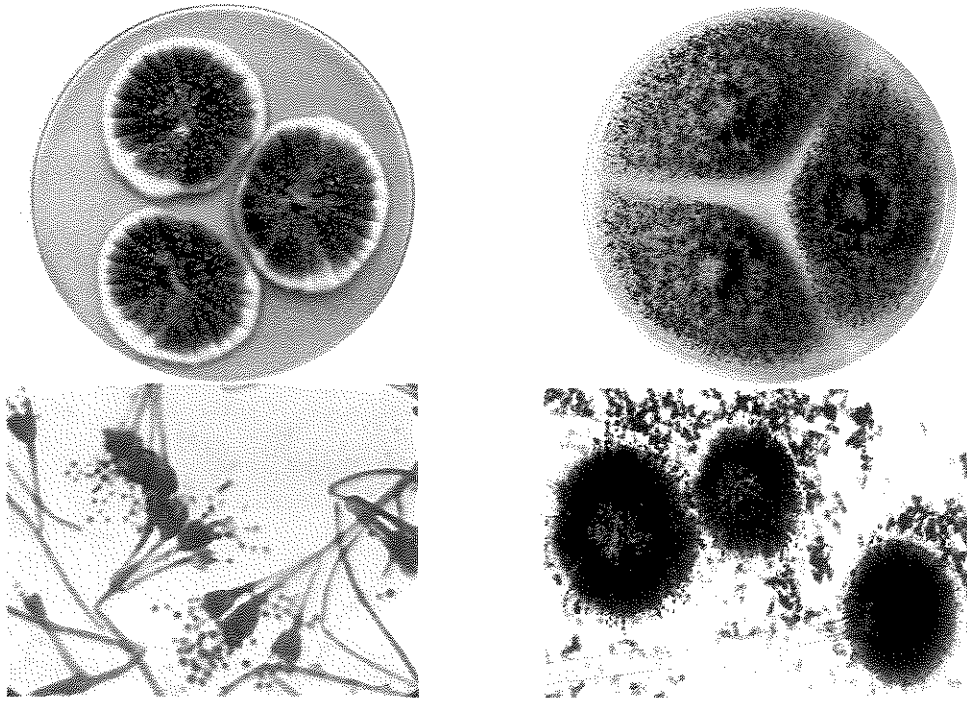
Etken maddeler ve mikrokapsüllerin farklı çevresel koşullar altında özelliklerinin değişiminin araştırılabilmesi için hava ile oksidasyon ve ısı işlemleri uygulanmıştır.

- **Oksidasyon:** Mikrokapsüllerin oksidasyona karşı koruyuculuğunun test edilebilmesi amacıyla mikrokapsüller 1 hafta oda koşullarında orbital karıştırıcı (Stuart, SSL1) yardımı ile 80 rpm hızda karıştırılmıştır. Örnekler deneyler gerçekleştirilene kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

- **Isı:** Mikrokapsüllerin ısıya karşı koruyuculuğunun test edilebilmesi işlemi mikrokapsüller gıda ürünlerinin pişmesi için gerekli olan 180°C'de ısı uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. 0., 10., 20., 30. dakikalarda örnekler alınarak etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Örnekler deneyler gerçekleştirilene kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.

2.2.5. Antimikrobiyal Etkinlik Testleri

Tez çalışmasında kullanılan mikrofunguslar ekmekten izole edilmiş ve laktofenol blue ve laktil asit kullanılarak mikroskop altında incelenmiştir. Türlerin tayini Yeditepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Yrd. Doç. Dr. İskender KARALTI tarafından onaylanmıştır. *Aspergillus* sp. ve *Penicillium* sp. mikroskopik görüntüleri Şekil 2.2' de verilmiştir.



Penicillium sp.

Aspergillus sp.

Şekil 2.2: *Penicillium sp.* ve *Aspergillus sp.* katı besiyerinde ve mikroskop altında görüntüleri

2.2.5.1. Antibakteriyel Aktivitenin İncelenmesi

Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş etken maddelerin antibakteriyel aktivitesi Broth mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Test mikroorganizmaları 37°C 'de Luria-Bertani Broth (LB) besiyerinde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bakteri suşları UV-Vis spektrofotometrede ölçülerek bakteri konsantrasyonu belirlenmiştir. Belirlenen bakteri suşlarının konsantrasyonu 0.5 Mc Farland standardını elde etmek amacıyla 625 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ayarlanmıştır. 0.5 Mc Farland standardına göre ayarlanan bakteri süspansiyonlarının besiyerleri bulunan platelere ekimleri gerçekleştirilmiştir. Bakteri ekimleri yapıldıktan sonra çeşitli konsantrasyonlarda kitosan, fitokimyalar ve fitokimyasal içeren kitosan mikro/nanokapsüller besiyerlerine ilave edilmiştir. Her çalışmada kontrol grupları kullanılmış ve deneyler 3 kez tekrar edilmiştir. Mikroplaka verileri BIOTEK- Cytation 3 cihazı (Şekil 2.3) ile belirli periyotlar ile ölçülerek belirlenmiştir.



Şekil 2.3: BİOTEK- Cytation 3 mikropłaka okuyucu

2.2.5.2. Antifungal Aktivitenin Belirlenmesi

Antifungal aktivitesinin belirlenmesi amacıyla gıda örneklerinden izole edilmiş *Aspergillus sp.* ve *Penicillium sp.* türleri kullanılmıştır. 25-28°C sıcaklıkta 1 hafta inkübe edilmiş test organizmaları 530 nm absorbansta 0.5 Mc Farland değerine ayarlanmıştır. 100 µl çözelti, 100 µl sıvı Malt Dekstroz ve 50 µl mikroorganizma eklenmiştir. Mikro plakalar parafilm ile kaplandıktan sonra oda sıcaklığında 5-15 gün inkübe edilmiştir [151]. Üreme gerçekleşmeyen koyucuklardan 10 µl örnek alınarak katı besiyerine ekilmiş ve mikrofungus üremesine göre etkili doz belirlenmiştir. Deneyler kontrol grupları kullanılarak gerçekleştirilmiş ve her deney 3 kez tekrarlanmıştır.

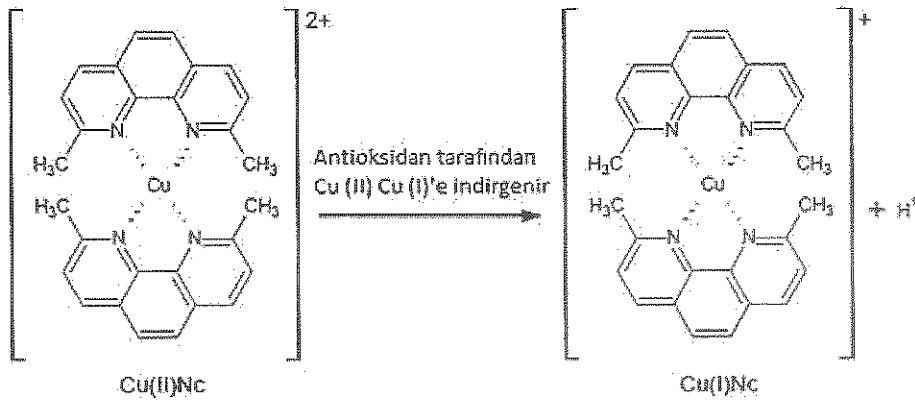
2.2.6. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

2.2.6.1. CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite)

Yöntemi

Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş kuersetin ve oleuropeinin antioksidan özellikleri CUPRAC yöntemi ile belirlenmiştir [152]. Örnekler 96 kuyucuklu plakalarda 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

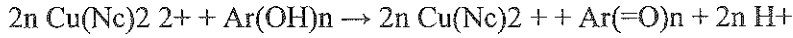
Fitokimyasallar, C ve E vitaminleri, flavonoidler ve glukozidleri, hidrofilik hem de lipofilik maddeler için elverişli, basit, ucuz, pratik, seçici ve duyarlı bir antioksidan kapasite tayin yöntemi olan CUPRAC yönteminde reaktif, amonyum asetat tampon ortamında iyi bir yükseltgen olan bakır(II)-neokuproin çözeltisidir. Reaktifin indirgenmesiyle oluşan Cu(I)-neokuproin kelatının 450 nm dalgaboyundaki absorbansı okunmaktadır. Bu yöntemde, toplam antioksidan kapasite, bakır(II) iyonu indirgeme kapasitesi cinsinden ölçüldüğünden CUPRAC adıyla anılmaktadır. Toplam antioksidan kapasite/aktivite tayininde kullanılan bu yöntem; bakır(II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi (doğrudan veya asit hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir [152].



Şekil 2.4: CUPRAC reaksiyonu

Bu yöntemde kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc varlığında fenolik

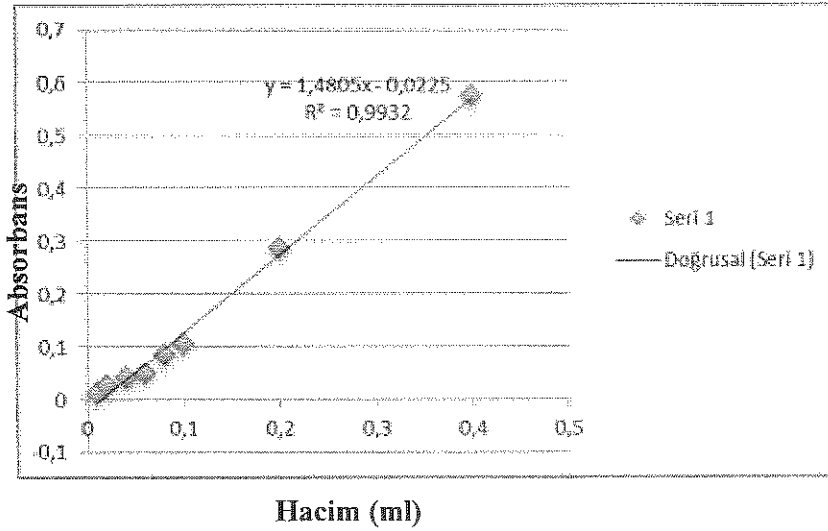
antioksidanlar (Ar(OH)_n) aşağıda verilen reaksiyonu oluştururlar:



CUPRAC yöntemi için 3 farklı solüsyon hazırlanmaktadır:

- $1.0 \times 10^{-2} \text{ M CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 250 ml distile su içerisinde çözölmüştür.
- 1.0 M amonyum asetat 250 ml distile su içerisinde çözölmüştür.
- 1.0 M neokuproinin 50 ml etanol içerisinde çözölmüştür.

Hazırlanan her solüsyondan 50 μl alınmıştır. Üzerine 10 μl antioksidan çözeltisi ve onu 50 μl tamamlayacak kadar distile su konularak ve oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. 30 dk sonra örnekler UV spektrometrede 450 nm absorbansta ölçölmüştür. Referans antioksidan olarak trolox kullanılmıştır.



Şekil 2.5: Trolox standart eğrisi



Şekil 2.6: Fitokimyasallar ve fitokimyasal içeren mikrokapsüllerin oksidasyon düzeneği

2.2.7. Ames Testi İle Mutajenitenin Belirlenmesi

Fitokimyasallar ve kitosan ile mikrokapsüle edilmiş formlarının mutajenitelerinin tayin edilebilmesi amacıyla *S. Typhimurium* TA 98 ve *S. Typhimurium* TA 100 suşlarının üretilmesi, sahip oldukları mutasyonların varlığını kontrol etmek amacıyla genetik özelliklerine yönelik testler ve Ames testi, Maron ve Ames'in geliştirdiği yöntem baz alınarak gerçekleştirilmiştir [153].

2.2.7.1. Kullanılan test suşları

Çalışmada, Ames ve arkadaşları tarafından *S. typhimurium* LT 2 suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilen *S. typhimurium* TA 98 ve *S. typhimurium* TA 100 suşları kullanılmış olup, bu suşlar Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD'den temin edilmiştir. *S. Typhimurium* TA 98 suşu çerçeve kayması, *S. Typhimurium* TA 100 suşu ise baz çifti değişimi mutasyonlarını belirleyen suşlardır. Bu suşların genotip özellikleri şöyledir:

S. typhimurium TA 98: his D 3052, rfa, Δuvr B, +R

S. typhimurium TA 100: his G 46, rfa, Δuvr B, +R

LT2 atasal suşu, histidin amino asidini sentezleme yeteneğine sahiptir. Mutant suşlar, histidin operonunun farklı yerlerinde, farklı tipte mutasyonlar içerdiklerinden dolayı ortamda hazır olarak histidin aminoasidi bulunmadığında üreyemezler. Mutant suşlar histidin mutasyona ek olarak, mutajenleri ortaya çıkarma yeteneklerini büyük oranda arttıracak başka mutasyonlar içermektedirler. Mutajen bir maddeye maruz bırakılan bu mutant suşların histidin sentezleme yeteneklerini geri kazanmaları test maddesinin mutajenik olduğunu göstermektedir [154].

2.2.7.2. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı

Bu çalışmada antioksidan, antifungal ve antibakteriyel etkileri bilinen fitokimyasallar belli oranlarda tartılarak dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözdürülmüştür.

2.2.7.3. Besiyerleri, Tamponlar ve Çözeltiler

2.2.7.3.1. Vogel-Bonner-E Ortamı (50 x VB tuzları)

Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	5 g
Sitrikasit monohidrat	50 g
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	250 g
Sodyum amonyum fosfat ($NaH_2N_4 PO_4 \cdot 4H_2O$)	87,5 g
Sıcak Distile su	335 ml

Maddeler sıcak distile su içerisine sırası ile çözdürülür. Toplam hacim 500 ml'ye tamamlanıp 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. Kullanılana kadar oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda saklanır.

2.2.7.3.2. (0,5 mM) Histidin/Biyotin Solüsyonu

D-Biyotin	15,85 mg
L-Histidin-HCl	12,0 mg
Distile su	125 ml

Biyotin su yavaş yavaş kaynatılarak çözdürüldükten sonra tamamlanıp 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. Sıcaklık 40°C'ye ulaştığında L-histidin ilave edilir.

2.2.7.3.3. Ampisilin Solüsyonu

Ampisilin trihidrat	0,4 g
0,02 N NaOH	50 ml

Ampisilin trihidrat, sodyum hidroksit içinde çözülür ve 45 µm çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir, kullanılabilecek kadar +4°C'de, ışık geçirmeyen bir cam şişede saklanır.

2.2.7.3.4. (%1) Kristal viyole Solüsyonu

Kristal viyole	0,1 g
Distile su	100 ml

Kristal viyole distile su içinde çözdürülür, +4°C'de koyu renk şişede kullanılabilecek kadar saklanır.

2.2.7.3.5. (% 0,13) Biotin Çözeltisi

D-biyotin	0,375 mg
Distile su	25 ml

Sıcak suda tamamen çözdürülen biyotin 121°C'de 15 dakika otoklavlanır ve kullanılabilecek kadar +4°C'de saklanır.

2.2.7.3.7. (%20) Glukoz Çözeltisi

D-Glukoz	10 g
Disu	50 ml

Sıcak distile suda çözdürülen glukoz, 121°C'de 15 dakika otoklavlanır ve kullanılabilecek kadar +4°C'de saklanır.

2.2.7.3.8. 4- Nitro-o-Fenilendiamine (NPD)

100 µg/petri olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanılır. 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir. *S. Typhimurium* TA 98 suşu için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Oda ısısında saklanır (Her çalışma taze olarak hazırlanmıştır).

2.2.7.3.9. Sodyum azid (AZS)

100 µg/petri olmak üzere distile su içinde çözülerek hazırlanır. *S. Typhimurium* TA100 suşu için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir. 0°C ile +4°C arasında saklanır (Her çalışmada taze olarak hazırlanmıştır).

2.2.7.3.10. Top agar

Bacto Agar	3 g
NaCl	2,5 g
Sıcak distile su	500 ml

Tüm malzemeler manyetik karıştırıcıda çözülünceye kadar karıştırılır ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilir.

2.2.7.3.11. Histidin / Biotin Agar (HB Agar)

Agar	15 g
Distile su	914 ml
50xVB tuzu	20 ml
%20 Glukoz Çözeltisi	50 ml
Histidin HCl H ₂ O (2g/400ml H ₂ O)	10 ml
0,5 mM Biotin	6 ml

Agar ve distile su karıştırılır. 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. Solüsyon 45°C ye soğutulup 50xVB, glukoz ve histidin çözeltileri eklenir. Solüsyon soğutulduktan sonra biyotin çözeltisi eklenip karıştırılır. Besiyeri donmadan petri kaplarına dökülür.

2.2.7.3.12. Histidin / Biyotin / Ampisilin Agar (HBA Agar)

Agar	15 g
Distile su	910 ml
50xVB tuzu	20 ml
%20 glukoz	50 ml
Histidin HCl H ₂ O (2g / 400 ml H ₂ O)	10 ml
0,5 mM Biyotin	6 ml
(%0,8 / 0,02 M NaOH) Ampisilin	3,15 ml

Agar suda kısmen çözdürölüp 121°C'de 15 dakika otoklavlanır. Solüsyon 40-50°C ye soğutulup 50xVB, glukoz ve histidin çözeltisi eklenir. Arkasından biyotin çözeltisi, ampisilin çözeltisi eklenip karıştırılarak petrilere 25-30 ml olacak şekilde aktarılır. Bu petrilere bakteriler +4°C de 2 ay boyunca saklanabilir.

2.2.7.3.13. Minimal glukoz agar (MGA)

Agar	15g
Distile su	880 ml
50xVB tuzları	20 ml
%20 Glukoz	100 ml

Agar ve su karıştırılıp çözölür ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilir. 40- 50°C ye soğutulup 50xVB ve glukoz çözeltisi eklenir, petrilere 25-30 ml olarak aktarılır. Bu ortam, suşların kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının hesaplanmasında ve mutajenite deneylerinde kullanılmıştır.

2.2.7.3.14. Nutrient agar (NA)

Nutrient Broth	50 g
Bacto Agar	30 g
Di su	1860 ml

Agar ve broth distile su içinde karıştırılıp 121°C de 15 dakika sterilize edilir. Petri kutularına 30 ml olacak şekilde aktarılır.

2.2.7.3.15. Nutrient Broth Sıvı Kùltür Ortamı (NB)

Nutrient Broth No:2	5 g
Distile su	200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilir ve 4°C’de saklanır.

2.2.7.3.16. Tuz Çözeltisi (1,65 M KCl + 0,4 M MgCl₂)

Potasyum klorür (KCl)	61,5 g
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	40,7 g
Distile su	500 ml

Maddeler distile suda çözölür ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir ve 4°C’de ya da oda sıcaklığında saklanır.

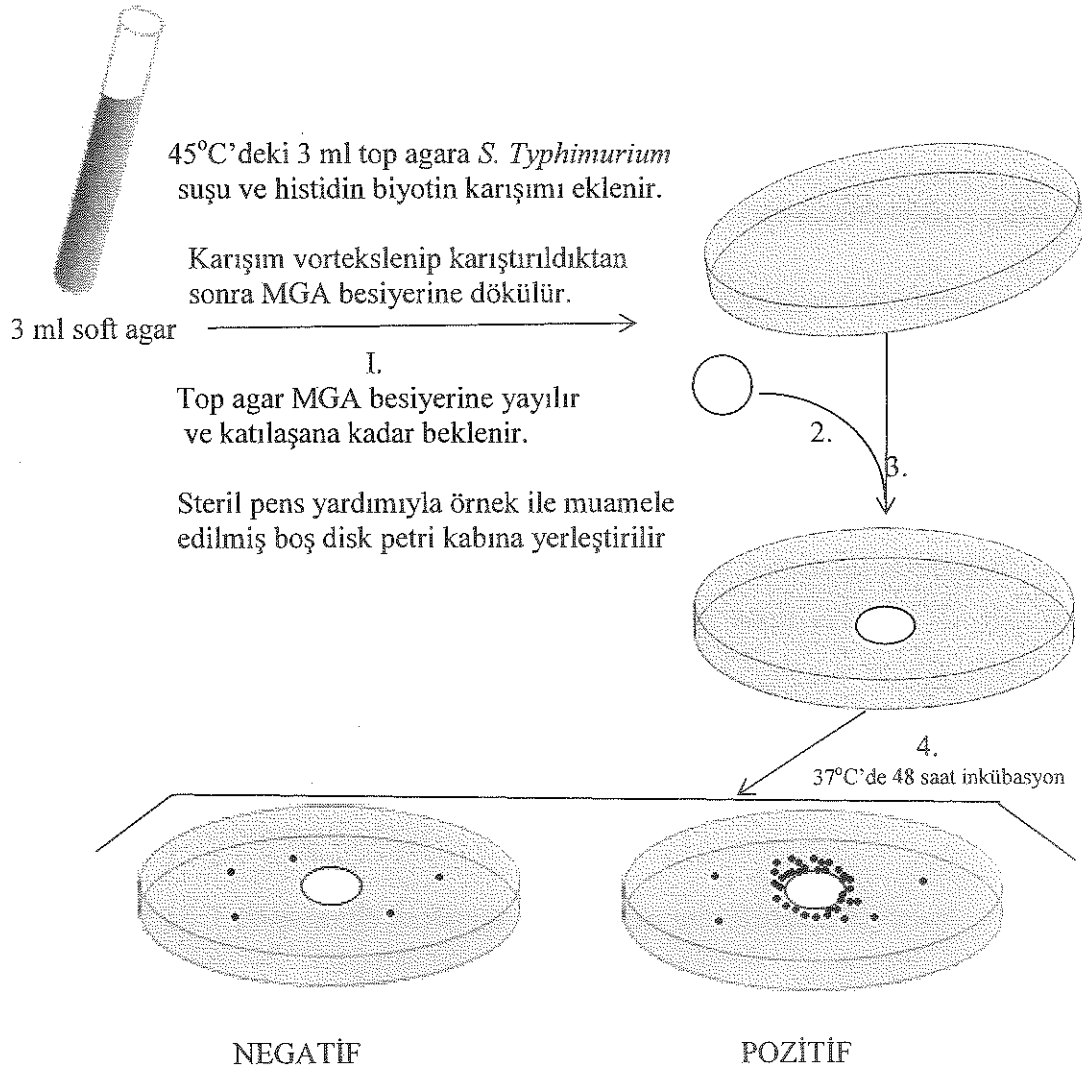
2.2.7.3.17. 1 M Glukoz–6-Fosfat çözeltisi

Glukoz–6-fosfat	2,82 g
Steril distile su	10 ml

0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilir. Çözelti taze olarak hazırlanmıştır.

2.2.7.4. S9 (-) Ames testi

Bu çalışmada, *Salmonella Typhimurium* TA 98 ve *S. Typhimurium* TA 100 test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ve Ames/Salmonella/Mikrozom Testi Maron ve Ames'in yöntemine uygun olarak petri inkorporasyon metodu ile yapılmıştır [153]. Deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Pozitif kontrol, çözücü kontrol (DMSO) ve spontan kontroller de deneye paralel olarak gerçekleştirilmiştir.



Örnek emdirilmiş disk mutajenik madde içeriyorsa, disk etrafındaki reverant sayısında artış gözlenir.

Şekil 2.7: S9 (-) Ames testinin şematik görünümü

2.2.7.4.1. *Salmonella* Suşlarının Kültürlerinin ve Master Petrilerin Hazırlanması

Mutant bakteriler histidin/biyotin/ ampisilin besiyerlerine çizgi ekimleri yapıldıktan sonra 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 37°C de 48 saat inkübasyonun ardından, izole olmuş bir koloni seçilerek, NB sıvı besiyeri içinde süspanse edilerek bir gece (12-16 saat) 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda öze ile sıvı kültür alınıp HBA agar üzerine çizgi ekim yapılmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Deney için kullanılacak uygun bakterileri içeren bu master petriler +4°C de saklanmış ve haftalık pasajları yapılmıştır. Böylece stok kültürlerin mutasyon yeteneklerini kaybetmesi engellenmiştir.

2.2.7.4.2. *Salmonella* Suşlarının Saklanması ve Stok Kültürlerin Açılması

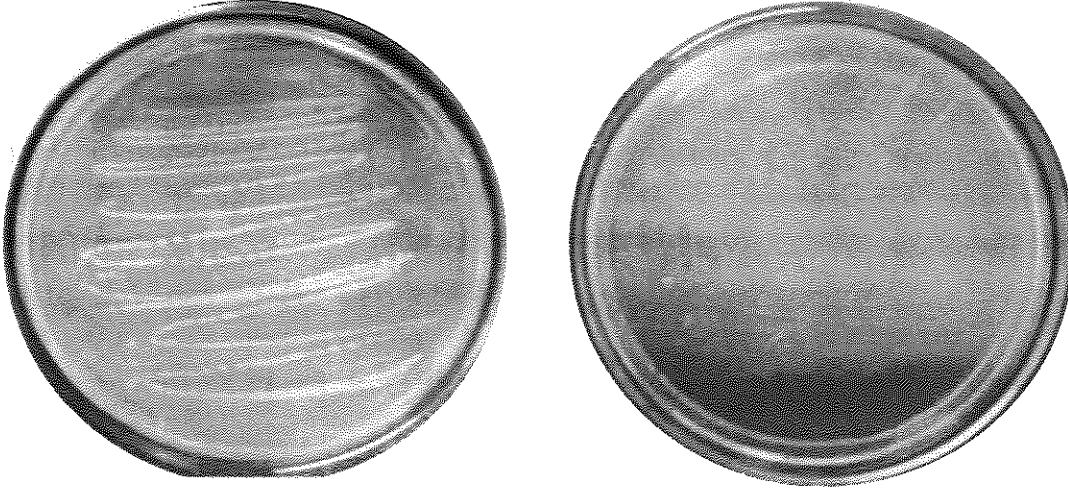
Test suşlarının canlılığını ve mutant özelliklerini uzun süre koruyabilmeleri için stoklanmaları gerekmektedir. Bunun için HBA agarda üremiş olan suşlardan iyi izole olmuş bir koloni öze ile alınıp 3ml Nutrient Broth içeren tüplere katılır ve 37°C de bir gece (12-16 saat) inkübe edilir. Bu sürenin sonunda steril Ependorf tüp içersine 1 ml bakteri kültürü ve 1 ml steril gliserinli sıvı besiyeri ilave edilmiştir. Kuru buz üzerinde donması sağlandıktan sonra -80°C'de saklanmıştır. Stokların açılması gerektiğinde stok bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilip 0,1ml alınarak steril eküvyon ile HB agar petrilere paralel ekim yapılmıştır. Daha sonra 37°C de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda iyi izole olan bir koloni öze ile alınıp HBA agar petrilere ekim yapılmıştır. HBA petrileri 37°C de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası petriler +4°C de iki ay süre ile saklanabilir.

2.2.7.4.3. *Salmonella* Suşlarının Genotiplerinin Kontrol Edilmesi

Mutasyon testlerinde test maddesinin mutant suşu atasal tipe döndürme gücü yani test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığı test edildiğinden suşun genotip bakımından mutant karakterlere sahip olup olmadığının kontrol edilmesi testin güvenilirliği açısından önemlidir.

2.2.7.4.4. Histidin Gereksinimi Kontrolü

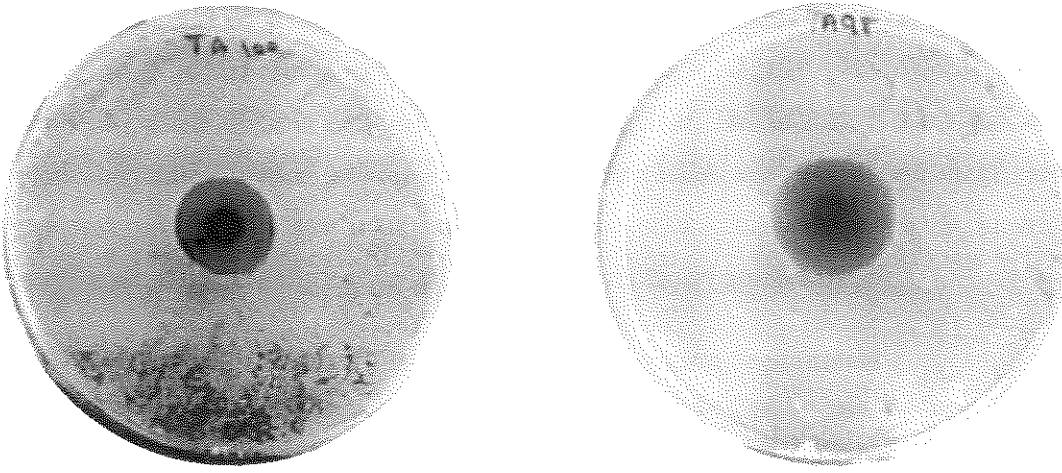
Bakterilerin histidin içermeyen Minimal Glukoz Agar besiyerine ekilmeleri sonucu his- bakteriler his+ bakterilerden ayırt edilir. NB'de üretilen bakteriler Histidin/Biyotin agar ve histidin içermeyen MGA besiyerine ekilerek 37°C de 48-72 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda HB besiyerinde üreme gözlenirken, MGA besiyerinde üreme gözlenmez ise bu bakterilerin His- mutasyonu taşıdığını gösterir.



Şekil 2.8: *S. Typhimurium* TA 100 HBA ve MGA sonuçları

2.2.7.4.5. Rfa Mutasyonu Kontrolü

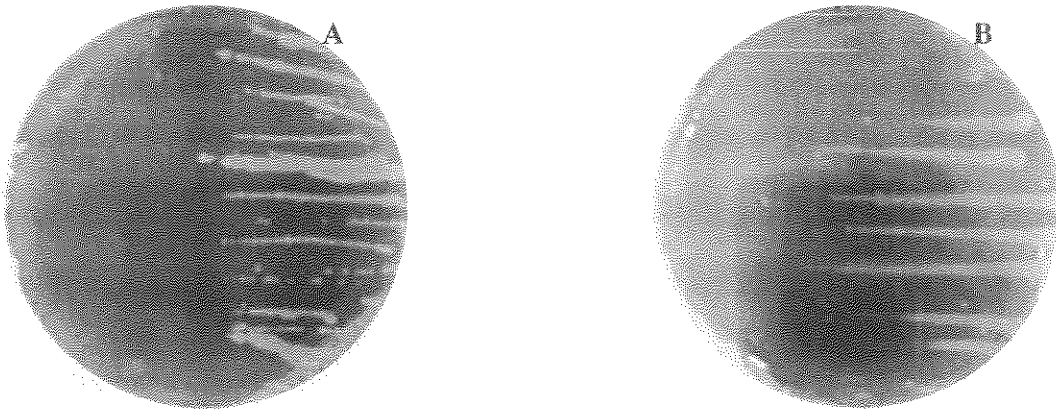
Rfa mutasyonu bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında yer almaktadır. Hücre zarının geçirgenliği artırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilebilmektedir. Bu test için, NB'da bir gece büyütülen 0,1 ml sıvı kültür, 45°C ye ısıtılmış 3 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. 10 dakika donması beklendikten sonra, plağın orta kısmına bir kuyucuk açılır ve içersine % 0,1' lik 10 µl kristal viyole içeren disk yerleştirilmiştir. Petriler 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine girip, bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin Rfa mutasyonunu taşıdıkları belirlenmiştir.



Şekil 2.9: *S. Typhimurium* TA 98 ve *S. Typhimurium* TA 100 suşları için Rfa mutasyonunu kontrol sonuçları

2.2.7.4.6. UVrB Mutasyonu Kontrolü

Bu mutasyon ile bakterilerin, UV ışınlarının neden olduğu, replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan "DNA onarım mekanizması" engellenmiştir. Mutasyon varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile kanıtlanmıştır. Test için, NB'da bir gece üretilen bakteri kültüründen öze ile alınıp NA besiyerine paralel ekim yapılmıştır. Petrilerin yarısı kapatılıp 8 sn süre ile UV ışığına maruz bırakılmıştır. Işınlamadan sonra petriler kapatılıp 37° C de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, UVrB mutasyonu taşıyan bakterileri öldürebilecek niteliktedir. Bundan dolayı UV'ye maruz kısımda üreme olmazken, diğer kısımda normal bir üreme gözlenmiştir. Böylece bakterilerin UVrB mutasyonunu taşıdığı gösterilmiştir.



Şekil 2.10: *S. Typhimurium* TA 98 (a) ve TA 100 (b) suşunda uvrB mutasyonu kontrol sonuçları

2.2.7.4.7. R Faktör Varlığı Kontrolü

Test bakterilerinde bulunan R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerin varlığı ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, NB sıvı besiyeri içinde büyütülen bakteri kültürü, ampisilin içeren HBA agar petrilere çizgi ekim yapılarak, 37°C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdüğü gözlenmiştir.

2.2.7.4.8. Test Maddelerinin İnhibitör Dozunun Saptanması

Mutajenite deneyine başlamadan önce, deneyin sağlıklı olabilmesi için inhibitör etkinin saptanması gerekmektedir. İnhibitör dozun belirlenmesinin önemi test bakterileri üzerinde inhibisyona neden olabilecek dozların mutajenite testinde sonuç vermeyecek olmasıdır. Test maddelerinin test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla öncelikle uygun sayıda bakteri içeren ($1-2 \times 10^9$) gecelik kültürden sıvı besiyeri kullanılarak 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6 oranlarında seyreltmeler yapılmıştır. U tabanlı 96 kuyucuklu plakalara 100 µl NB, 100 µl farklı konsantrasyonlu bakteri solüsyonu ve 50 µl test maddesi eklenmiştir. Üremenin olmadığı kuyucuktaki bakteri konsantrasyonu deneylerde kullanılmak üzere baz alınmıştır.

2.2.7.4.9. Pozitif Kontrol

Bakterilerin bilinen standart mutajenlere karşı tepkilerini saptamak için mutajen olduğu bilinen belirli bir madde, pozitif kontrol amacıyla esas denemeye paralel olarak yapılır. *S. Typhimurium* TA 98 suşu için kesin mutajen olan, 4-nitro-ofenildiamin, *S. Typhimurium* TA 100 için pozitif mutajen olarak sodyum azid (SA) kullanılmıştır. Bu pozitif mutajenlerden 4-nitro-o-fenildiamin; dimetil sülfoksit içerisinde, sodyum azid ise suda çözündürülmüştür. Sodyum azid ve 4-nitro-o-fenildiamin petri başına 100 µg konsantrasyonlarında kullanılmıştır.

2.2.7.4.10. Negatif (Çözücü/DMSO) Kontrol

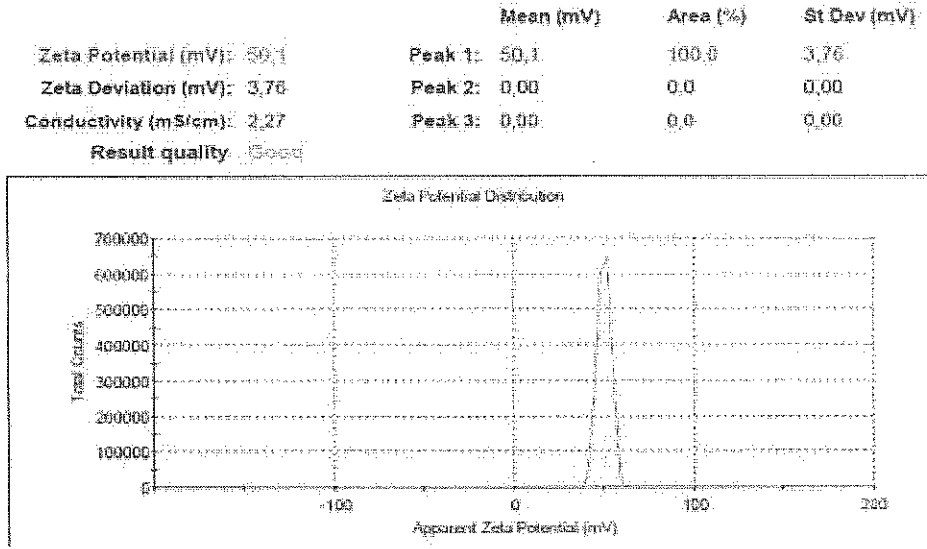
Test kimyasallarının ve kontrol mutajenlerinden 2-aminoflouren ve 4-nitro-ofenildiamini çözmek için kullanılan dimetil sülfoksitin, bakteri suşları üzerine etkisinin olup olmadığının kontrolü için yapılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

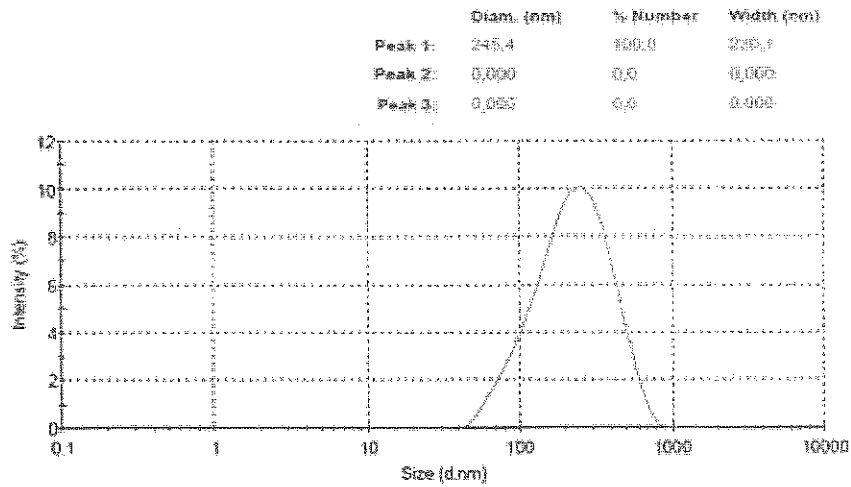
3.1 Mikrokapsüllerin Karakterizasyonu

3.1.1 Allisin mikrokapsüllerin karakterizasyon verileri

Allisin mikrokapsüller Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve elde edilen veriler Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de paylaşılmıştır. Analizler sonucunda mikrokapsüllerin boyutu 245,4 nm, zetapotansiyel değerleri 50 mVolarak bulunmuştur.



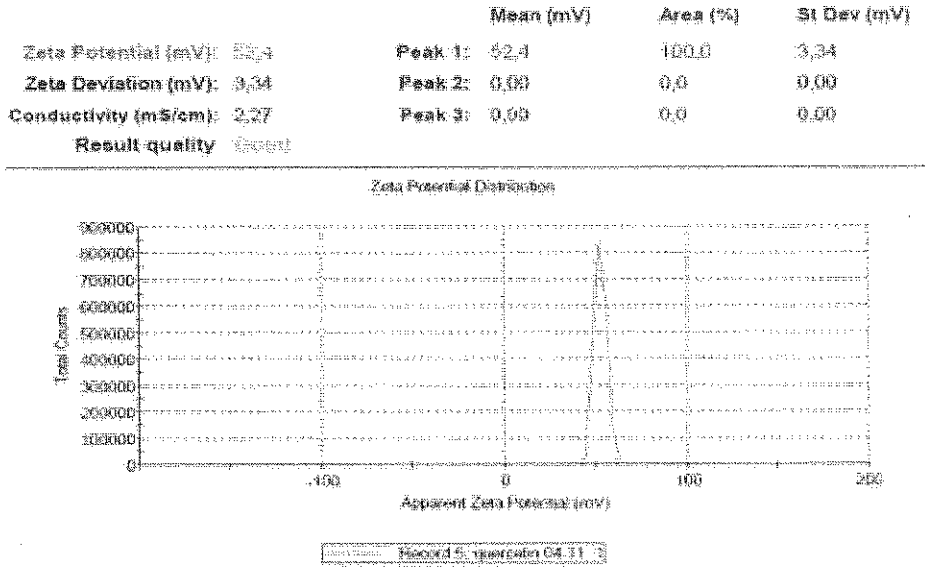
Şekil 3.1: Allisin mikrokapsüllerin zeta potansiyel verileri



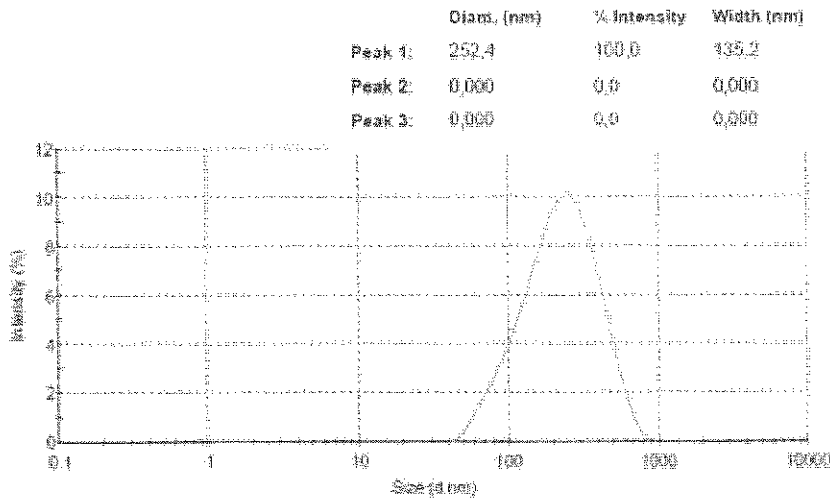
Şekil 3.2 : Allisin mikrokapsüllerin boyut ölçümü verileri

3.1.2. Kuersetin mikrokapsüllerin karakterizasyon verileri

Kuersetin mikrokapsüller Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve elde edilen veriler Şekil 3.3 ve Şekil 3.4’te paylaşılmıştır. Analizler sonucunda mikrokapsüllerin boyutu 252,4 nm, zetapotansiyel değerleri 52,4 mV olarak bulunmuştur.



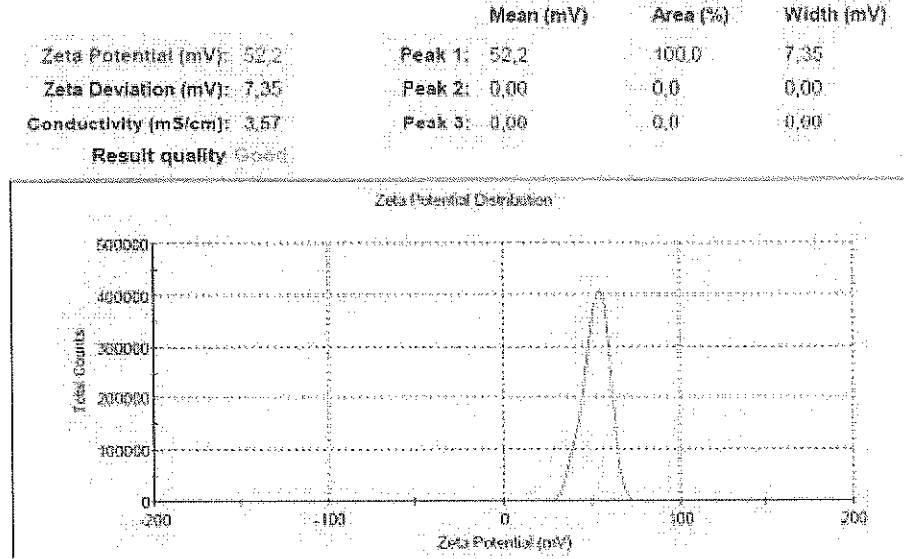
Şekil 3.3: Kuersetin mikrokapsüllerin zeta potansiyel verileri



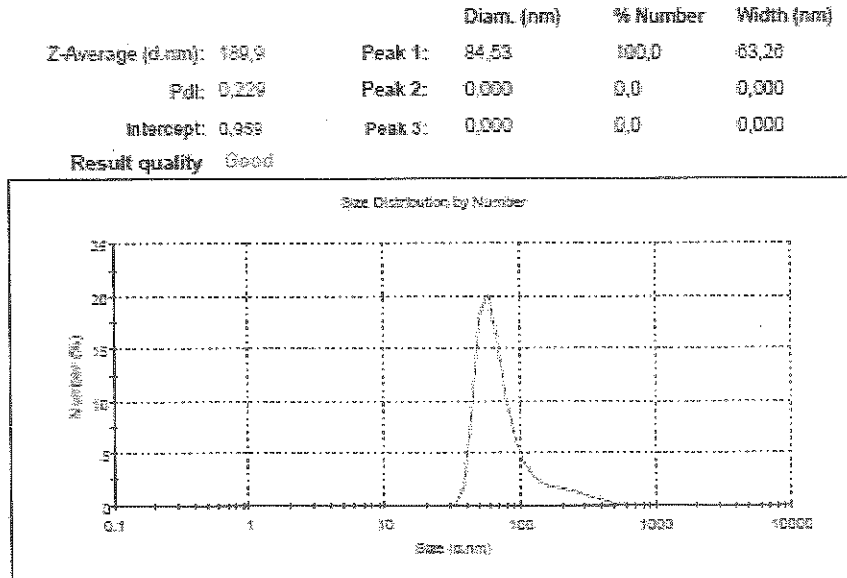
Şekil 3.4: Kuersetin mikrokapsüllerin boyut ölçümü verileri

3.1.3. Karvakrol mikrokapsüllerin karakterizasyon verileri

Karvakrol mikrokapsüller Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve elde edilen veriler Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da paylaşılmıştır. Analizler sonucunda mikrokapsüllerin boyutu 84,53 nm, zetapotansiyel değerleri 52,2 mV, elektroforetik mobilite değerleri ise 4,11 olarak bulunmuştur.



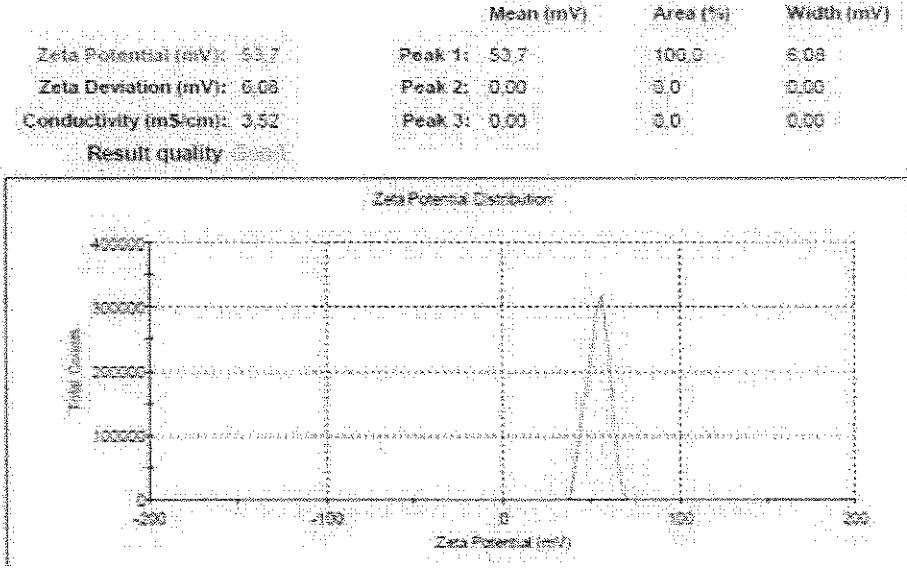
Şekil 3.5 : Karvakrol mikrokapsüllerin zeta potansiyel verileri



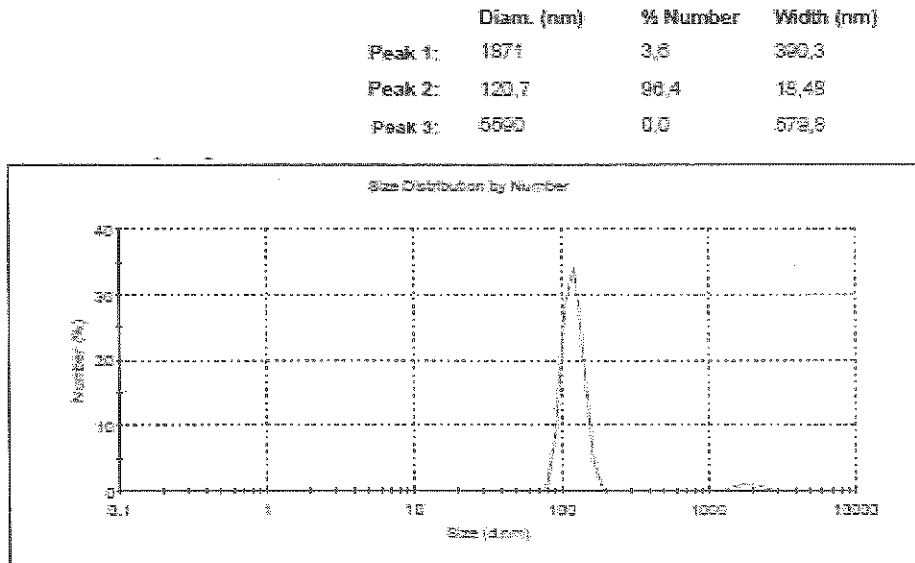
Şekil 3.6: Karvakrol mikrokapsüllerin boyut ölçümü verileri

3.1.4. Timol mikrokapsüllerin karakterizasyon verileri

Timol mikrokapsüller metod Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve elde edilen veriler Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’de paylaşılmıştır. Analizler sonucunda mikrokapsüllerin boyutu 120,7 nm, zetapotansiyel değerleri 53,7 mV, elektroforetik mobilite değerleri ise 4,11 olarak bulunmuştur.



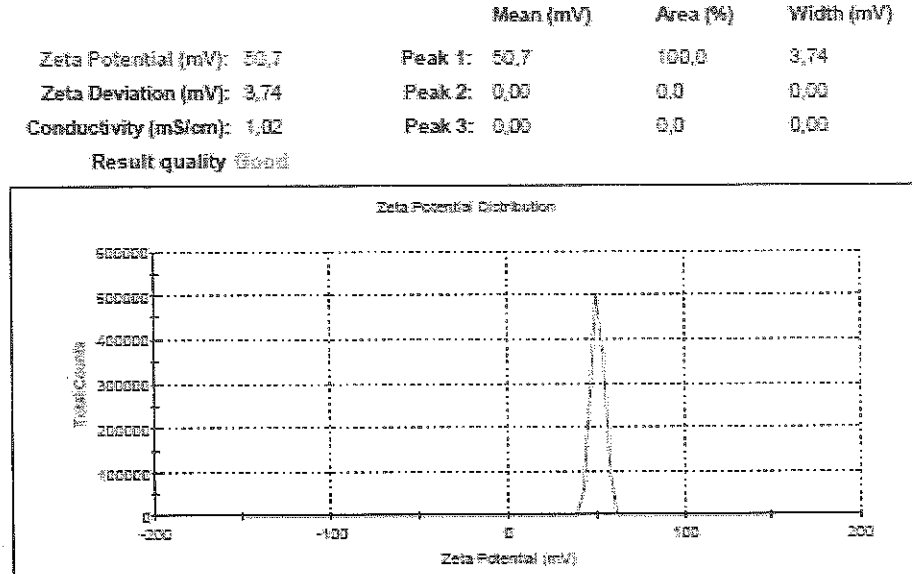
Şekil 3.7: Timol mikrokapsüllerin zeta potansiyel verileri



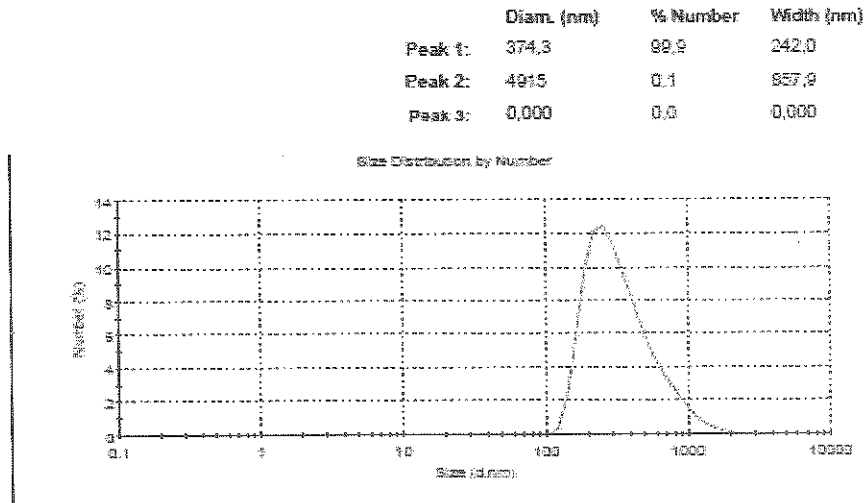
Şekil 3.8: Timol mikrokapsüllerin boyut ölçümü verileri

3.1.5. Oleuropein mikrokapsüllerin karakterizasyon verileri

Oleuropein mikrokapsüller Bölüm 2.2.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve elde edilen veriler Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da paylaşılmıştır. Analizler sonucunda mikrokapsüllerin boyutu 374,3 nm, zetapotansiyel değerleri 50,7 mV, elektroforetik mobilite değerleri ise 4,11 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.9: Oleuropein mikrokapsüllerin zeta potansiyel verileri



Şekil 3.10: Oleuropein mikrokapsüllerin boyut ölçümü verileri

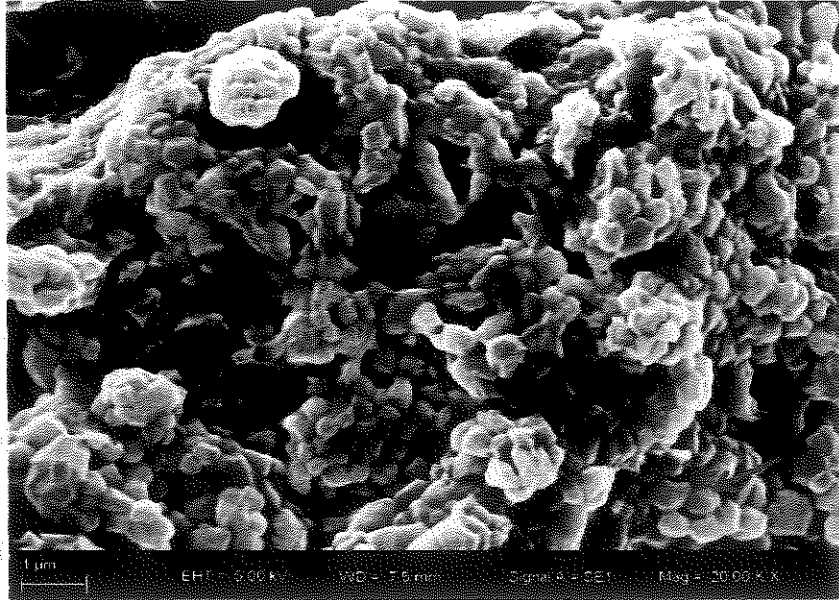
3.1.6 Mikroenkapsülasyon Veriminin Tayini

Kitosan ile mikroenkapsüle edilen fitokimyasalların kaplama veriminin hesaplanması amacıyla kuersetin mikrokapsüller kullanılmıştır. %100 kaplama değerinin hesaplanabilmesi amacıyla deney sırasında kullanılan miktarda kuersetin ve kuersetin mikrokapsül spektrofotometrede 256 nm absorbans değerinde incelenmiştir. Elde edilen değerler sonucunda enkapsülasyon verimi % 97,78 olarak hesaplanmıştır.

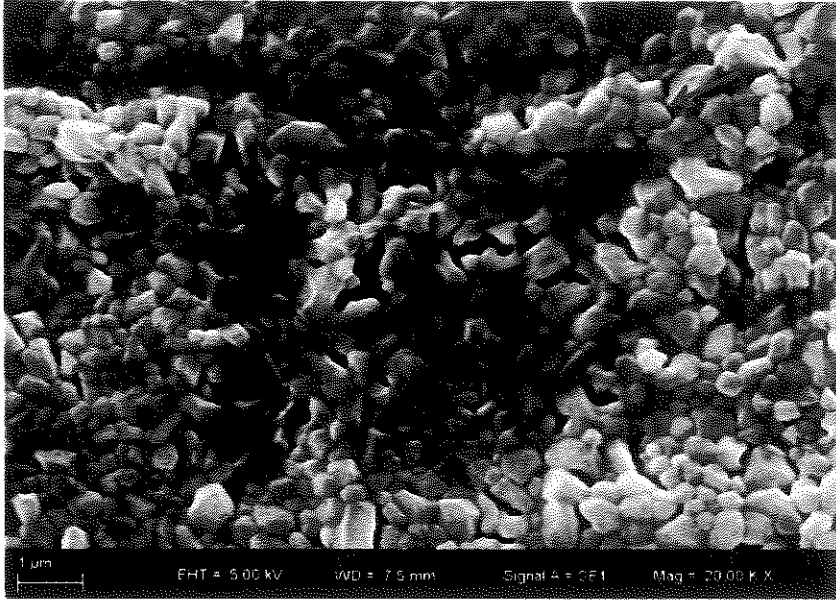
$$\% \text{ verim} = \frac{\text{OD kontrol} - \text{OD örnek}}{\text{OD kontrol}} \times 100 = \frac{2,618 - 2,362}{2,618} \times 100 = \%97,78$$

3.1.7. Mikrokapsüllerin SEM Görüntüleri

Kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş timol ve karvakrolün SEM görüntüleri Şekil 3.11 ve Şekil 3.12 de verilmiştir.



Şekil 3.11: Timol mikrokapsüllerin SEM görüntüsü



Şekil 3.12: Karvakrol mikrokapsüllerin SEM görüntüsü

3.2.Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Fitokimyasallar ve Mikrokapsüllerin Antibakteriyel Etkinliği

Mikrokapsüllerin çevresel koşullar altındaki koruyuculuğunun tespit edilebilmesi amacıyla timol, karvakrol, allisin ve bu fitokimyasalları içeren mikrokapsüller ısı ve oksidasyona maruz bırakılmıştır. Solüsyon içeriklerindeki değişim tespiti amacıyla uygulanan antibakteriyel etkinlik testi sonuçları Şekil 3.11-3.16 ve Tablo 3.1’de verilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda allisinin karvakrol ve timole göre termal stabilitesinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Kitosan ile mikrokapsüle edilen fitokimyasalların, çevresel koşullar altındaki antibakteriyel aktivitelerinin daha stabil olduğu gözlenmiştir.

Tablo 3.1: Çevresel koşullara maruz bırakılmış fitokimyasal ve fitokimyasal içeren mikrokapsüllerin *S. aureus* ve *E.coli*'ye karşı antibakteriyel etkinlikleri 24. Saat (Abs: 600) değerleri

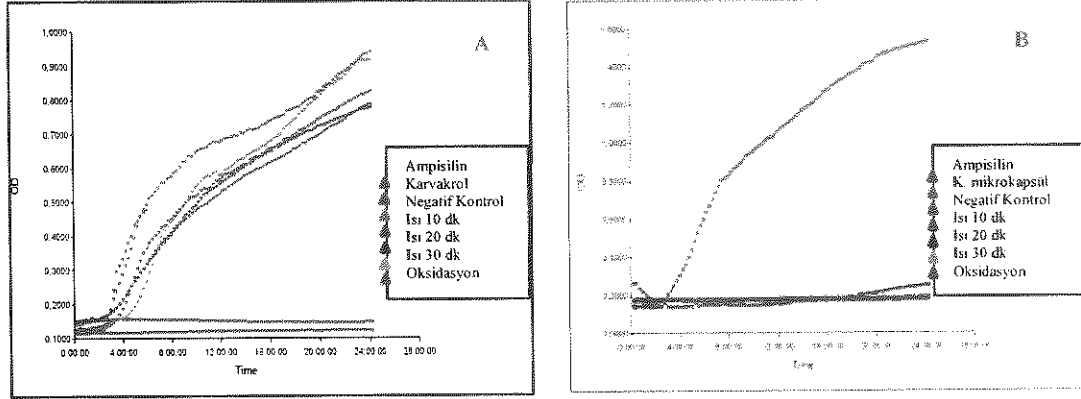
Örnek Adı	<i>S.aureus</i>		<i>E.coli</i>	
	abs	McFarland	abs	McFarland
Timol (işlem görmemiş)	0,0109± 0,00	< 0,5	0,0120± 0,02	< 0,5
180°C 10 dk Timol	0,0381± 0,00	< 0,5	0,0541± 0,00	< 0,5
180°C 20 dk Timol	0,0739± 0,03	0,5	0,0652±0,02	< 0,5
180°C 30 dk Timol	0,1058± 0,03	0,5	0,0698± 0,03	< 0,5
Oksidasyon Uygulanmış Timol	0,0641± 0,03	< 0,5	0,0631±0,02	< 0,5
Timol mikrokapsül (işlem görmemiş)	0,0160± 0,02	< 0,5	0,0103± 0,03	< 0,5
180°C 10 dk Timol mikrokapsül	0,0154±0,02	< 0,5	0,0100± 0,01	< 0,5
180°C 20 dk Timol mikrokapsül	0,0150± 0,00	< 0,5	0,0096± 0,01	< 0,5
180°C 30 dk Timol mikrokapsül	0,0143± 0,03	< 0,5	0,0091±0,02	< 0,5
Oksidasyon Uygulanmış Timol mikrokapsül	0,0162±0,02	< 0,5	0,0110± 0,03	< 0,5
Karvakrol (işlem	0,0217± 0,00	< 0,5	0,01312± 0,00	< 0,5

görmemiş)

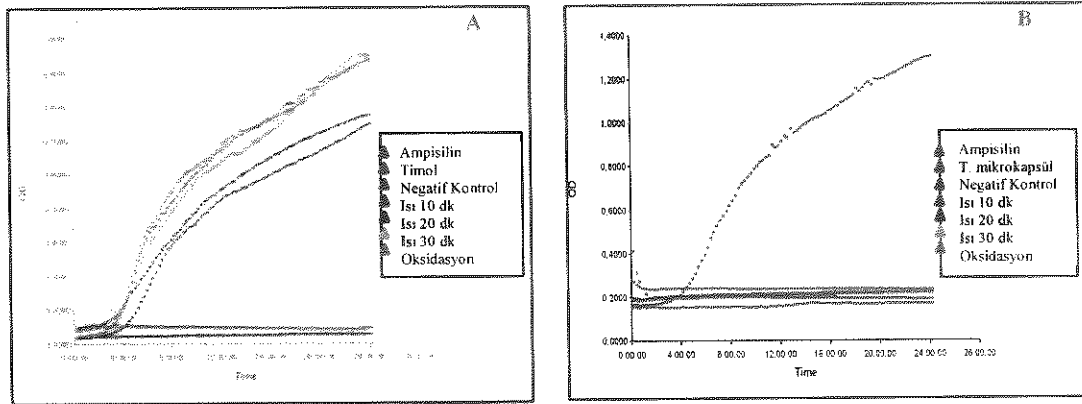
180°C 10 dk Karvakrol	0,0402± 0,02	< 0,5	0,0730± 0,02	0,5
180°C 20 dk Karvakrol	0,075± 0,02	0,5	0,0770± 0,03	0,5
180°C 30 dk Karvakrol	0,123± 0,03	1	0,0786 ±0,03	0,5
Oksidasyon Uygulanmış Karvakrol	0,0481± 0,02	< 0,5	0,0726± 0,02	0,5
Karvakrol mikrokapsül (işlem görmemiş)	0,0191±0,03	< 0,5	0,0128±0,03	< 0,5
180°C 10 dk Karvakrol mikrokapsül	0,0144± 0,03	< 0,5	0,0128± 0,02	< 0,5
180°C 20 dk Karvakrol mikrokapsül	0,0108± 0,02	< 0,5	0,0126± 0,01	< 0,5
180°C 30 dk Karvakrol mikrokapsül	0,0087± 0,01	< 0,5	0,0120± 0,03	< 0,5
Oksidasyon Uygulanmış Karvakrol mikrokapsül	0,0135± 0,03	< 0,5	0,0117±0,01	< 0,5
Allisin (işlem görmemiş)	0,0028± 0,01	< 0,5	0,0093± 0,01	< 0,5
180°C 10 dk Allisin	0,0473± 0,02	< 0,5	0,0105± 0,01	< 0,5
180°C 20 dk Allisin	0,0826± 0,01	0,5	0,0443± 0,01	< 0,5
180°C 30 dk Allisin	0,1203±0,02	1	0,0954± 0,00	0,5

Oksidasyon Uygulanmış Allisin	0,0686± 0,00	< 0,5	0.0387± 0,00	< 0,5
Allisin mikrokapsül (işlem görmemiş)	0,0178± 0,00	< 0,5	0,0102± 0,02	< 0,5
180°C 10 dk Allisin mikrokapsül	0,0145± 0,03	< 0,5	0,0104± 0,00	< 0,5
180°C 20 dk Allisin mikrokapsül	0,0123± 0,03	< 0,5	0,0091± 0,01	< 0,5
180°C 30 dk Allisin mikrokapsül	0,0104± 0,01	< 0,5	0,0086±0,02	< 0,5
Oksidasyon Uygulanmış Allisin mikrokapsül	0,0128±0,02	< 0,5	0,0101± 0,00	< 0,5
Ampisilin (Kontrol)	0,0110± 0,00	< 0,5	0,0250± 0,00	< 0,5
Kitosan	0,0458±0,02	< 0,5	0,0653± 0,01	< 0,5
%1Asetik Asit	0,0680± 0,00	< 0,5	0,0524± 0,00	< 0,5
Besiyeri+ Bakteri (Negatif Kontrol)	0,2141± 0,00	1	0,246± 0,00	2

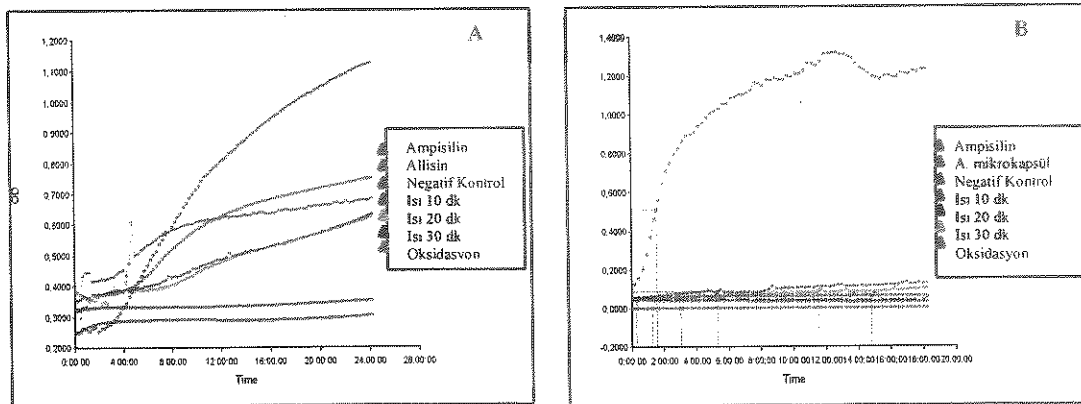
3.2.1. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Fitokimyasallar ve Mikro kapsüllerin *E.coli*'ye Karşı Antibakteriyel Etkinliği



Şekil 3.13: Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm karvakrol(a) ve karvakrol mikro kapsüllerin (b) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitesi

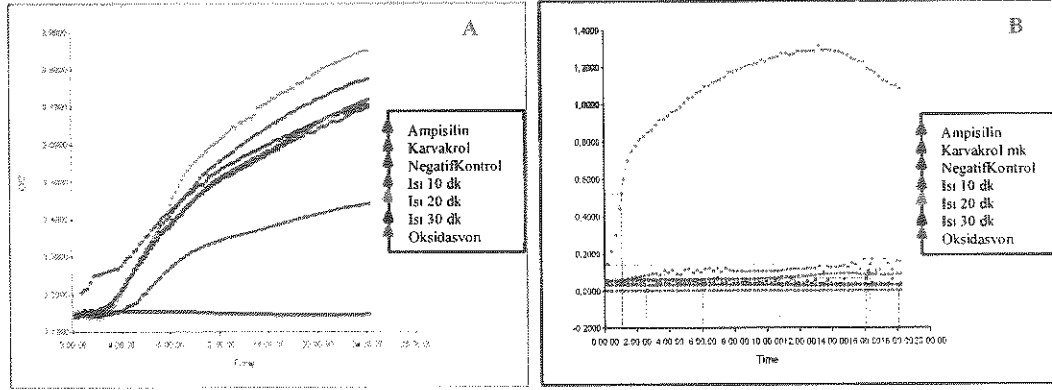


Şekil 3.14: Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm timol(a) ve timol mikro kapsüllerin (b) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitesi

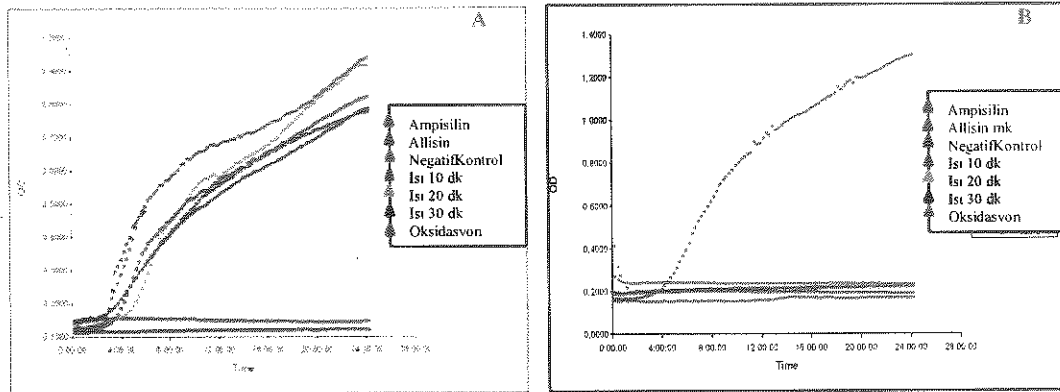


Şekil 3.15: Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm allisin(a) ve allisin mikro kapsüllerin (b) *E.coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitesi

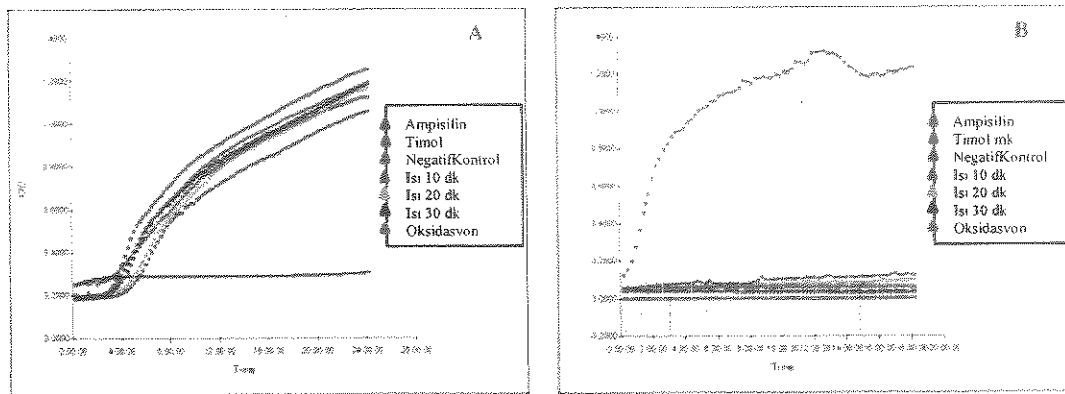
3.2.2. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Fitokimyasallar Mikrokapsüllerin *S. aureus*'a Karşı Antibakteriyel Etkinliği



Şekil 3.16: Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm karvakrol(a) ve karvakrol mikrokapsüllerin (b) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi



Şekil 3.17: Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm allisin(a) ve allisin mikrokapsüllerin (b) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi

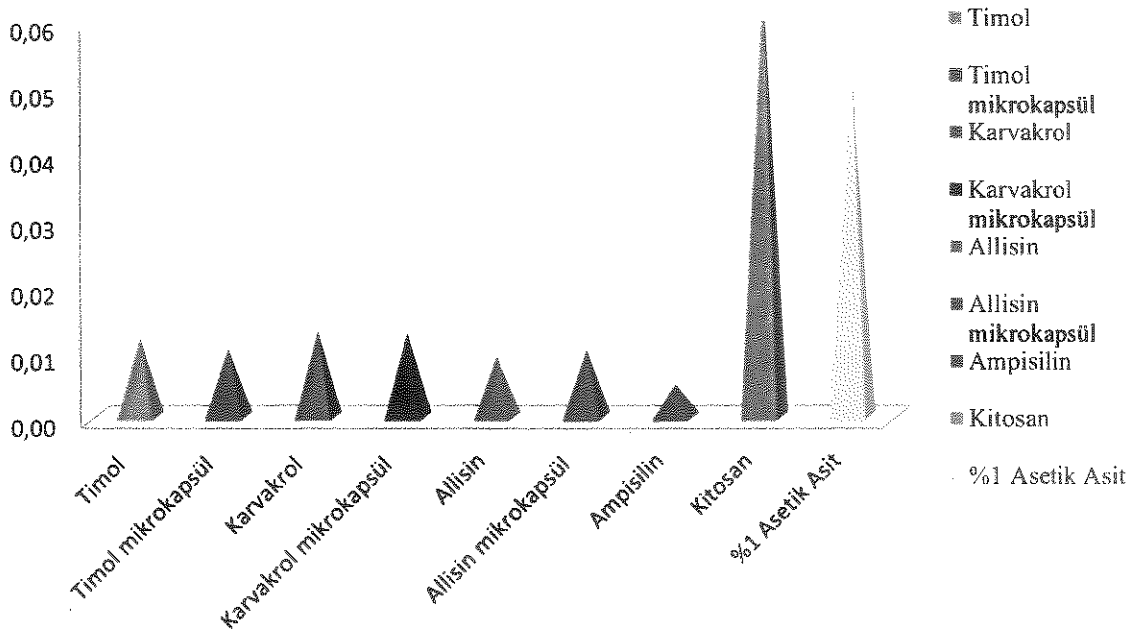


Şekil 3.18: Çevresel koşullara maruz bırakılmış 500 ppm timol(a) ve timol mikrokapsüllerin (b) *S.aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi

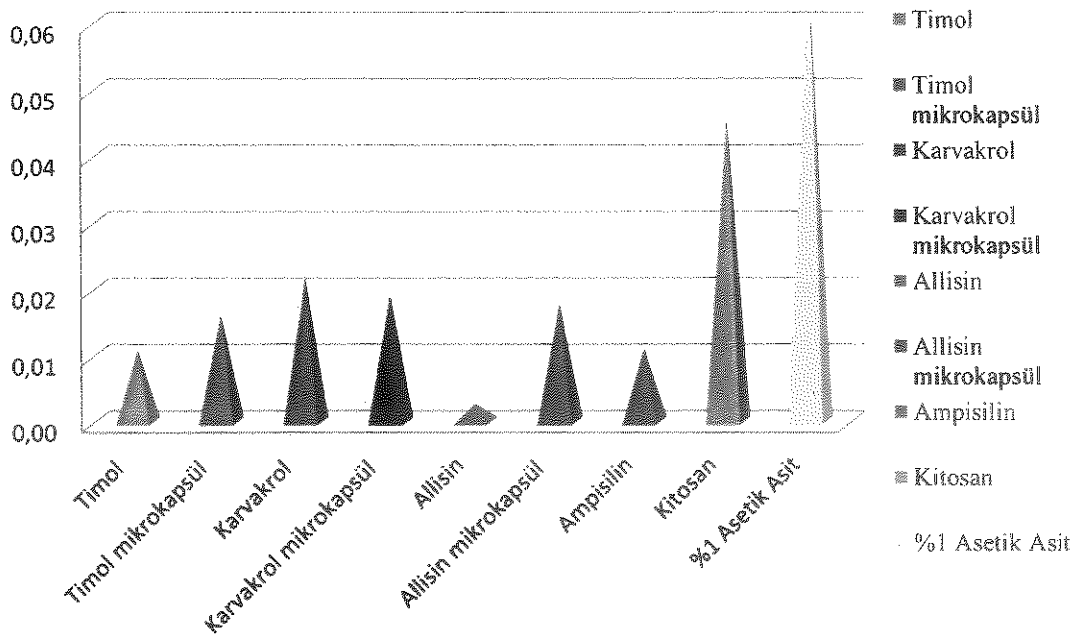
Canivares ve Gracia (2004) farklı çözücüler kullanarak sarımsaktan allisin elde etmiş ve farklı sıcaklıklarda sakladıklarında allisinin *Helicobacter pylori* üzerindeki etkinliğinin değişimleri izlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda sıcaklığın zaman içerisinde allisin miktarını düşürdüğü ve paralel olarak *H. pylori* üzerindeki etkinliğinin de azaldığı gözlenmiştir [155]. Fujisawa ve Suma (2008) yaptığı bir çalışmada allisinin termal stabilitesini biyolojik ve kimyasal olarak test edilmiştir. Biyolojik yöntem olarak *S. aureus* ve *E. coli* üzerindeki antibakteriyel aktivitesi karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada eski çalışmalara paralel olarak etkinliğin sıcaklıkla ters orantılı olduğu gözlenmiş, sıcaklık arttıkça antibakteriyel etkinliğin azaltığı rapor edilmiştir [51].

Guimaraes ve Oliveira (2014) karvakrolün kansere bağlı acıların giderilmesinde kullanımı üzerinde çalışmış, çalışma sırasında sıcaklığa bağlı miktar değişimi incelenmiştir. 168°C sıcaklıkta karvakrolde hızlı bir şekilde ağırlık kaybı gözlenmiştir.

Higueras ve arkadaşları karvakrol ve hidroksipropil beta siklodekstrin katkılı kitosan filmi üzerinde çalışmalar gerçekleştirmiştir. Kitosan filmleri ile karvakrol absorpsiyonunun, karvakrolün mekanik direncini arttırdığı, su buharına karşı bariyer özelliği kattığı ve termal bozulmayı engellediği tespit edilmiştir [88].



Şekil 3.19: Fitokimyasal ve fitokimyasal yüklü mikrokapsül uygulamalarına karşı *E.coli* üreme grafiği



Şekil 3.20: Fitokimyasal ve fitokimyasal yüklü mikrokapsül uygulamalarına karşı *S. aureus* üreme grafiği

Çevresel koşullara maruz bırakılan fitokimyasal ve fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin *S. aureus* ve *E.coli* üzerindeki antibakteriyel etkinliği araştırılmıştır. 500 ppm karvakrol herhangi bir çevresel etkiye maruz bırakılmadan pozitif kontrol olarak kullanılan ampisiline yakın etki gösterirken ısı işlem uygulamasında 30. dakikaya kadar sahip olduğu etkinin büyük kısmını kaybetmiştir. Oksidasyon işlemi de ısı işlem kadar olmasa da karvakrolün etkinliğini azaltmıştır. 500 ppm olarak uygulanan timol de karvakrole benzer etki göstermiş, ısı ve oksidasyon işlemlerinden sonra etkinliğini kaybetmiştir. Literatürde antibakteriyel etkinliğinden söz edilen allisinin ise karvakrol ve timole göre ısı ve oksidasyon işlemlerine daha dayanıklı olduğu ve antibakteriyel etkinliğinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

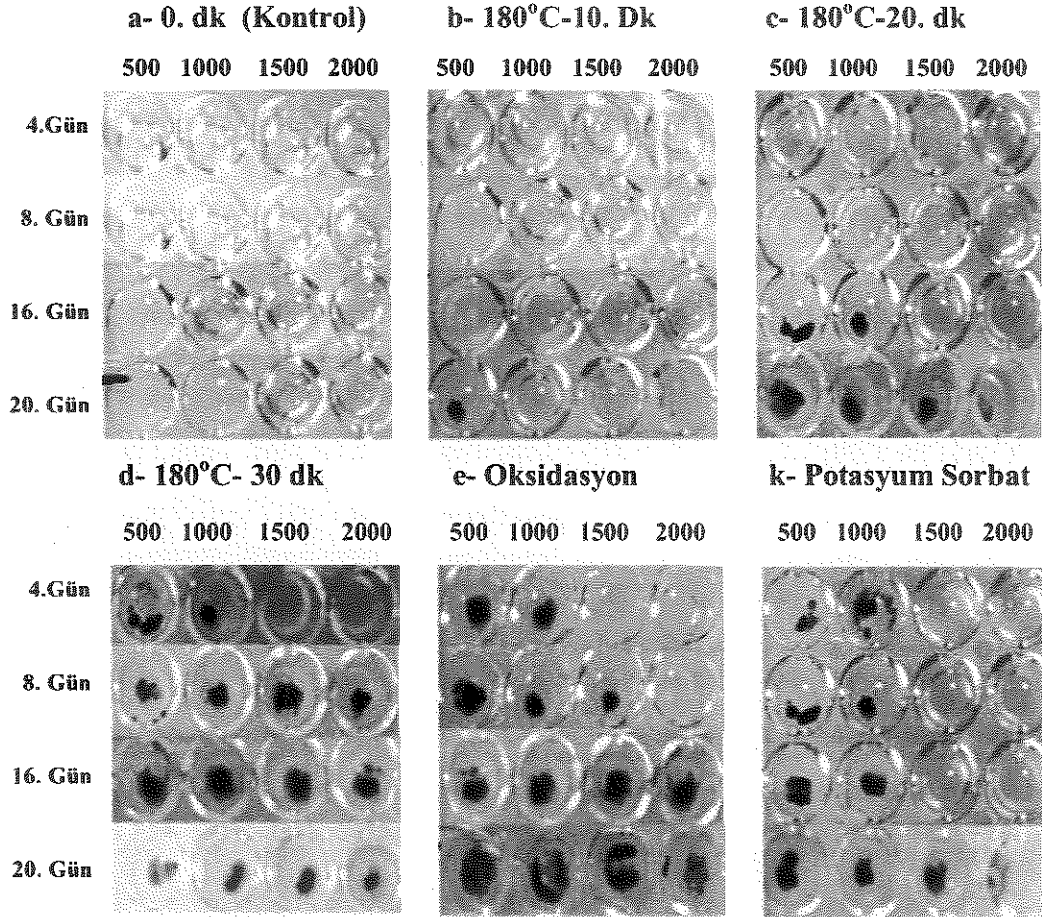
Çevresel koşullara maruz bırakılmış fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin antibakteriyel etkinliği de incelenmiş ve 3 mikrokapsülün de çevresel koşullar altında etkinliğinin değişmediği gözlenmiştir.

3.3. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Fitokimyasallar ve Fitokimyasal İçeren Mikrokapsüllerin Antifungal Etkinliği

Mikrokapsüllerin çevresel koşullar altındaki koruyuculuğunun tespit edilebilmesi amacıyla karvakrol, allisin ve bu fitokimyasalları içeren mikrokapsüller ısı ve oksidasyona maruz bırakılmıştır. Solüsyon içeriklerindeki değişim tespiti amacıyla gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus sp.* ve *Penicillium sp.*'a karşı gösterdikleri antifungal etkinlik testi sonuçları Şekil 3. 17- 3.28' de verilmiştir.

Fungal üremeler kuyucuklardan alınan 50 µl örneğin Malt Ekstrakt Agar'a ekilmesi ile kontrol edilmiş, spor oluşumu ise oküler mikroskop ile takip edilmiştir.

3.3.1. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Allisinin *Penicillium sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği

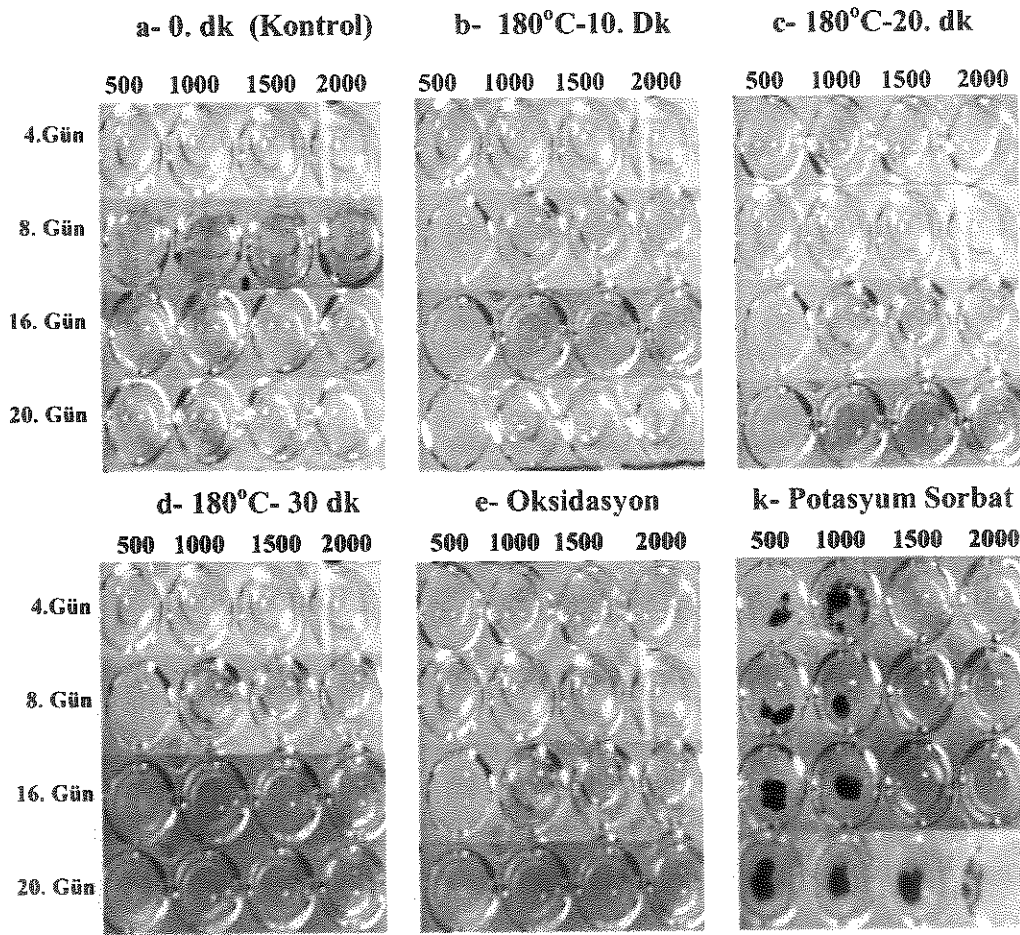


Şekil 3.21: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisinin *Penicillium sp.*'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış fitokimyasal, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış fitokimyasal, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış fitokimyasal, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış fitokimyasal, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş fitokimyasal, k- pozitif kontrol grubu)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış allisinin gıda örneklerinden izole edilen *Penicillium sp.*'a karşı antifungal özellikleri araştırılmıştır. Herhangi bir çevresel etken uygulanmayan allisin uygulamasında 16. günde 500 ppm, 20 günde ise 1000 ppm de fungal üreme başlamış, ancak sporlar oluşmamıştır. 10 dakikalık ısıtıl işlem uygulanması halinde 8. günde fungal üremenin başladığı, 20. günde spor oluşumu gözlenmiştir. 20 dakikalık ısıtıl işlem uygulamasında 8. günde fungal üreme başlarken 16. günde spor oluşumunun başladığı ve 20. günde

1500 ppm lik dozda üreme gözlenmiştir. 30 dakikalık ısıtıl işlem uygulamasında ise allisinin etkinliğinin oldukça azaldığı 4. günde 1000 ppm, 8. günde ise uygulanan her dozda üreme ve spor oluşumu gözlenmiştir. Oksidasyon deneyi sonucunda da 4. günde 1000 ppm, 8. günde 1500 ppm ve 16. günde uygulanan her dozda fungal üreme olduğu gözlenmiştir.

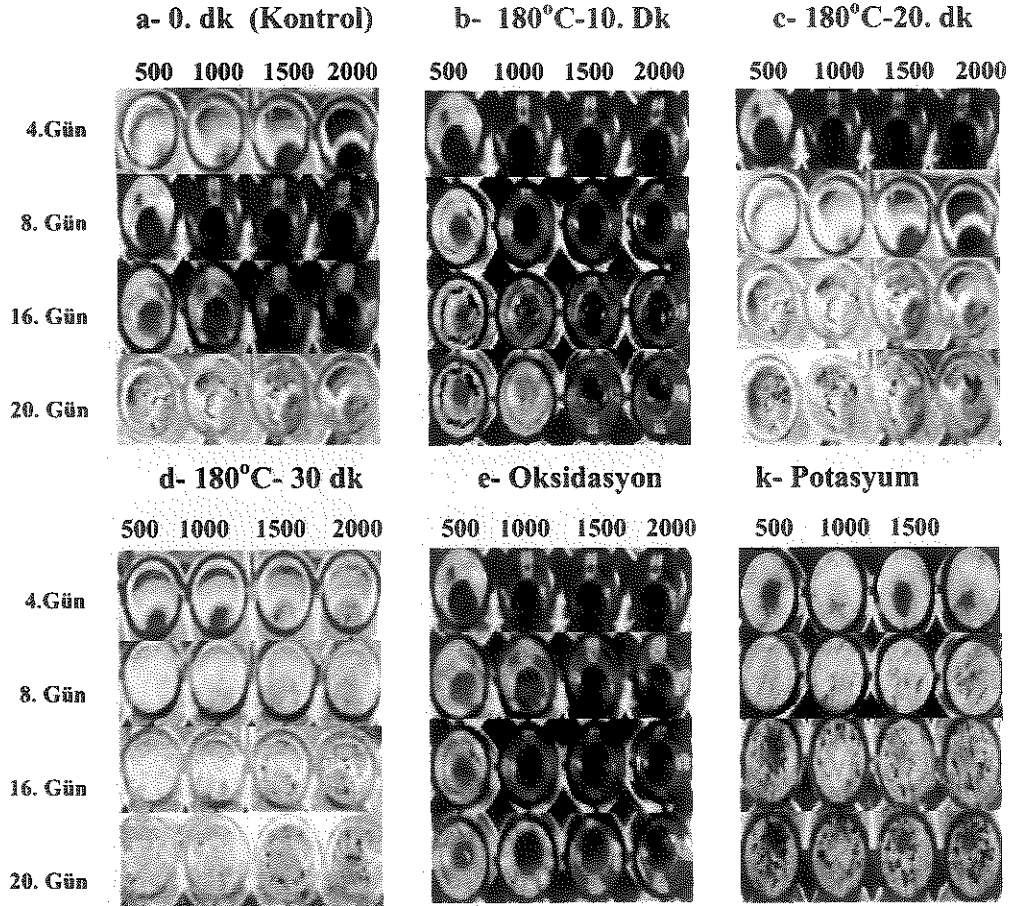
3.3.2. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Allisin Mikro kapsüllerin *Penicillium sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği



Şekil 3.22: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisin mikro kapsüllerin *Penicillium sp.*'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış mikro kapsül, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış mikro kapsül, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış mikro kapsül, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış mikro kapsül, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş mikro kapsül, k- pozitif kontrol grubu)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış allisin mikrokapsüllerin gıda örneklerinden izole edilen *Penicillium sp.*'a karşı antifungal özellikleri araştırılmıştır. Herhangi bir çevresel etken uygulanmayan allisin mikrokapsüllerin uygulamasında fungal üreme olmamıştır. 10 dakikalık ısıtma işlemi uygulanması halinde 8. günde 500 ppm dozda fungal üremenin başladığı ancak 20. güne kadar spor oluşumunun olmadığı gözlenmiştir. 20 dakikalık ısıtma işlemi uygulamasında 8. günde fungal üremenin başladığı, 20. günde 1500 ppm lik dozda üreme olduğu ancak sporulasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. 30 dakikalık ısıtma işlemi uygulamasında 8. günde fungal üremenin başladığı, 16. ve 20. günde 1500 ppm lik dozda üreme olduğu ancak sporulasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. Oksidasyon deneyi sonucunda da 16. günde 500 ppm, 20. günde ise 1500 ppm de fungal üreme olduğu gözlenmiş, spor oluşumu gözlenmemiştir.

3.3.3. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Allisinin *Aspergillus sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği

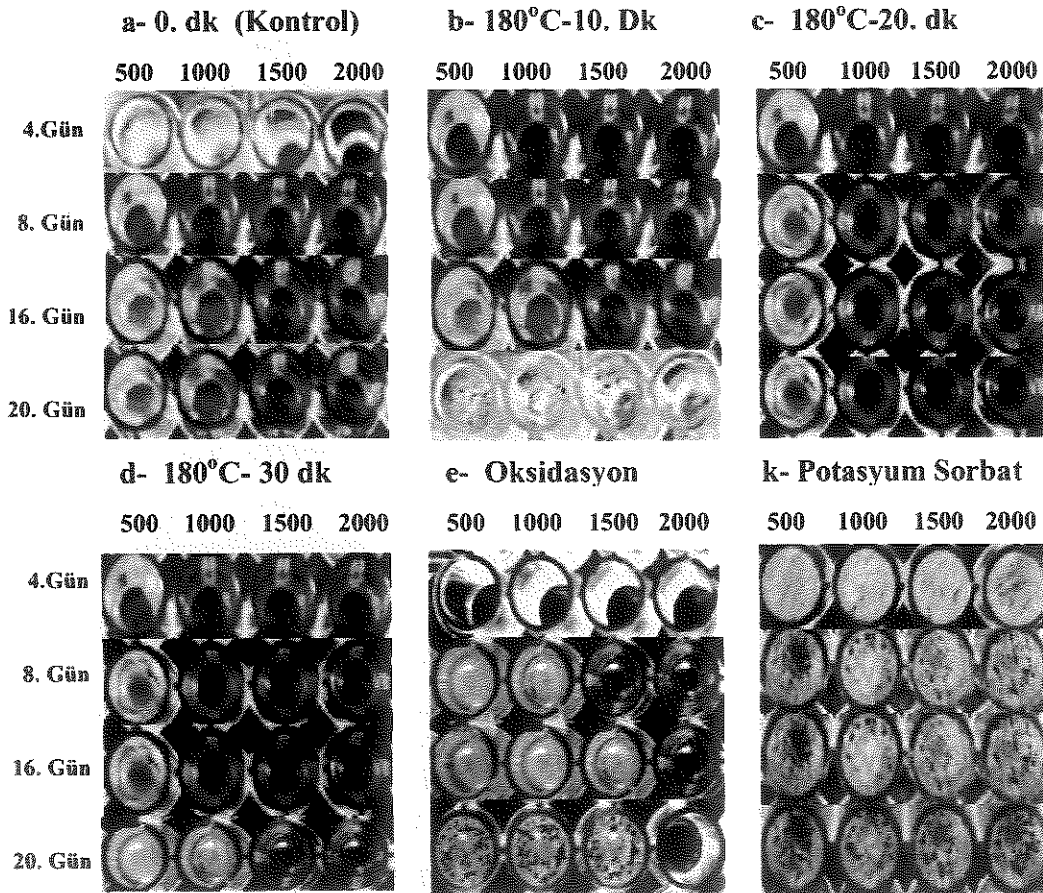


Şekil 3.23: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisinin *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal aktivite testi mikropkaka görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış fitokimyasal, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış fitokimyasal, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış fitokimyasal, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış fitokimyasal, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş fitokimyasal, k- pozitif kontrol grubu)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış allisinin gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal özellikleri araştırılmıştır. Herhangi bir çevresel etken uygulanmayan allisin uygulamasında 8. günde 500 ppmde fungal üreme, 20 günde ise 1000 ppm de spor oluşumu, 1500 ppm de ise spor oluşumu gözlenmiştir. 10 dakikalık ısıt işlem uygulanması halinde 8. günde fungal üremenin başladığı, 16. günde ise 1000 ve 1500 ppmde spor oluşumu gözlenmiştir. 20 dakikalık ısıt işlem uygulamasında 8. günde fungal üreme başlarken

8. günde 1000 ppmde fungal üreme başladığı ve 16. günde uygulanan her dozda üreme olduğı gözlenmiştir. 30 dakikalık ısıtıl işlem uygulamasında ise allisinin etkinliğinin oldukça azaldığı 4. günde 1500 ppmde fungal üremenin başladığı, 8. günde ise uygulanan her dozda üreme ve spor oluştuğı gözlenmiştir. Oksidasyon deneyi sonucunda da 4. günde 1000 ppm, 20. günde uygulanan her dozda fungal üreme olduğı gözlenmiştir.

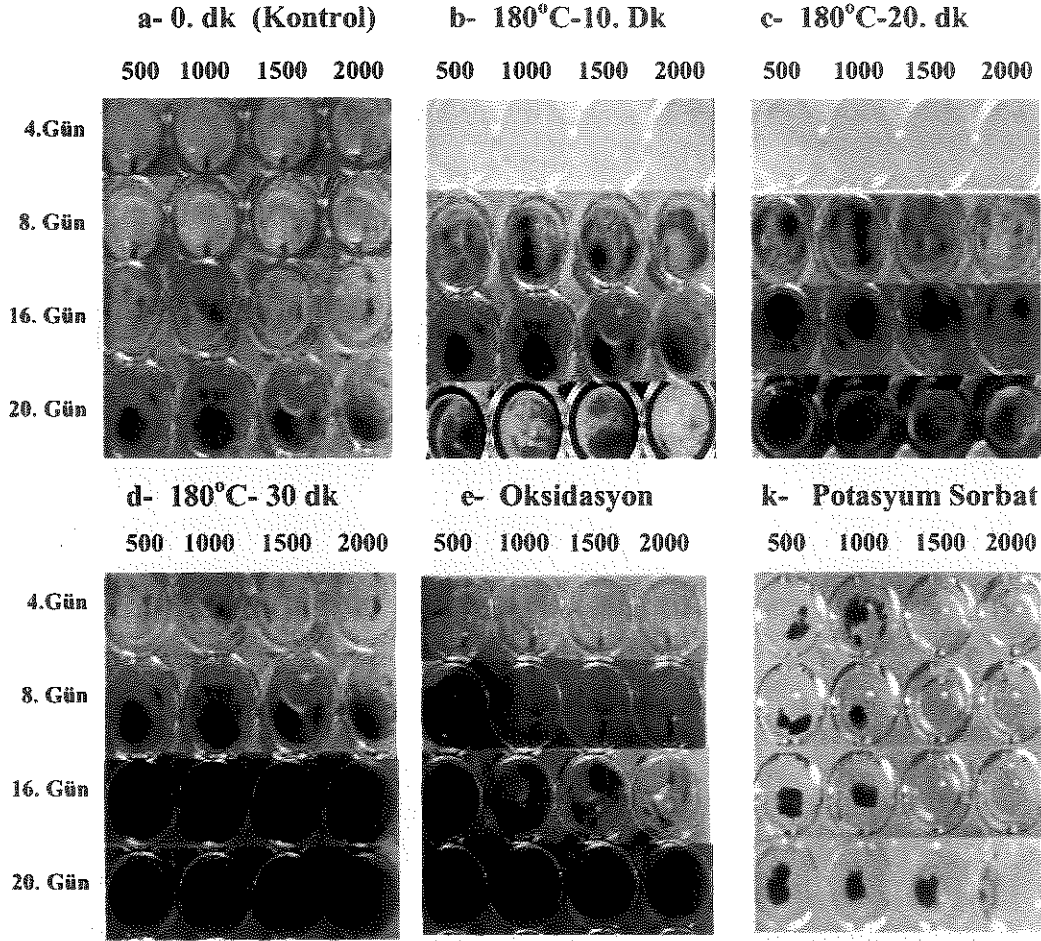
3.3.4. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Allisin Mikrokapsüllerin *Aspergillus sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği



Şekil 3.24: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisin mikrokapsüllerin *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış mikrokapsül, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış mikrokapsül, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış mikrokapsül, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış mikrokapsül, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş mikrokapsül, k- pozitif kontrol grubu)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış allisin mikrokapsüllerin gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal özellikleri araştırılmıştır. Herhangi bir çevresel etken uygulanmayan allisin mikrokapsül uygulamasında 16. günde 500 ppmde fungal üreme, 20 günde ise 1000 ppm de fungal üreme gözlenmiştir. 10 dakikalık ısıtıl işlem uygulanması halinde 8. günde fungal üremenin başladığı, 16. günde ise 1000 ve 1500 ppmde fungal üreme olduğu gözlenmiştir. 20 dakikalık ısıtıl işlem uygulamasında 8. günde fungal üreme başlarken 8. günde 1000 ppmde fungal üreme başladığı ve 20. günde 500 ppm de spor oluşumu, 2000 ppmde de fungal üreme gözlenmiştir. 30 dakikalık ısıtıl işlem uygulamasında ise 8. günde 500 ppmde fungal üreme ve spor oluşumunun başladığı, 20. günde ise uygulanan her dozda üreme ve spor oluştuğu gözlenmiştir. Oksidasyon deneyi sonucunda da 8. günde 1000 ppm, 20. günde ise 1500 ppm de spor oluşumunun olduğu gözlenmiştir.

3.3.5. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Karvakrolün *Penicillium sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği

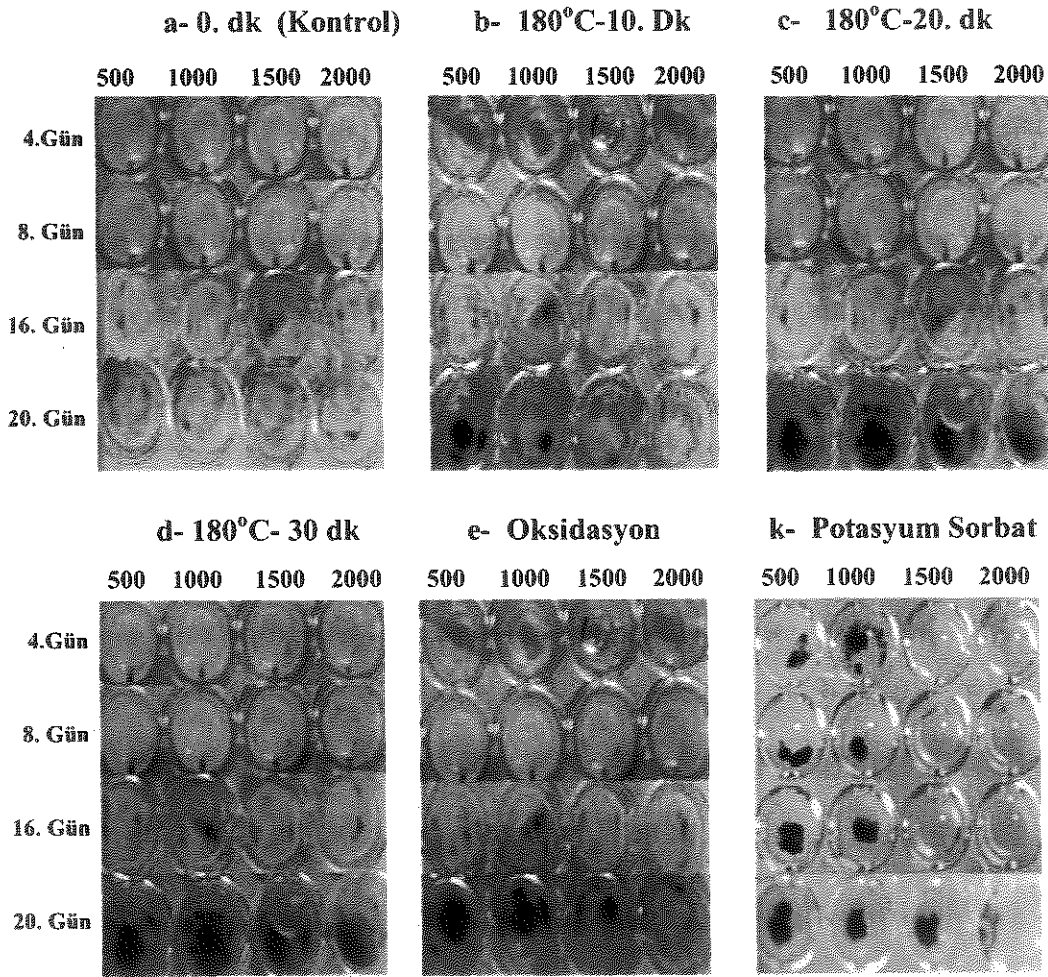


Şekil 3.25: Isı ve oksidasyon uygulanmış karvakrolün *Penicillium sp.*'a karşı antifungal aktivite testi mikroparka görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış fitokimyasal, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış fitokimyasal, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış fitokimyasal, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış fitokimyasal, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş fitokimyasal, k- pozitif kontrol grubu)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış karvakrolün gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal özellikleri araştırılmıştır. Herhangi bir çevresel etken uygulanmayan allisin mikrokapsül uygulamasında 16. günde 1000 ppmde fungal üreme, 20 günde ise 1500 ppm'e kadar fungal üreme ve spor oluşumu, 2000 ppm de ise sadece fungal üreme gözlenmiştir. 10 dakikalık ısı işlem uygulanması halinde 8. günde kullanılan her dozda fungal üremenin başladığı, 16. günden itibaren her dozda üreme ve spor

oluşumu gözlenmiştir. 20 dakikalık ısı işlem uygulamasında 8. günde uygulanan dozlarda fungal üremenin 500, 1000 ve 1500 ppmde spor oluşumu başladığı gözlenmiştir. 30 dakikalık ısı işlem uygulamasında 4. günde fungal üreme başlarken 8. günde uygulanan dozlarda spor oluşumu başladığı gözlenmiştir.

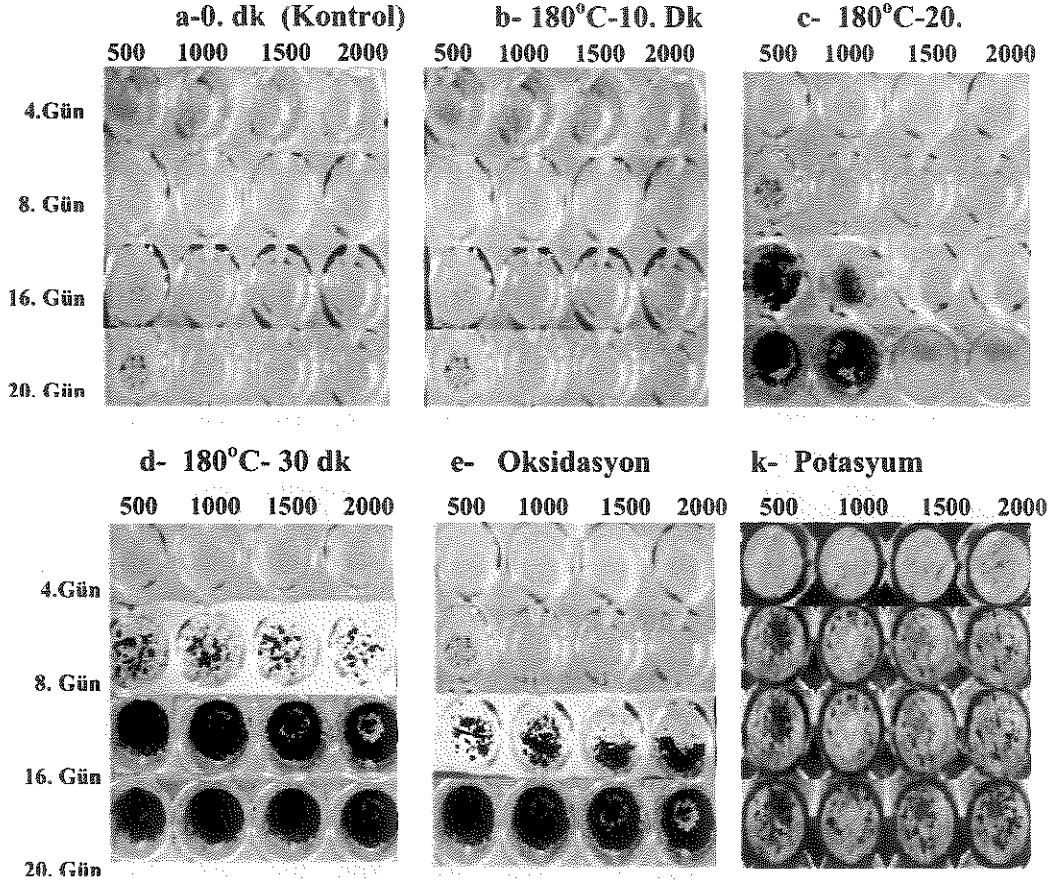
3.3.6. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Karvakrol Mikrokapsüllerin *Penicillium sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği



Şekil 3.26: Isı ve oksidasyon uygulanmış karvakrol mikrokapsüllerin *Penicillium sp.*'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış mikrokapsül, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış mikrokapsül, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış mikrokapsül, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış mikrokapsül, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş mikrokapsül, k- pozitif kontrol grubu)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış karvakrol mikrokapsüllerin gıda örneklerinden izole edilen *Penicillium sp.*'a karşı antifungal özellikleri araştırılmıştır. Herhangi bir çevresel etken uygulanmayan karvakrol mikrokapsüllerin uygulamasında fungal üreme olmamıştır. 10 dakikalık ısıt işlem uygulanması halinde 16. günde 500 ve 1000 ppm dozda fungal üremenin başladığı, 20. günde 500 ve 1000 ppm de spor oluşumu, 1500 ppm de ise fungal üreme gözlenmiştir. 20 dakikalık ısıt işlem uygulamasında 20. günde uygulanan 4 dozda da spor oluşumu gözlenmiştir. 30 dakikalık ısıt işlem uygulamasında 16. günde 500 ve 1000 ppm de fungal üremenin başladığı, 20. günde ise uygulanan 4 dozda da spor oluşumu gözlenmiştir. Oksidasyon deneyi sonucunda da 16. günde 500 ppmde fungal üremenin başladığı, 20. günde ise 500, 1000 ve 1500 ppm de spor oluşumu, 2000 ppmde de fungal üreme gözlenmiştir.

3.3.7. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Karvakrolün *Aspergillus sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği

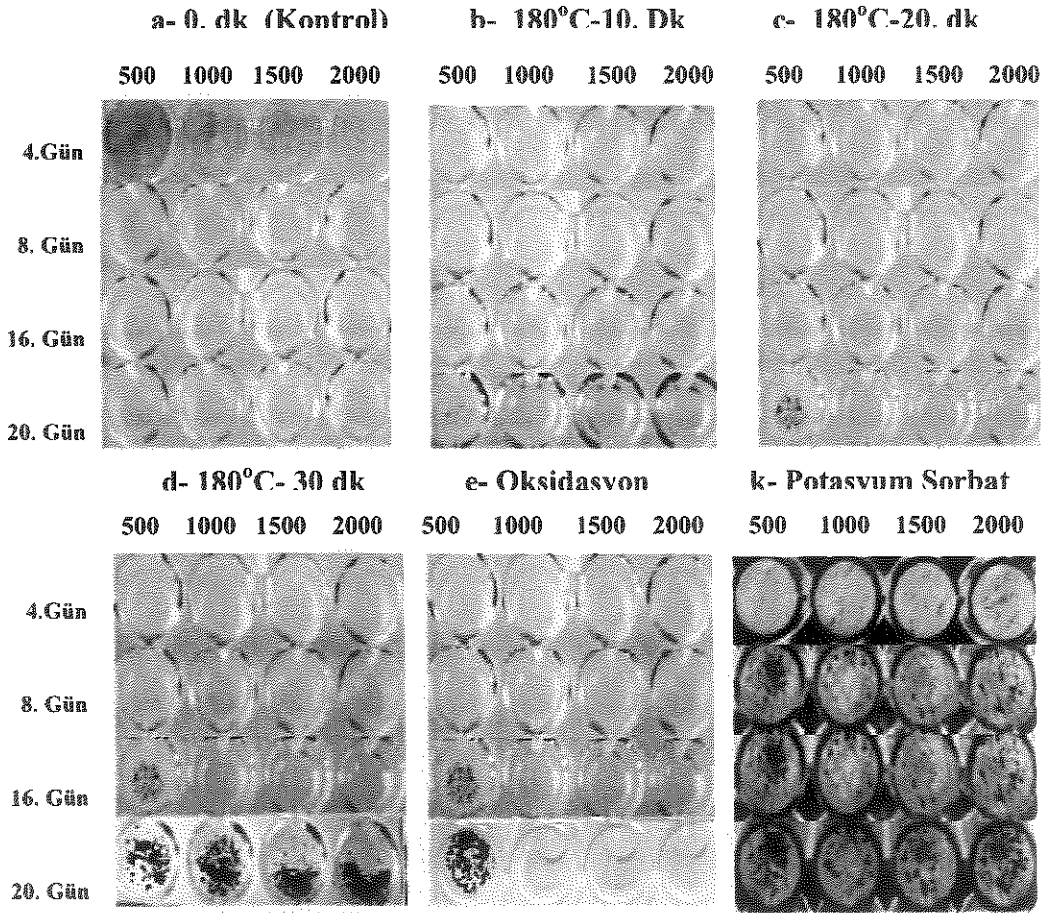


Şekil 3.27: Isı ve oksidasyon uygulanmış karvakrolün *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal aktivite testi mikropilaka görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış fitokimyasal, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış fitokimyasal, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış fitokimyasal, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış fitokimyasal, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş fitokimyasal, k- pozitif kontrol grubu)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış karvakrolün gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal özellikleri araştırılmıştır. Herhangi bir çevresel etken uygulanmayan karvakrol uygulamasında kullanılan dozlarda fungal üreme olmamıştır. 10 dakikalık ısıtılma işlemi uygulanması halinde 16. günde 500 ppm dozda fungal üremenin başladığı, 20. Günde de 1000 ppm de fungal üremenin başladığı 500 ppm de ise spor oluşumu gözlenmiştir. 20 dakikalık ısıtılma işlemi uygulamasında 8. günde 500 ppmde fungal üreme ve spor oluşumunun başladığı, 16. günde 500 ve 1000 ppmde spor oluşumunun başladığı, 20. günde 1500

ppm lik dozda fungal üreme olduğu, 500 ve 1000 ppmde ise spor oluşumu gözlenmiştir. 30 dakikalık ısıtılma uygulamasında 4. günde 500 ve 1000 ppm de fungal üremenin başladığı, 8., 16. ve 20. günde uygulanan her dozda fungal üreme ve spor oluşumu gözlenmiştir. Oksidasyon deneyi sonucunda da 8. Günde 500 ppm dozunda spor oluşumu, 1000 ppmde ise fungal üreme gözlenmiştir. 16. ve 20. günde kullanılan her dozda fungal üreme ve spor oluşumu gözlenmiştir.

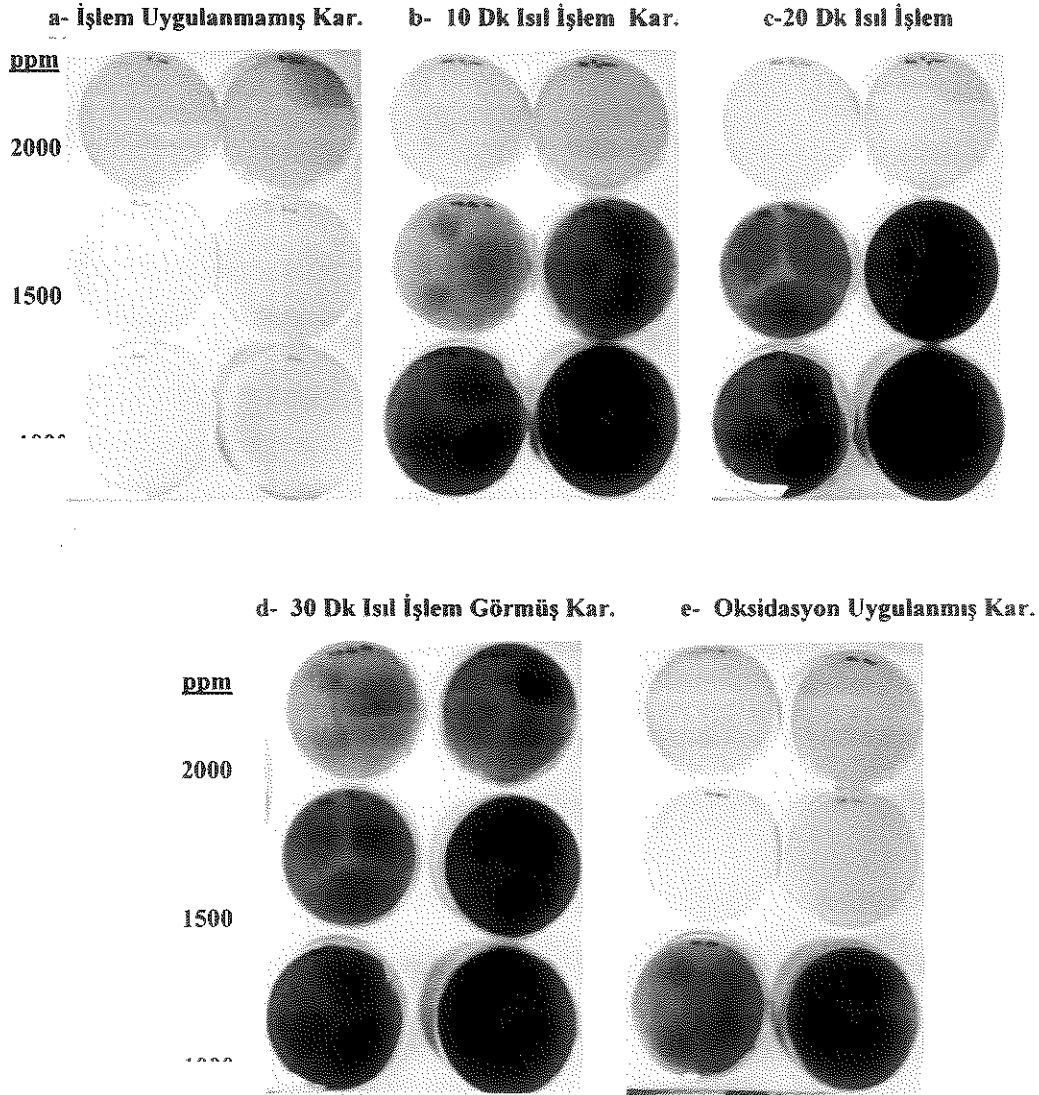
3.3.8. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Karvakrol Mikrokapsüllerin *Aspergillus sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği



Şekil 3.28: Isı ve oksidasyon uygulanmış karvakrol mikrokapsüllerin *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal aktivite testi mikrolaka görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış mikrokapsül, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış mikrokapsül, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış mikrokapsül, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış mikrokapsül, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş mikrokapsül, k- pozitif kontrol grubu)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış karvakrol mikrokapsüllerin gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal özellikleri araştırılmıştır. Herhangi bir çevresel etken uygulanmayan karvakrol uygulamasında kullanılan dozlarda fungal üreme olmamıştır. 10 dakikalık ısıtma işlemi uygulanması halinde 20. günde 500 ppm dozda fungal üremenin başladığı gözlenmiştir. 20 dakikalık ısıtma işlemi uygulamasında 20. günde 500 ppmde fungal üreme ve spor oluşumunun başladığı gözlenmiştir. 30 dakikalık ısıtma işlemi uygulamasında 16. günde 500 ppm de fungal üremenin başladığı, 20. günde uygulanan her dozda fungal üreme ve spor oluşumu gözlenmiştir. Oksidasyon deneyi sonucunda da 16. Günde 500 ppm dozunda spor oluşumu gözlenmiştir. 20. günde 500 ppmde spor oluşumu, 1000 ppmde fungal üreme ve spor oluşumu gözlenmiştir.

3.3.9. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Karvakrolün *Aspergillus sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği

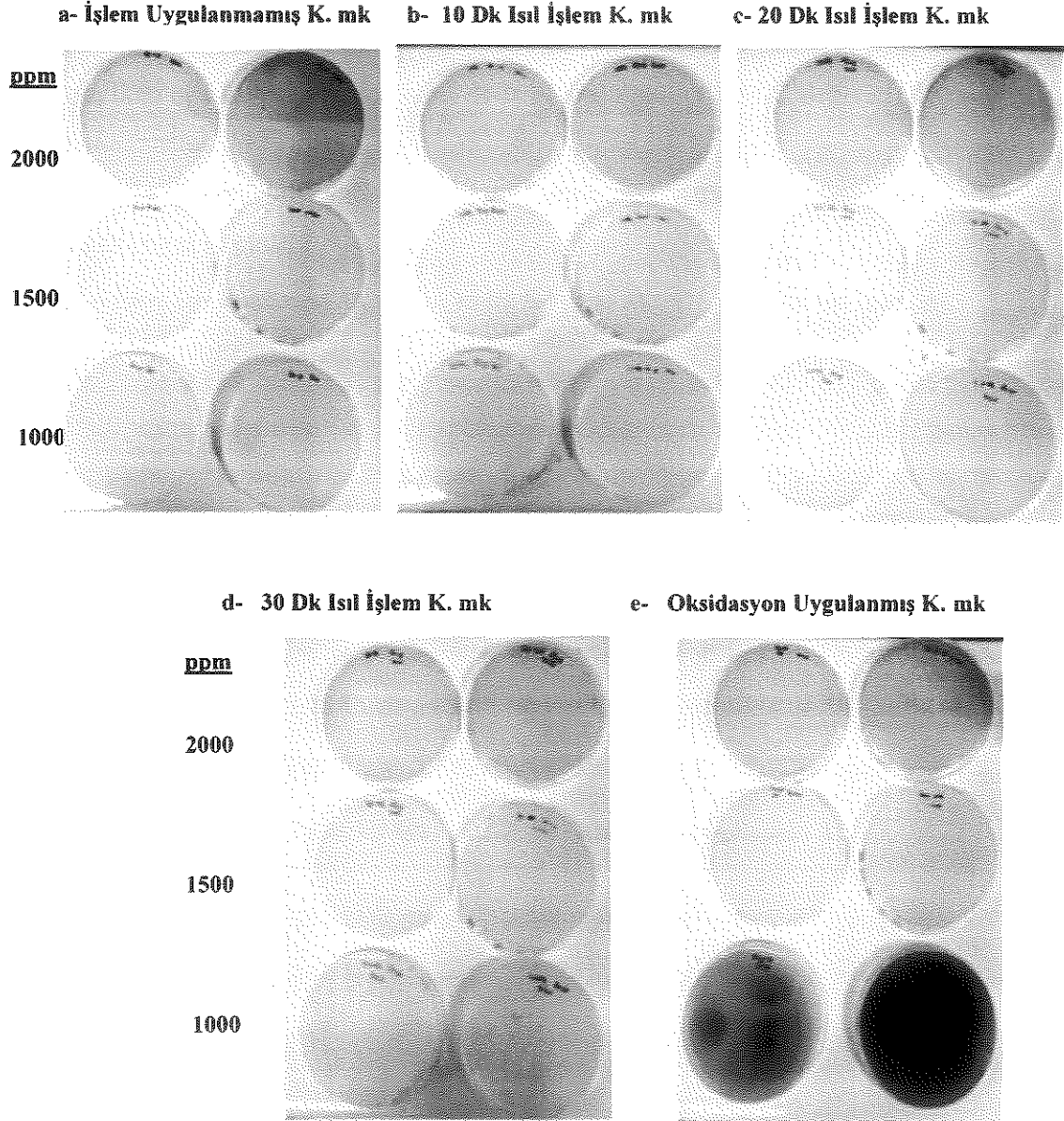


Şekil 3.29: Isı ve oksidasyon uygulanmış karvakrolün *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal aktivite testi (3 nokta ekim yöntemi) petri görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış fitokimyasal, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış fitokimyasal, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış fitokimyasal, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış fitokimyasal, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş fitokimyasal)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış karvakrolün gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal özellikleri katı besiyeri kullanılarak araştırılmıştır. 20. günün sonunda ısıtılmış işlem görmemiş

karvakrolün MIC değeri 2000 ppm iken 10 dakikalık ısıtıl işlem uygulanmış karvakrolün MIC değeri 1000 ppm, 20 dakikalık ısıtıl işlem uygulanmış karvakrolün MIC değeri 1000 ppm, okidasyon uygulanmış karvakrolün MIC değeri 1500 olaak bulunmuş, 30 dakika ısıtıl işlem görmüş karvakrol ise uygulanan dozlarda antifungal etkinlik göstermemiştir. Oksidasyona maruz bırakılmış mikrokapsüllerin MIC değeri ise 1500 olarak bulunmuştur.

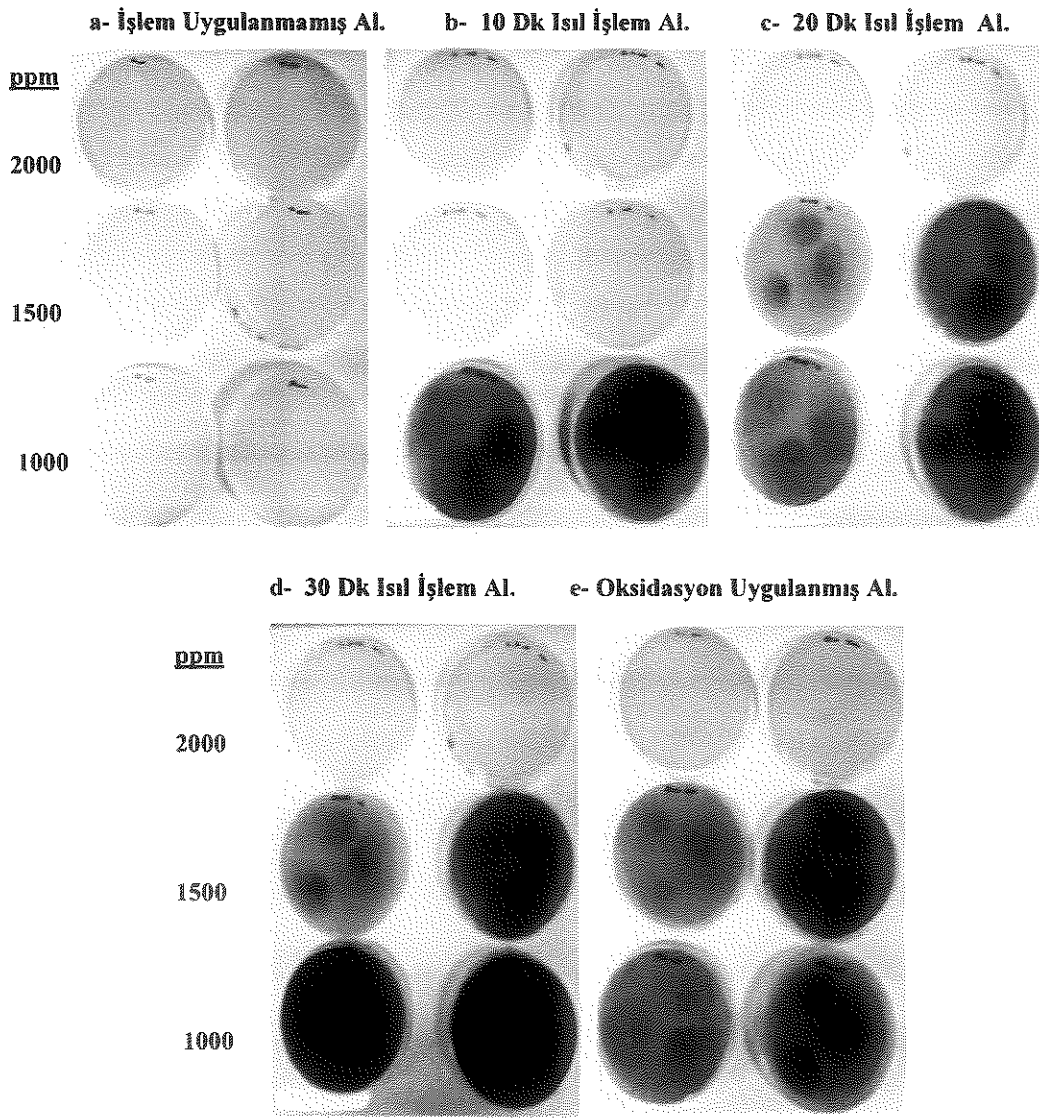
3.3.10. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Karvakrol Mikrokapsüllerin *Aspergillus sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği



Şekil 3.30: Isı ve oksidasyon uygulanmış karvakrol mikrokapsüllerin *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal aktivite testi (3 nokta ekim yöntemi) petri görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış mikrokapsül, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış mikrokapsül, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış mikrokapsül, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış mikrokapsül, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş mikrokapsül)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış karvakrol mikrokapsüllerin gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal özellikleri katı besiyeri kullanılarak araştırılmıştır. 20. günün sonunda ısı işlem görmemiş ve 10, 20, 30 dakika ısı işlem karvakrol mikrokapsüllerin MIC değeri 2000 ppm iken oksidasyona maruz bırakılmış mikrokapsüllerin MIC değeri 1500 ppm olarak bulunmuştur.

3.3.11. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Allisinin *Aspergillus sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği

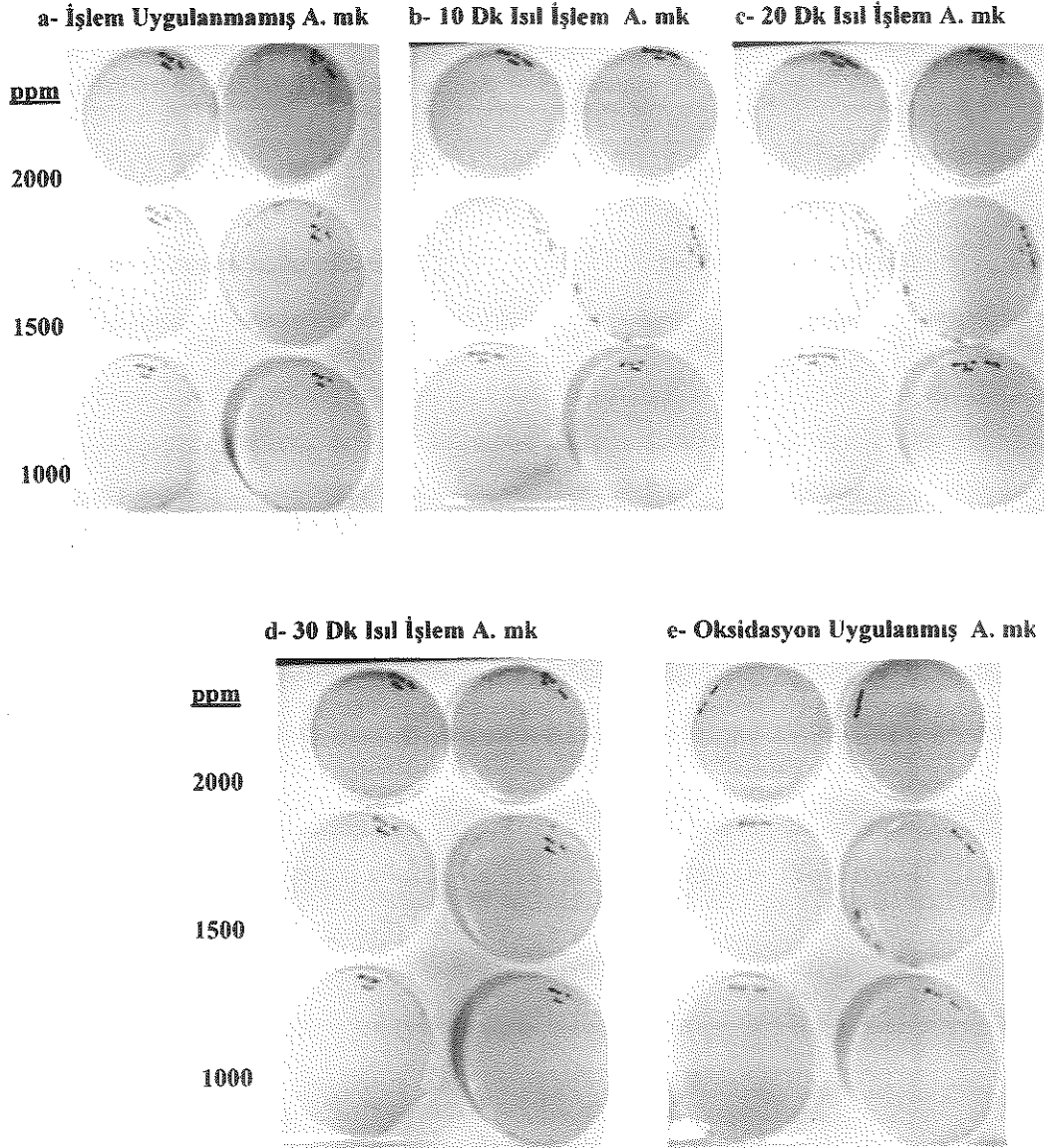


Şekil 3.31: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisinin *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal aktivite testi (3 nokta ekim yöntemi) petri görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış fitokimyasal, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış fitokimyasal, c- 180°C'de

20 dakika ısıtılmış fitokimyasal, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış fitokimyasal, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş fitokimyasal)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış allisinin gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal özellikleri katı besiyeri kullanılarak araştırılmıştır. 20. günün sonunda ısıl işlem görmemiş allisinin MIC değeri 2000 ppm olarak bulunmuştur. 10 dakika ısıl işlem uygulanmış allisinin MIC değeri 1500 ppm, 20 ve 30 dakika ısıl işlem uygulanmış allisinin MIC değeri ise 1000 ppm olarak bulunmuştur. Oksidasyona maruz bırakılmış allisin uygulanan dozlarda antifungal etkinlik göstermemiştir.

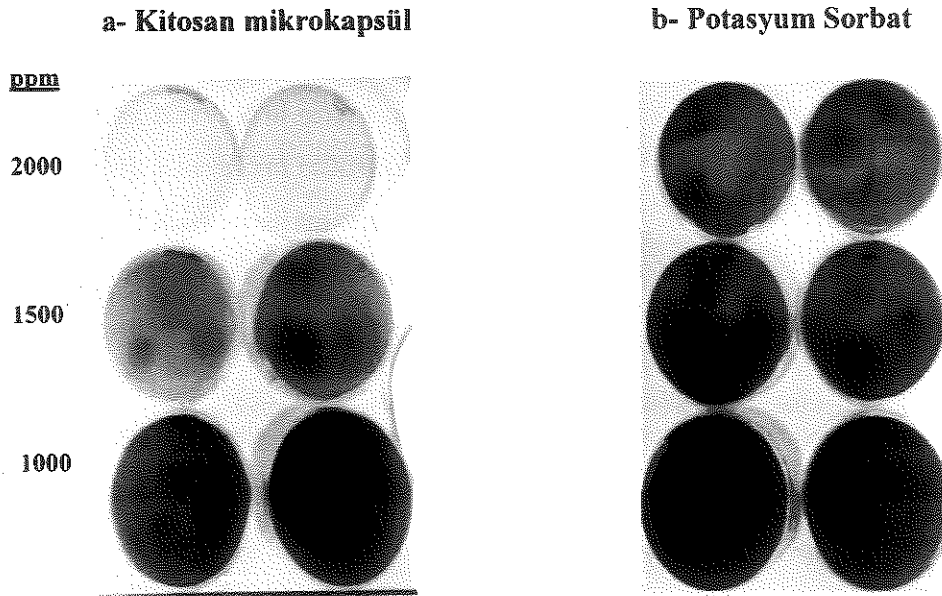
3.3.12. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Allisin Mikrokapsüllerin *Aspergillus sp.*'a Karşı Antifungal Etkinliği



Şekil 3.32: Isı ve oksidasyon uygulanmış allisin mikrokapsüllerin *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal aktivite testi (3 nokta ekim yöntemi) petri görüntüleri (a- çevresel etmen uygulanmamış mikrokapsül, b- 180°C'de 10 dakika ısıtılmış mikrokapsül, c- 180°C'de 20 dakika ısıtılmış mikrokapsül, d- 180°C'de 30 dakika ısıtılmış mikrokapsül, e- 1 hafta oda koşullarında hava ile temas ettirilmiş mikrokapsül)

Çevresel koşullara maruz bırakılmış ve herhangi bir etki uygulanmamış allisin mikrokapsüllerin gıda örneklerinden izole edilen *Aspergillus sp.*'a karşı antifungal özellikleri katı besiyeri kullanılarak araştırılmıştır. 20. günün sonunda ısıl işlem görmemiş ve 10,20, 30 dakika ısıl işlem ve oksidasyon uygulanmış karvakrol mikrokapsüllerin MIC değeri 2000 olarak bulunmuştur.

3.3.13. Antifungal Aktivite Çalışması Kontrol Grupları



Şekil 3.33: Petride antifungal etkinlik testi kontrol grupları (a- fitokimyasal içermeyen kitosan mikrokapsüller, b- pozitif kontrol)

Tablo 3.2 : Karvakrol, allisin ve mikroenkapsüle edilmiş formlarının çevresel koşullar altında antifungal MİK değerleri (16. Gün)

Deney Grubu	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>
Karvakrol (işlem görmemiş)	1500	1000
180°C 10 dk Karvakrol	2000	2000
180°C 20 dk Karvakrol	> 2000	2000
180°C 30 dk Karvakrol	> 2000	> 2000
Oksidasyon Uygulanmış Karvakrol	2000	1500
Karvakrol mikrokapsül (işlem görmemiş)	1500	<500
180°C 10 dk Karvakrol mikrokapsül	1500	<500
180°C 20 dk Karvakrol mikrokapsül	1500	<500
180°C 30 dk Karvakrol mikrokapsül	1500	1000
Oksidasyon Uygulanmış Karvakrol mikrokapsül	1500	1000
Allisin (işlem görmemiş)	1000	1000
180°C 10 dk Allisin	1500	1500
180°C 20 dk Allisin	2000	2000
180°C 30 dk Allisin	> 2000	> 2000
Oksidasyon Uygulanmış Allisin	2000	2000
Allisin mikrokapsül (işlem görmemiş)	500	1000
180°C 10 dk Allisin mikrokapsül	1000	1000
180°C 20 dk Allisin mikrokapsül	1000	1000
180°C 30 dk Allisin mikrokapsül	1000	1000
Oksidasyon Uygulanmış Allisin mikrokapsül	1000	1000
Potasyum Sorbat (Kontrol)	2000	> 2000
Kitosan	> 2000	2000

Çalışmada kontrol grubu olarak mikroenkapsülasyon işleminde kullanılan kitosan ve günümüzde gıda ürünlerinin raf ömrünü arttırabilmek amacıyla kullanılan antimikrobiyal etkili potasyum sorbat kullanılmıştır. Kitosanın ve potasyum sorbatın MIC değeri 1000 ppm olarak bulunmuştur.

Canivares ve Gracia (2004) farklı çözücüler kullanarak sarımsaktan allisin elde etmiş ve farklı sıcaklıklarda sakladıklarında allisinin *Helicobacter pylori* üzerindeki etkinliğinin değişimleri izlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda sıcaklığın zaman içerisinde allisin miktarını düşürdüğü ve paralel olarak *H. pylori* üzerindeki etkinliğinin de azaldığı gözlenmiştir. Çalışmamızda da literatüre benzer olarak sıcaklık artışı ile paralel allisin etkinliğinde azalmalar gözlenmiştir. Allisinin antifungal aktivitesindeki düşüşün sebebinin allisinin sıcaklık ile birlikte degradasyonu olduğu düşünülmektedir [155].

Fujisawa ve Suma (2008) yaptığı bir çalışmada allisinin termal stabilitesi biyolojik ve kimyasal olarak test edilmiştir. Biyolojik yöntem olarak *S. aureus* ve *E. coli* üzerindeki antibakteriyel aktivitesi karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada eski çalışmalara paralel olarak etkinliğin sıcaklıkla ters orantılı olduğu gözlenmiş, sıcaklık arttıkça antibakteriyel etkinliğin azaldığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda da literatür verileri desteklenmiş ve allisinin sıcaklık ile muamele edildikten kısa bir süre sonra etkinliğinin azaldığı gözlenmiştir. Etkinliğindeki bu düşüşün literatür çalışmalarında vurgulandığı üzere allisin miktarındaki düşüş olduğu düşünülmektedir [51].

Guimaraes ve Oliveira (2014) karvakrolün kansere bağlı acıların giderilmesinde kullanımı üzerinde çalışmış, çalışma sırasında sıcaklığa bağlı miktar değişimi incelenmiştir. 168 °C sıcaklıkta karvakrolde hızlı bir şekilde ağırlık kaybı gözlenmiştir. Çalışmamızda karvakrolün sıcaklık ile muamele edildikten sonra hızlı şekilde etkinliğini kaybettiği gözlenmiştir. Literatürde de yer aldığı üzere uçucu bir bileşen olan karvakrolün, sıcaklık ile birlikte miktarındaki düşüşün antifungal etkinliğinin de düşmesine sebep olduğu düşünülmektedir [88].

Sansone ve Picerno (2014) şakayık (*Paeonia rockii*) bitkisinin kitosan bazlı matriksle enkapsüle edilmesinin *Candida albicans* üzerinde antifungal aktivitesinin değişimlerini araştırmıştır. Bu çalışmada kitosan ile enkapsüle edilmiş şakayık ekstraktının saf ekstraktan daha etkili olduğu gözlenmiş, elde edilen bu ürünün gıda, kozmetik gibi antifungal ajanlara ihtiyaç duyan sektörlerde kullanılabileceği vurgulanmıştır [156]. Çalışmamızda da literatür çalışmalarına benzer olarak kitosan ile enkapsüle edilmiş fitokimyasalların antifungal etkinlikleri daha yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu olarak antifungal aktivitesi test edilmiş kitosanın antifungal etkinliği

fitokimyasal içeren mikrokapsüllerden daha düşük bulunmuştur. Dolayısıyla fitokimyasal ve kitosanın birlikte kullanımının sinerjik etki oluşturduğu düşünülmektedir. Ayrıca sıcaklık ile birlikte hızlı bir şekilde etkinliğini kaybeden allisin ve karvakrolün enkapsüle edilerek çevresel koşullardan korunduğu, ilaveten etkinliklerinin arttığı belirlenmiştir. Hsieh ve arkadaşları (2006) dereotu yağının uçmaması ve kontrollü salınımının sağlanabilmesi için ısıyla salınım gerçekleştirebilen kitosan mikrokapsüller üzerinde çalışmıştır. Çalışmanın sonunda kitosan mikrokapsüllerin uçucu yağların stabilizasyonu için kullanılabileceği raporlanmıştır [143]. Hsieh ve arkadaşlarının araştırması, çalışmamızda kullanılan karvakrol uçucu bileşeninin etkinliğinin kitosan ile enkapsüle edilerek korunduğu tezini desteklemektedir.

3.4. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Fitokimyasal ve Fitokimyasal İçeren Mikrokapsüllerin Antioksidan Etkinliği

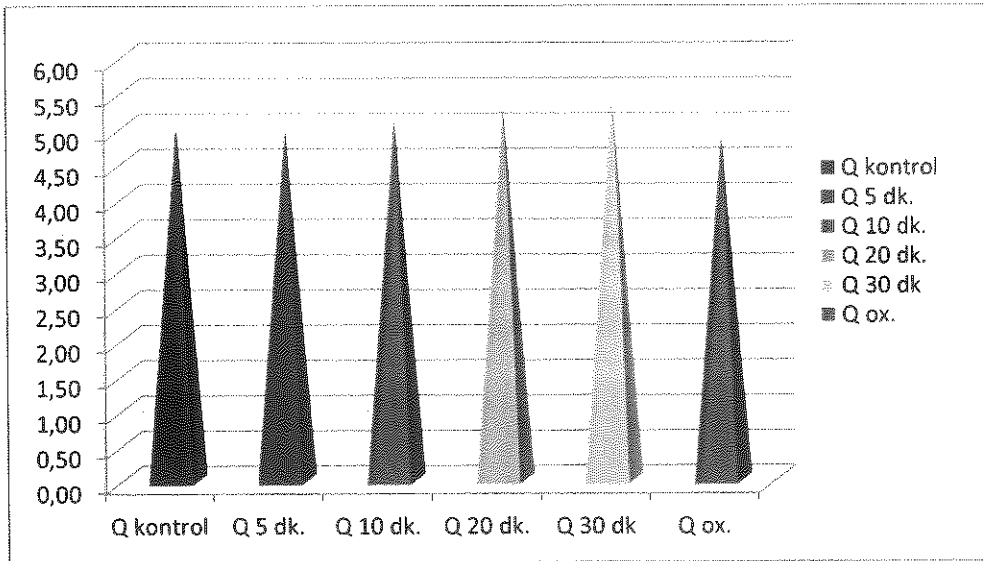
Mikrokapsüllerin çevresel koşullar altındaki koruyuculuğunun tespit edilebilmesi amacıyla kuersetin, oleuropein ve bu fitokimyasalları içeren mikrokapsüller ısı ve oksidasyona maruz bırakılmıştır. Solüsyon içeriklerindeki değişim tespiti amacıyla CUPRAC testi ile antioksidan etkinlik sonuçları Şekil 3.28-3.32 ve Tablo 3.3- 3.6'da verilmiştir.

3.4.1. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Kuersetin ve Kuersetin Mikrokapsüllerin Antioksidan Etkinliği

Soğanda bol miktarda bulunan kuersetin fitokimyasalının gıda ürünlerinde kullanıldığında sıcaklık ve oksidasyon gibi çevresel unsurlar altında değişimi incelenmiştir. Kuersetin fitokimyasalını çevresel koşullardan koruyabilmek amacıyla enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiş, belirli çevresel koşullar altında enkapsülasyon işleminin koruyuculuğu araştırılmıştır. Bu amaçla hava koşulları ile oksidasyon ve genel olarak gıdaların pişmesi için uygulanan 180°C sıcaklık uygulanmıştır.

Tablo 3.3: Çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetinin antioksidan etkinliği

Örnek	TEAC(mM)
İşlem Görmemiş Kuersetin	5,01
5 dk Isıl İşlem Görmüş Kuersetin	5,00
10 dk Isıl İşlem Görmüş Kuersetin	5,12
20 dk Isıl İşlem Görmüş Kuersetin	5,33
30 dk Isıl İşlem Görmüş Kuersetin	5,51
Oksidasyon Uygulanmış Kuersetin	4,91



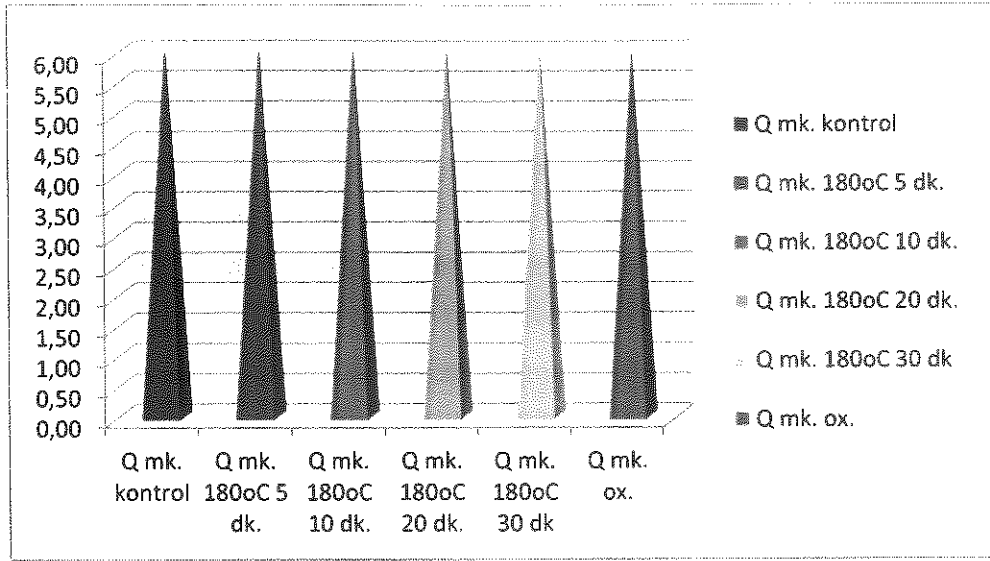
Şekil 3.34: Isı ve oksidasyon uygulanmış kuersetinin TEAC(mM) grafiği

Rohn ve Buncher (2007) soğandaki kuersetin glikozitlerinin kavurma süresince termal degradasyonu üzerine araştırma yapmıştır. Bu çalışmada 180°C'lik kavurma sıcaklığında spiraeosit (kuersetin 4-O-β-D- glukozit), izokuersitrin (kuersetin 3-O- β-D- glukozit), kuersitrin (kuersetin-3-O-α-L-ramnosit), kuersetin, hiperosit (kuersetin 3-O-β-D-galaktoz, rutrin (kuersetin-3-O-α-L-ramnosil-(1-6)-β-D-glukozit) ve kuersetin-3,4'-di-O-β-D-glukozitin değişimleri incelenmiştir. Çalışmada 1 saat boyunca her 10 dakikada örnekler alınmış ve HPLC-DAD ile miktar tayinleri yapılmıştır. Sonuç olarak termal stabilitesi en düşük olan kuersitrini isokuersitrin, rutin, hiperosit,spirosit takip etmiş, kuersetinin ise miktarında kaydadeğer bir düşüş gözlenmemiştir. Aksine yapılan

çalışmada kavrulmuş soğan içeriğindeki kuersetin miktarının kavrulma süresince arttığı gözlenmiştir. Bu miktar artışının diğer maddelerin glikozit bağlarından dolayı erken bozunması ve buharlaşan sıvı miktarı ile ilişkili olduğunun düşünüldüğü vurgulanmıştır [157]. Çalışmamızda bir haftalık oksidasyon ve 180°C’de yarım saat boyunca her 10 dakikada bir örnek alınarak kuersetinin antioksidan etkinliğindeki değişimler gözlenmiştir. DMSO’da çözdürüldükten sonra ısıtılan kuersetinin etkinliğinde ufak yükselmeler gözlenmiştir. Başlangıçta 5,00 olan TEAC(mM) değerinin yarım saatlik ısıtma sonunda 5,51 TEAC(mM) değerine ulaştığı gözlenmiştir. Bu değer in yükselmesinin, literatür çalışmalarında da yer aldığı gibi ısıtma ile çözücü miktarının azalması ve kuersetin konsantrasyonunun yükselmesi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

Tablo 3.4: Çevresel koşullara maruz bırakılmış kuersetin mikrokapsüllerin antioksidan etkinliği

Örnek	TEAC(mM)
İşlem Görmemiş Kuersetin mk.	6,14
5 dk Isıl İşlem Görmüş Kuersetin mk.	6,14
10 dk Isıl İşlem Görmüş Kuersetin mk.	6,17
20 dk Isıl İşlem Görmüş Kuersetin mk.	6,19
30 dk Isıl İşlem Görmüş Kuersetin mk.	6,20
Oksidasyon Uygulanmış Kuersetin mk.	6,11



Şekil 3.35: Isı ve oksidasyon uygulanmış kuersetin mikrokapsüllerin TEAC(mM) grafiği

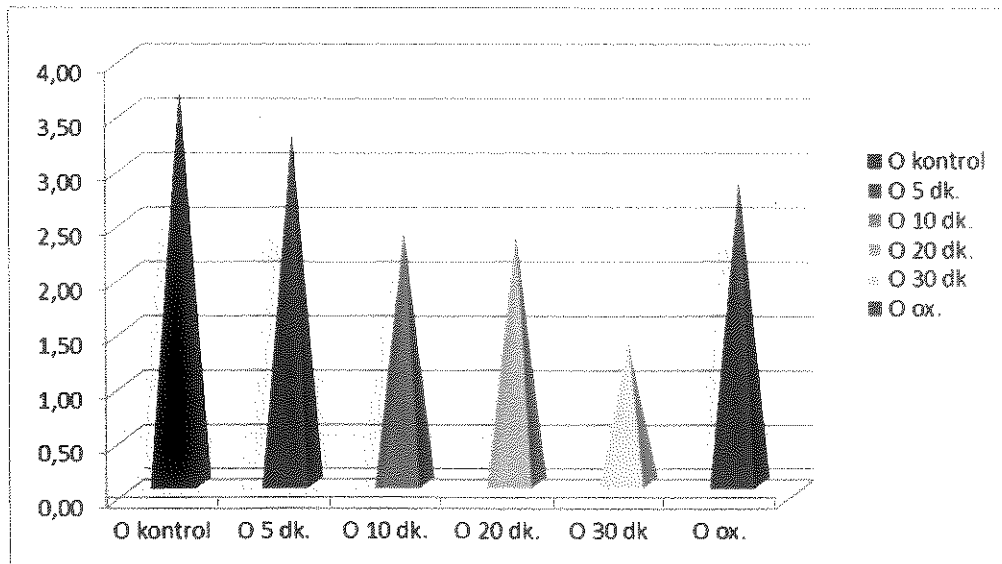
Souza ve Vaz (2013) kuersetini lesitin/kitosan nanoparçacıklarına yükleyerek fonksiyonel gıda olarak kullanımı üzerine araştırmalar gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada nanoparçacıklara kuersetin yüklendikten sonra termal stabiliteleri test edilmiş ve DPPH yöntemi ile antioksidan özelliklerindeki değişiklikler takip edilmiştir. Yapılan çalışmada 5-70°C aralığında kuersetinin termal stabilitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Enkapsüle edilmiş kuersetinin antioksidan özelliği enkapsüle edilmemiş formuna göre daha düşük bulunmuştur. Yapılan çalışmada ayrıca kitosan/lesitin nanoparçacıklarının da etkinliği araştırılmış ve enkapsüle edilmemiş kuersetine göre yüksek olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla kuersetin yüklü nanoparçacıkların antioksidan etkinliğinin enkapsüle edilmemiş kuersetine göre yüksek bulunması, nanoparçacıkların etkinliğinin yüksek bulunması ile ilişkilendirilmiş ve enkapsülasyon işleminin antioksidan özelliği arttırdığı rapor edilmiştir [158]. Çalışmamızda da benzer olarak kuersetinin termal stabilitesi yüksek bulunmuş ve kitosan ile enkapsüle edildiğinde antioksidan özelliğinin arttığı gözlenmiştir. Yapılan çalışma bu yönü ile literatür verilerini desteklemektedir.

3.4.2. Çevresel Koşullara Maruz Bırakılmış Oleuropein ve Oleuropein Mikrokapsüllerin Antioksidan Etkinliği

Zeytin yaprağında bol miktarda bulunan oleuropein fitokimyasalının gıda ürünlerinde kullanıldığında sıcaklık ve oksidasyon gibi çevresel unsurlar altında değişimi incelenmiştir. Oleuropein fitokimyasalını çevresel koşullardan koruyabilmek amacıyla enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiş, belirli çevresel koşullar altında enkapsülasyon işleminin koruyuculuğu araştırılmıştır. Bu amaçla hava koşulları ile oksidasyon ve genel olarak gıdaların pişmesi için uygulanan 180°C sıcaklık uygulanmıştır.

Tablo 3.5: Çevresel koşullara maruz bırakılmış oleuropeinin antioksidan etkinliği

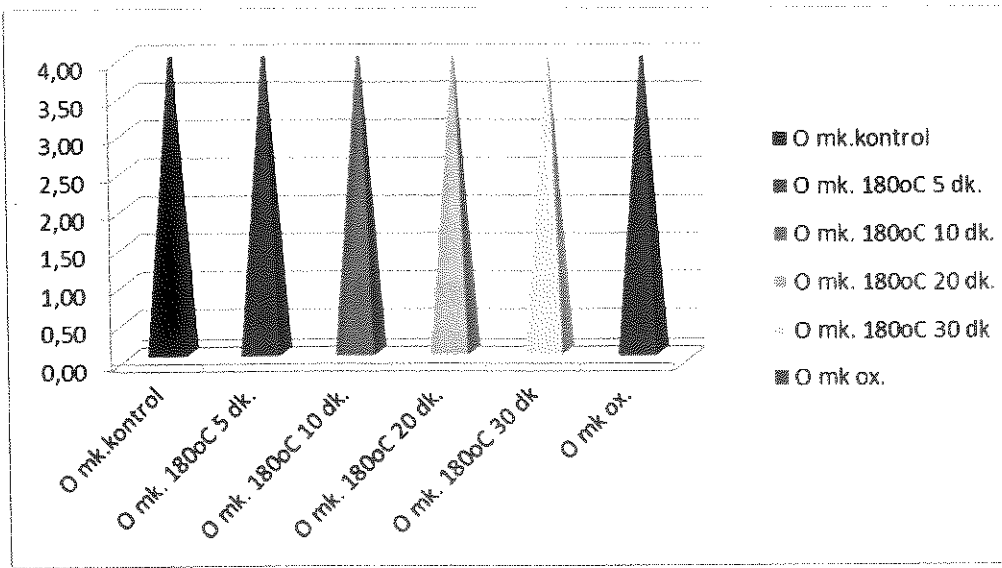
Örnek	TEAC (mM)
İşlem Görmemiş Oleuropein	3,7076
5 dk Isıl İşlem Görmüş Oleuropein	3,304
10 dk Isıl İşlem Görmüş Oleuropein	2,4203
20 dk Isıl İşlem Görmüş Oleuropein	2,4203
30 dk Isıl İşlem Görmüş Oleuropein	1,4263
Oksidasyon Uygulanmış Oleuropein	2,8811



Şekil 3.36: Isı ve oksidasyon uygulanmış oleuropeinin TEAC(mM) grafiği

Tablo 3.6: Çevresel koşullara maruz bırakılmış oleuropein mikrokapsüllerin antioksidan etkinliği

Örnek	TEAC (mM)
İşlem Görmemiş Oleuropein mk.	4,308
5 dk Isıl İşlem Görmüş Oleuropein mk.	4,298
10 dk Isıl İşlem Görmüş Oleuropein mk.	4,31
20 dk Isıl İşlem Görmüş Oleuropein mk.	4,3201
30 dk Isıl İşlem Görmüş Oleuropein mk.	4,324
Oksidasyon Uygulanmış Oleuropein mk.	4,3



Şekil 3.37: Isı ve oksidasyon uygulanmış oleuropein mikrokapsüllerin TEAC(mM) grafiği

Stamatopoulos ve Katsoyannos (2014) zeytin yapraklarından ekstrakte edilen oleuropein ve diğer fenolik bileşiklerin termal stabilitesini araştırmıştır. Oleuropeinin 80°C'den sonra bozulduğu, antioksidan etkinliğinin azaldığı gözlenmiştir [106]. Çalışmamızda uygulanan 180°C sıcaklık ile oleuropein miktarının başlangıçta 3,707 TEAC iken yarım saatlik uygulama sonunda 1,4263 TEAC değerine gerilediği gözlenmiştir. Elde edilen bu veriler, literatür çalışmalarını desteklemektedir. Yine aynı

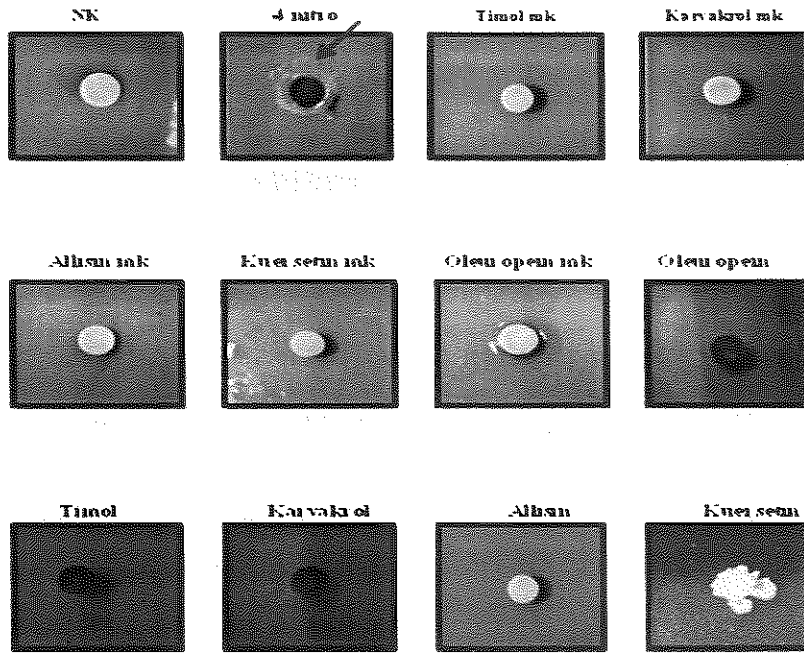
çalışmada yüzey aktif faz ile sıkıştırıldığında ise antioksidan etkinliğinin korunduğu gözlenmiştir. Literatürde yapılan polifenol enkapsülasyon çalışmaları da benzer şekilde enkapsülasyon işleminin etken maddenin etkinliğini koruduğu rapor edilmiştir [75].

Tez çalışmasında gerçekleştirilen, kuersetin ve oleuropein fitokimyasallarının kitosan ile mikroenkapsülasyonu sonucu antioksidan etkinliğin değişiminin araştırılmıştır. Her iki örnekte de antioksidan özelliklerin yükseldiği gözlenmiştir. Oleuropeinin termal stabilitesi oldukça düşük bulunmasına rağmen, enkapsülasyon işlemi sonrası antioksidan etkinliğinin korunduğu gözlenmiştir. Bu veriler, enkapsüle edilmemiş formu ile gıda ürünlerinde sıcaklık ile kısa sürede degrade olabilecek oleuropeinin enkapsüle edilerek fonksiyonel gıdalarda kullanılabileceğini düşündürmektedir.

3.5. Fitokimyasal İçeren Mikrokapsüllerin Ames Mutajenite Analizleri

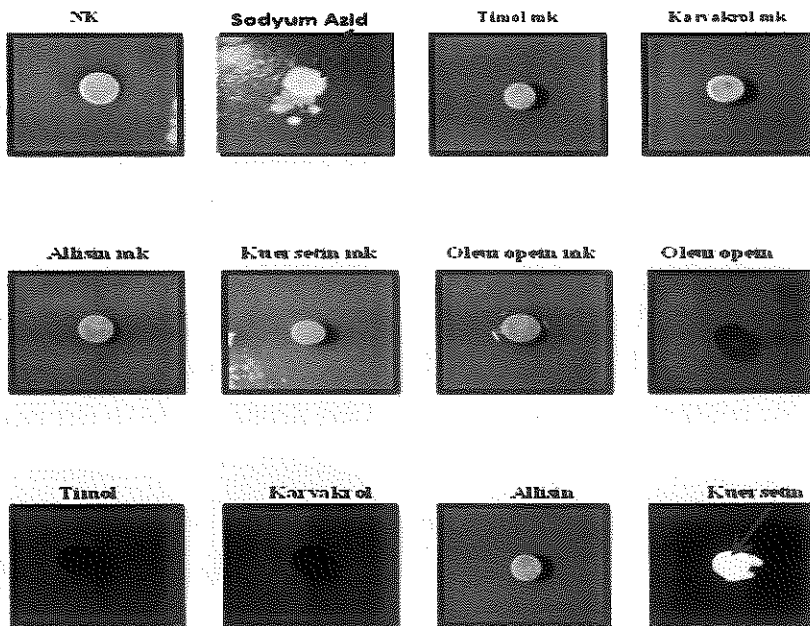
Zararlı gıda katkı maddelerinin yerini alabilecek doğal moleküllerin çevresel koşullar altında aktivitelerini korumak amacıyla mikroenkapsülasyon işlemi uygulanması ve bu işlemin koruyucuğunun araştırılmasını hedefleyen çalışmamızda, kullanılan fitokimyasal ve fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin mutajenik etkilerini test edebilmek amacıyla Ames testi uygulanmıştır.

3.5.1. *S. Typhimurium* TA 98 Sonuçları



Şekil 3.38: Fitokimyasallar ve fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin Ames testi *S. Typhimurium* 98 görselleri

3.5.2. *S. Typhimurium* TA 100 Sonuçları



Şekil 3.39: Fitokimyasallar ve fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin Ames testi *S. Typhimurium* TA 100 görselleri

Fitokimyasallar ve fitokimyasal yüklü mikrokapsüllerin gıda ürünlerinde kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla mutajenik özellikleri *S. Typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşları ile incelenmiştir. *S. Typhimurium* TA 98 suşu ile yapılan çalışmada kontrol grubu olarak 4-nitro-o-fenilendiamin (NPD) kullanılmış ve üreme gözlenmiştir. Diğer deney gruplarında ise tez çalışmasında kullanılan en yüksek doz olan 2000 ppm dozunda denemeler gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır.

Darsanaki ve Pahlaviani (2012) sulu zeytin yaprağı ekstraktının anti mutajenik aktivitesi *S. Typhimurium* TA 100 suşu kullanılarak araştırmış, kontrol grubu olarak NPD ve sodyum azid kullanılmıştır. Çalışma sonucunda zeytin yaprağı sulu ekstraktının *S. Typhimurium* TA 100 suşunun üremesine etki etmediği, dolayısı ile baz değişimi mutasyonuna sebep olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca NPD ve sodyum azid varlığında kullanıldığında, bu mutajenik maddelerin mutajenik etkinliğini azaltarak anti-mutajenik etki yarattığı da raporlanmıştır [159]. Çalışmamızda da benzer olarak zeytin yaprağında bol miktarda bulunan oleuropeinin mutajenitesi *S. Typhimurium* TA 98 ve *S. Typhimurium* TA 100 suşları ile test edilmiş ve 2000 ppm oleuropein emdirilmiş disklerin etrafında bakteriyel üremeye rastlanmamıştır.

İpek ve Zeytinoğlu (2005) kekik yağı ve içeriğindeki aktif moleküllerin anti-mutajenik aktivitesini araştırmıştır. Anti-mutajenik aktivitenin tayini için *S. Typhimurium* TA 98 ve *S. Typhimurium* TA 100 suşları kullanılmış, S9 enzimi varlığı ve enzim olmadan etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada kekik yağının ana komponenti karvakrol bulunmuştur (%74). Yapılan çalışmada kekik yağı, karvakrol ve timolün mutajenik etki göstermediği, kekik yağının 1 µl/ml dozunda mutajenik maddelere karşı anti-mutajenik etki gösterdiği raporlanmıştır. Kekik yağının anti-mutajenik etkinliğinin karvakrolden kaynaklandığı vurgulanmıştır [160]. Çalışmamızda da benzer olarak kekik yağının temel bileşenlerinden olan karvakrol ve timolün mutajenitesi *S. Typhimurium* TA 98 ve *S. Typhimurium* TA 100 suşları ile test edilmiş ve 2000 ppm karvakrol ve timol emdirilmiş disklerin etrafında bakteriyel üremeye rastlanmamıştır.

Resende ve Vilegas (2012) flavonoidlerin mutajenitelerini S9 ilaveli ve ilavesiz Ames testi ile araştırmış, bu çalışma için *S. Typhimurium* TA 98, *S. Typhimurium* TA 100 ve *S. Typhimurium* TA 102 suşlarından yararlanmıştır. Kuersetin, kaemferol, luteolin, fisetin, krisin, galangin, flavon, 3- hidroksiflavon, 5-hidroksiflavon ve 7-hidroksiflavonun mutajenitesinin araştırıldığı çalışmada kuersetin *S. Typhimurium* TA 98, *S. Typhimurium* TA 100 ve *S. Typhimurium* TA 102 suşlarına karşı yüksek mutajenite göstermiştir. Mutajenitenin S9 enzimi varığında arttığı, dolayısıyla vücut içinde daha mutajen olduğu gözlenmiştir [161]. Çalışmamızda da benzer olarak kuersetinin mutajenitesi *S. Typhimurium* TA 98 ve *S. Typhimurium* TA 100 suşları ile test edilmiş ve 2000 ppm karvakrol ve timol emdirilmiş disklerin etrafında bakteriyel üreme gözlenmiştir.

Knasmller ve Martin (1989) sarımsak ekstraktlarının antimutajenik aktivitesini *S. Typhimurium* TA 98, *S. Typhimurium* TA 100 ve *S. Typhimurium* TA 102 suşlarını kullanarak araştırmış, *S. Typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarında mutajenik etkiye rastlanmamıştır [162]. Çalışmamızda da benzer olarak kuersetinin mutajenitesi *S. Typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile test edilmiş ve 2000 ppm karvakrol ve timol emdirilmiş disklerin etrafında bakteriyel üreme gözlenmemiştir.

Nam, Choi ve Shon (2001) kimyasal mutajenlere karşı chitosanın antimutagenik aktivitesini Rec, Ames ve Umu testleri ile araştırmıştır. 0.01, 0.1 ve 1 mg/petri dozlarında kitosanın +- nitrokinolin N-oksit (NQO) kimyasalının *B. subtilis* zerindeki mutajenitesini azalttığı Rec- yöntemi ile tespit edilmiştir. Umu ve Ames testi ile de 1 mg/petri dozunda mutajeniteyi %50 oranında azalttığı rapor edilmiştir [163]. Yaptığımız çalışmada literatür bulgularına paralel olarak, mutagenik etki gösteren kuersetinin kitosan ile mikroenkapsüle edildikten sonra mutajenik etki göstermediği gözlenmiştir. Mutajenik etki gözlenmeyen allisin, karvakrol, timol ve oleuropein ise etkinliğini korumuş ve enkapsüle edildikten sonra da mutajenite göstermemiştir.

4- SONUÇLAR

Günümüzde gıda maddelerinin raf ömrünü uzatmak, mikroorganizmalardan koruyabilmek ve bozulmasını engelleyebilmek amacıyla bir takım koruyucu gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Yapılan alışmalar ile kullanılan bu koruyucu gıda katkı

maddelerinin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olduğu gözlenmiştir. Günümüzde kullanılan insan sağlığına zararlı etkileri bilinen katkı maddelerinin yerine kullanılabilecek doğal koruyucuların geliştirilebilmesi amacıyla literatürde antibakteriyel etkinliği gözlenmiş allisin, timol ve karvakrol, antifungal etkinliği gözlenmiş allisin ve karvakrol, antioksidan etkinliği gözlenmiş oleuropein ve kuersetin etkileri araştırılmak üzere belirlenmiştir. Belirlenmiş bu fitokimyasalların tat, koku, çevresel koşullara karşı hassas olmaları, yaygın kullanımının önüne geçmiştir. Bu sebeple bu çalışmada belirlenen fitokimyasallar kitosan ile mikroenkapsüle edilmiş ve çevresel koşullara maruz bırakıldıklarında sahip oldukları etkinliklerdeki değişimler araştırılmıştır.

Kitosan ile mikrokapsüle edilmiş ve edilmemiş fitokimyasalların çevresel koşullar altında antibakteriyel etkinliklerinin araştırılabilmesi amacıyla *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı antibakteriyel etkinlik çalışması yapılmıştır. Çalışma sonucunda antibakteriyel etkinliği en yüksek olan fitokimyasal, sarımsakta bulunan organosülfür bileşik allisin olarak bulunmuştur. Allisin, çok etkili bir fitokimyasal olmasına rağmen gerek kokusundan gerekse sıcaklık ile hızlıca denatüre olmasından dolayı yüksek verimlilikte kullanılamamaktadır. Enkapsülasyon işlemi sonrası allisinin istenmeyen kokusunun maskelenemediği gözlenmiştir. Ancak gıdalara katılması sonucu gıdanın organoleptik özelliklerine etkisinin araştırılabilmesi için kontrolden farklılık, üçgen test (TS ISO 4120:2004, İngiliz Standardı) ve tüketici beğeni testlerinin yapılması gerektiği düşünölmektedir. Antibakteriyel etkinlik testlerinde kullanılan karvakrol, timol ve allisinin enkapsüle edilmiş formları, kaplanmamış formlarına göre daha etkili ve çevresel koşullara karşı daha dayanıklı bulunmuştur. Mikroenkapsüle edilmeden çevreel koşullara karşı dayanıklı olmayan veya duyuasal özelliklere etki ettiğinden dolayı kullanımı kısıtlı olan fitokimyasalların mikrokapsülasyon ile kullanımına olanak sağlandığı düşünölmektedir.

Kitosan ile mikrokapsüle edilmiş ve edilmemiş fitokimyasalların çevresel koşullar altında antifungal etkinliklerinin araştırılabilmesi amacıyla *Aspergillus sp.* ve *Penicillium sp.* mikrofunguslarına karşı antifungal etkinlik çalışması yapılmıştır. Her iki fitokimyasalın da enkapsüle edilmiş formları kaplanmamış formlarına göre daha etkili ve çevresel koşullara karşı daha dayanıklı bulunmuştur. Gıdalarda raf ömrünü etkileyen en önemli etkenlerden birisi olan küflenmeye karşı allisin ve karvakrol mikrokapsüllerin

oldukça etkili olduğu ve günümüzde sıkça kullanılan potasyum sorbata alternatif olarak kullanılabileceği düşünölmektedir. Oleuropein mikrokapsöllerin ise sahip oldukları antioksidan etkinlik sebebi ile gıdalarda antioksidan olarak veya fonksiyonel gıda üretiminde güvenle kullanılabileceği öngörülmektedir.

Çalışma sonucunda elde edilen çevresel koşullara karşı hassasiyet gösteren allisin, kuersetin, oleuropein, karvakrol ve timolün enkapsüle edilerek sadece gıda sektörü değil; ilaç, kozmetik, tekstil ve kozmetik gibi farklı sektörlerde güçlü antioksidan/antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılabileceği düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Sağlam, Ö. F., (2004), Türk Gıda Mevzuatı.
- [2] Altuğ, T., (2001) Gıda Katkı Maddeleri, Meta Basım, İzmir.
- [3] Rivera, P. M., (2007) Assembly Standing Committee On Mental Health, Mental Retardation And Developmental Disabilities, Food additives and behavioral disorders, NYC.
- [4] Yumuturuğ, S. S., (1980) Besin Aditifleri. Hijyen Koruyucu Hekimlik A.Ü.T.F Yayını, 391-407.
- [5] Çalışır, Z.E & Çalışkan, D., (2003), Gıda Katkı Maddeleri Ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32 (3), 207-206.
- [6] Esin, A., (1999), Gıda Katkı Maddeleri. Seminer, H.Ü.T.F., Halk Sağlığı A.D., Ankara.
- [7] Bağcı, T., (1997), Gıda Katkı Maddeleri ve Sağlığımız Üzerine Etkileri. Hacettepe Tıp Dergisi, 28(1), 18-23.
- [8] Goodman, D., (1990), Chronic urticaria exacerbated by the antioxidant food preservatives, butylated hydroxytoluene (BHT). Journal Allergy Clinical Immunology, 86, 4.
- [9] Rayner M. ve ark., (2016), Application of Natural Polymers in Food. Springer, 115-161, İsviçre.
- [10] Soyoz M, Ozcelik N., (2002), Okratoksin A'nın toksik etkileri ve eliminasyonu. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, 22, 421.
- [11] Sabuncuoğlu SA ve ark., (2008), Mikotoksinler: Toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 28 (1), 63-92.
- [12] Eltem R ve ark., (2004), Mikotoksinler Biyoteknolojisi: Sorunlar ve Çözümler Çalıştayı Kitabı, TıbyanYayınçılık ve Matbaacılık, İzmir.
- [13] http://www.tarimmerkezi.com/haber_detay.php?hid=38220, 2012.
- [14] Tripathi P, Dubey NK., (2004), Exploitation of natural products as an alternative

strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Postharvest Biology Technology, 32 (6), 235-45.

[15] Norman C., (1988), EPA Sets New Policy on Pesticide. Cancer Risk. Science, 242 (7), 366-7.

[16] Benli M., (2003), Hasat sonrası fungal hastalıklarla kimyasal ve biyolojik mücadele. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 01 (08), 1-25.

[17] <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/name/allicin>

[18] Cavallito, C. J., & Bailey, J. H., (1944), Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* L. Isolation, physical properties and antibacterial action. Journal of the American Chemical Society, 66, 1950-1951.

[19] Omar, S. & Al-Wabel, N., (2010), Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. Saudi Pharmaceutical Journal, 18, 51-58.

[20] Pruthi, J. S., (1980), Natural Antimicrobials from Plants. Spices and Condiments Chemistry, Microbiology ,Technology. Academic Press, San Fransisco. 343.

[21] Block, E. ve ark., (1992), Allium Chemistry: HPLC Anaysis of Thiosulfinates from Onion, Garlic, Wild garlic (Ramsoms), Leek, Scallion, Shallot, Elephant Garlic, Chieve and Chinese Chieve. Uniquely High Allyl Methyl Raios in Some Garlic Samples. Journal of Agricultural Food Chemistry 40, 2418-2430.

[22] Yu, T. H. ve ark., (1989), Volatile Compounds from Garlic. Journal of Agricultural and Food Chemistry 37, 725-730.

[23] Lawson, L. D., Hughes B. G., (1991) Characterization of the Formation of Allicin and Other Thiosulfinates from Garlic. Planta Medica 58, 345-350.

[24] Ankri, S. ve Mirelman, D., (1999), Antimicrobial Properties of Allicin from Garlic. Microbes and Infection 2, 125-129.

[25] Topal, Ş., (1989), Sarmısak ve Soğanın Antimikrobiyal Etkileri Üzerinde Araştırmalar. I. Uluslararası Gıda Sempozyumu, 4-6 Nisan, Bursa, 450-462 s.

[26] Johnson, M. G. & R. H. Vaughn, (1969), Death of *Salmonella Typhimurium* *Escherichia coli* in the presence of Freshly reconstituted Dehydrated Garlic and Onion. Applied Microbiology 17, 903-905.

- [27] Al-Delaimy, K. S. & S. H. Ali, (1970), Antibacterial Action Of Vegetable Extracts On The Growth Of Pathogenic Bacteria. *Journal Of Science Food Agricultural* 21, 110-112.
- [28] Saleem, Z. M. Ve K. S. Al-Delaimy, (1984), Inhibition Of *Bacillus Cereus* By Garlic Extract. *Journal Of Food Protection* 45, 1007-1009.
- [29] Elnima, E. I. ve ark., (1983), The Antimicrobial Activity Of Garlic And Onion Extracts. *Pharmazie* 38, 747-748.
- [30] Elsom, G. K, ve ark., (2003), Antibacterial And Anticandidal Effect Of Aqueous Extract Of Garlic On The Growth Of Mixed Cultures and the Anticandidal and Platelet Activity of Commercial Preparations of Garlic. *Microbial Ecology in Health and Disease* 15, 193-199.
- [31] Leuschner, R.G. K. Ve J. Zamparini, (2002), Effects Of Spices On Growth And Survival Of *Escherichia coli* 0157:H7 And *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis In Broth Model Systems And Mayonnaise. *Food Control* 13, 399-404.
- [32] Pérez-Köhler, B. ve ark., (2015), Preclinical Bioassay of a polypropylene mesh for hernia repair pretreated with antibacterial solutions of chlorhexidine and allicin: An In Vivo Study. *PloS one*, 10, e0142768.
- [33] Banerjee, M., Sarkar, P. K., (2003), Inhibitory Effect Of Garlic On Bacterial Pathogens From Spices. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology* 19, 565-569.
- [34] Pérez-Köhler, B. ve ark., (2015), Inhibition of *Staphylococcus aureus* adhesion to the surface of a reticular heavyweight polypropylene mesh soaked in a combination of chlorhexidine and allicin: an in vitro study. *PLoS One*.10(5), e0126711.
- [35] Kim, Y.S. ve ark., (2012), Quantitative and qualitative analysis of the antifungal activity of allicin alone and in combination with antifungal drugs. *PLoS One* 7(6), e38242.
- [36] Lihua, L. ve ark., (2013), Effects of allicin on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and the production of quorum-sensing controlled virulence factors. *Polish Journal of Microbiology*, 62, 243-251.

- [37] Lee, Y. ve ark., (2003), Antibacterial Activity of Vegetables and Juices. Nutrition 19, 994-996.
- [38] Appleton, J., Tansey M., (1975) Inhibition of Growth of Zoopathogenic Fungi by Garlic Extract. Mycologia 67, 882-885.
- [39] Shuford, J. A., Steckelberg, J. M., (2005), Effects of fresh garlic extract on *Candida albicans* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 473-473.
- [40] Harris, J. C., S. L. Cotrell, S. Plummer Ve D. Lloyd. 2001. Antimicrobial Properties of *Allium sativum* (garlic). Applied Microbiological Biotechnology 57, 282-286.
- [41] Arora, S.D., Kaur, J., (1999), Antimicrobial activity of Spices. Journal of Antimicrobial Agents 12, 257- 262.
- [42] Naganawa, R. Ve ark.,(1996), Inhibition of Microbial Growth by Ajoene, a Sulfur Containing Compound Derived from Garlic. Applied and Enviromental Microbiology, 62 (11): 4238-4242.
- [43] Moore, G. S. Ve R. D. Atkins. 1977. The Fungicidal and Fungistatic Effects of Aqueous Garlic Extract on Medically Important Yeast-Like Fungi. Mycologia 69, 341-348.
- [44] Yoshida, S. ve ark., (1987), Antifungal Activity of Ajoene Derived from Garlic. Applied and Enviromental Microbiology, 53 (3): 615-617.
- [45] Wei, L. S. ve ark., (1967), Overcoming the Bacteriostatic Activity of Onion in Making Standard Plate Counts. Journal of Food Science 32, 346-349.
- [46] Graham, H. D., Graham E. J. F.,(1986), Inhibition of *Aspergillus parasiticus* Growth and Toxin Production by Garlic. Journal of Food Safety 8, 101-108.
- [47] Hafez, S. I. I. A., Said, H. M. E., (1997), Effect of Garlic, Onion and Sodium Benzoate on the Mycoflora of Pepper, Cinnamon and Rosemary in Egypt. International Biodeterioration and Biodegradation 39, (1): 67-77.
- [48] Holt, D.L., Almonte, N. A., (1995), A research note:Antimycotic Activity of Garlic Extracts and Extract Fractions *in vitro* and Plant. Journal of Food Protection 58, 322-325.

- [49] Conner, D. E., Beuchat, L. R., (1984) Effects of Essential Oils from Plants on Growth of Food Spoilage Yeasts. *Journal of Food Science* 49, 429-434
- [50] Aureli, P. ve ark., (1992), Antibacterial Activity of Some Plant Essential Oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55, 344-348.
- [51] Fujisawa H. ve ark, (2008), Thermostability of Allicin Determined by Chemical and Biological Assays. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 72(11),2877-83.
- [52] Volpi, N., ve arkadaşları, (2006), Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 354-361.
- [53] Hakkinen, S., ve arkadaşları, (1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries, *Food Research International*, 345-353.
- [54] Sultana, B., Anwar, F., (2008), Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants, *Food Chemistry*, 879-884.
- [55] Hakkinen, S., Auriola, S., (1998), High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries, *J. Chromat. A*, 91- 100.
- [56]] H., Hakkinen, S., A., Törrönen, R., (2000), Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique, *Food Research International*, 517-524.
- [57] Zhang, J., ve arkadaşları, (2005), Quantitative and qualitative analysis of flavonoids in leaves of *Adinandra nitida* by high performance liquid chromatography with UV and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection, *Anal. Chim. Acta*, 97-104.
- [58] Bonaccorsi, P., (2008), Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS, *Food Chemistry*, 1668-1673
- [59] D'Andrea, G., (2015), Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?, *Fitoterapia*, Accepted Manuscript.
- [60] Boots AW ve ark., (2008), *In vitro* and *ex vivo* anti-inflammatory activity of

quercetin in healthy volunteers. *Nutrition*, 24(7), 703-710.

[61] Begum AN, Terao J., (2002), Protective effect of quercetin against cigarette tar extract-induced impairment of erythrocyte deformability. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13(5), 265-272.

[62] Imlay JA., (2003), Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 395-418.

[63] Brunmark, A., Cadenas, E., (1998), Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(4), 435-477.

[64] Winterbourn, C.C., Kettle, A.J., (2003), Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochemical and biophysical research communications*, 305(3), 729-736.

[65] Vanacker, S.A. ve ark., (1995), Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochemical and biophysical Research communications*, 214(3), 755-759.

[66] Haenen, G.R., Bast, A., (1999), Nitric oxide radical scavenging of flavonoids. *Methods in enzymology*, 301, 490-503.

[67] López-López, G., Moreno, L., Cogolludo, A., (2004), Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Molecular Pharmacology*, 65(4), 851-859.

[68] Ertuğ, P.U. ve ark., (2010), Protective effect of quercetin, a polyphenolic compound, on mouse corpus cavernosum. *Fundamental & clinical pharmacology*, 24(2), 223-232.

[69] Robak, J., Gryglewski, R.J., (1998), Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical pharmacology*, 37(5), 837-841.

[70] Nègre-Salvayre, A., Salvayre, R., (2000), Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(2), 101-106.

[71] Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N., (2011), Antioxidant and prooxidant

properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.

[72] Hollman, PCH. ve ark, (1995), Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1276-1282.

[73] Sakanashi, Y ve ark., (2008), Possible use of quercetin, an antioxidant, for protection of cells suffering from overload of intracellular Ca^{2+} : a model experiment. *Life Sciences*, 83, 164-169.

[74] Young, IS., McEneny, J., (2001), Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29, 358-362.

[75] Fang, Z., Bhandari, B., (2010), Encapsulation of polyphenols- a review, *Trends in Food Science & Technology* 21, 510-523.

[76] Tanker, M., Tanker, N., (1990), *Farmakognozi*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları 65 (2).

[77] Azırak, S., (2007) Thymol ve carvacrol'un *In vivo* Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 121, Adana.

[78] Eftekhari, F. ve ark., (2009), Antibacterial activity and essential oil composition of *Satureja spicigera* from Iran. *Z Naturforsch*, 64(1-2), 4-20.

[79] Sokovic, M. ve ark., (2010), Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15 (11), 7532-7546.

[80] Dadaloğlu, I., Evrendilek, G.A., (2004) Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula Stoechas* L.) and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8255-8260.

[81] Zivanovic, Z, Chi, S, Draughon, A.F., (2005), Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. *Journal of Food Science*, 70, 45-51.

[82] Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., 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.

- [83] Helander, I. M. ve ark., (1998), Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590–3595.
- [84] Tippayatum, P., Chonhenchob, V., (2007) Antibacterial Activities of Thymol, Eugenol and Nisin Against Some Food Spoilage Bacteria. *Kasetsart J. Nat.*
- [85] Jeong, S. ve ark., (2007), Chemical composition and antibacterial activities of the essential oil from *Abies koreana*. *Phytotherapy Research* Volume 21 Issue 12, Pages 1246– 1250.
- [86] Sokolic-Mihalak, D. Ve ark., (2012), The effects of wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oil components against ochratoxin-producing aspergilli. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 63(4).
- [87] Carmo, E. S. ve ark., (2008), The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 362-367.
- [88] Guimarães, A.G. ve ark., (2015), Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with b-cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. *Chemico-Biological Interactions*, 227, 69–76.
- [89] Malik, N.S.A., Bradford, J.M., (2006), Changes in Oleuropein Levels During Differentiation and Development of Floral Buds in ‘Arbequina’ Olives. *Scientia Horticultureae*, 110, 274-278.
- [90] Japon-Lujan, R., Luque-Rodriguez, J.M., Luque De Castro, M.D., (2006), Dynamic Ultrasound-Assisted Extraction of Oleuropein and Related Biophenols from Olive Leaves. *Journal of Chromatography A*, 1108, 76-82. [91]
- [92] Bouaziz, M. ve ark. (2008). Effect of Storage on Refined and Husk Olive Oils Composition: Stabilization by Addition of Natural Antioxdants from Chemlali Olive Leaves. *Food Chemistry*, 108, 253-262.
- [93] Yıldız, G., Uylaşer, V., (2010), Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein. *U. Ü.*
- [94] Panizzi, L., ve ark., (1960), Chemical structure of oleuropein, bitter glucoside of

olive with hypotensive activity. Gazz. Chim. Ital., 90, 1449-1485.

[95] Fleming, H.P., W.M.J.R. ve ark., (1973), Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. Appl. Micro., 26(5), 777-782.

[96] Brenes, M., DeCastro, A., (1998), Transformation of Oleuropein and Its Hydrolysis Products During Spanish-style Green Olive Processing. J. Sci. Food Agric., 77:353-358.

[97] Marsillo, V., B. Lanza., (1998), Characterisation of an Oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. J. Sci. Food Agric., 76, 520-524.

[98] Visioli, F., S. ve ark., (1998), Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. Life Sci., 62, 541-546.

[99] Owen, R.W. ve ark., (2000), Phenolic Compounds and Squalene in Olive Oils: The Concentration and Antioxidant Potential of Total Phenols, Simple Phenols, Secoiridoids, Lignans and Squalene. Food and Chemical Toxicology, 38(2000), 647-659.

[100] Visioli, F. Ve ark., (2002), Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. Med. Res. Rev., 22, 65-75. Leaves. Industrial Crops and Products, 29, 412-419.

[101] Carluccio, M.A. ve ark., (2003), Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals. Arterioscler Thromb. Vasc. Biol., 23, 622-629.

[102] Micol, V. Ve ark., (2005), The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). Antivir. Res., 66:129-136.

[103] Gikas, E., F.N. Bazoti and A. Tsarbopoulos, (2007), Conformation of Oleuropein, the major bioactive compound of *Olea europea*. J. Mol. Struct. Theochem., 821, 125-132.

[104] Gikas, E., Fotini, N., Bazoti, F.N., Tsarbopoulos, A., (2007), Conformation of Oleuropein, the Major Bioactive Compound of *Olea Europaea*. Journal of Molecular

Structure, 821, 125-132.

[105] Al-Azzawie H.F., Alhamdani M.S., (2006), Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci*, 78(12), 1371-7.

[106] Stamatopoulos, K. ve ark., (2014), Antioxidant Activity and Thermal Stability of Oleuropein and Related Phenolic Compounds of Olive Leaf Extract after Separation and Concentration by Salting-Out-Assisted Cloud Point Extraction, *Antioxidants* 2014, 3, 229-244.

[107] Dutta ve ark., (2004), Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 20- 31.

[108] Jiang L., (2011) Comparison Of Disk Diffusion, Agar Dilution, and Broth Microdilution for Antimicrobial Susceptibility Testing Of Five Chitosans, (Ms Thesis), Louisiana State University China.

[109] <http://tgs.freshpatents.com/Chitosan-bx1.php>, 2013.

[110] Rao, M.S. ve ark., (2005- 2006) What makes radiation processed chitosan a novel food preservative, *Times Food Processing Journal*.

[111] Demir, A., Seventekin, N., (2009), Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2 (3), 92-103.

[112] Goy, R.C., Britto, D., Assis, OBG., (2009), A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan, *Ciência e Tecnologia*, 19, 241-47.

[113] Kumirska, JX., (2011) Biomedical Activity of Chitin/Chitosan Based Materials—Influence of Physicochemical Properties Apart from Molecular Weight and Degree of N-Acetylation, *Polymers*, 3, 1875-1901.

[114] Xie, H., (2011), Preparation of Low Molecular Weight Chitosan by Complex Enzymes Hydrolysis. *International Journal of Chemistry*, 3:180-6.

[115] Lee, D.W. ve ark., (2004), Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 58, 371-377.

[116] Lopez-Leon, T. Ve ark. (2005), Physicochemical Characterization of Chitosan Nanoparticles: Electrokinetic and Stability Behavior. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283, 344-351.

- [117] Janes, K.A. ve ark., (2001), Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 83- 97.
- [118] Qi, L. ve ark., (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693-2700.
- [119] Zheng, L.H., Zhu J.F., (2003), Study on Antimicrobial Activity of Chitosan with Different Molecular Weights. *Carbohydrate Polymers*, 54, 527- 530.
- [120] Helander, I.M., Nirmiaho, L., Ahvenainen S., (2001), Chitosan Disrupts The Barrier Properties of The Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 71, 235-244.
- [121] Liu, X.D., Nishi N., Tokura S., Sakairi N., 2001, "Chitosan Coated Cotton Fiber: Preparation and Physical Properties", *Carbohydrate Polymers*, 44, 233-238.
- [122] Xiao, F.L. ve ark., (2001), Antimicrobial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan", *Journal of Applied Polymer Science*, 29, 1324-1335.
- [123] Liu, H. ve ark., (2004), Chitosan kills bacteria through cell-membrane damage. *International Journal of Microbiology*, 95, 147- 155.
- [124] Sudardshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D., (1992), Antibacterial action of Chitosan. *Food Biotechnology*, 6 (3), 257-272.
- [125] Tsaih, M.L. ve ark., (2008) Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticle. *Carbohydrate Polymers*, 71, 448-457.
- [126] M. Nic ve ark., (1997), Definition of electro kinetic potential in "IUPAC. Compendium of Chemical Terminology", 2. baskı (the "Gold Book"), Oxford.
- [127] Chen, C.S. ve ark., (1998), Antimicrobial effect and physical properties of sulfonbenzoyl chitosan. *Advances in Chitin Science*, 3, 278-282.
- [128] Fang, S.W., Li, C.F., Shih, D.Y.C., (1994), Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *Journal of Food Protection*, 56 (2), pp.136-140.
- [129] Dixon, R.A. ve ark., (1994), Early events in the activation of plant defence

responses, *Ann. Rev. Phytopathol.* 32 479–501.

[130] Young, D.H. ve ark., (1982), Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells, *Plant Physiol.* 70, 1449–1554.

[131] Hagendoorn, M.J.M., ve ark., (1991), Effects of elicitors on the plasma membrane of *Petunia hybrida* cell suspension, *Plant Physiol.* 96 (1991) 1261–1267.

[132] Guo, Z. ve ark., (2007), Antifungal Properties of Schiff Bases of Chitosan, N-Substituted Chitosan and Quaternized Chitosan. *Carbohydrate Research*, 342, 1329–1332.

[133] Guo, Z. ve ark., (2008), The Influence of Molecular Weight of Quaternized Chitosan on Antifungal Activity. *Carbohydrate Research*, 71, 694–697.

[134] El Ghaouth, A. Ve ark., (1992) Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus Stolonifer*. *Mycol. Res.*, 96, 769–779.

[135] Juneja, V.K., ve ark., (2006), Chitosan protects cooked ground beef and turkey against *Clostridium perfringens* spores during chilling. *Journal of Food Science*, 71(6), 236–240.

[136] Kumar, S. ve ark., (2009), Inactivation of *Escherichia coli* K-12 in apple juice using combination of high-pressure homogenization and chitosan. *Journal of Food Science*, 74(1), 8–14.

[137] Durango, A.M., (2006), Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 17, 336–341.

[138] Liu, J. ve ark., (2007), Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biologic Technology*, 44, 300–306.

[139] Domaratzki, R. E., Ghanem, A., (2013), Encapsulation and release of cladribine from chitosan nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science* 128(3), 2173–2179.

[140] Kosaraju, S. L., et al. (2006), Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymer* 64(2), 163–167.

[141] Souto, E. B., ve ark., (2013), Encapsulation of Antioxidants in Gastrointestinal-

Resistant Nanoparticulate Carriers. Oxidative Stress and Nanotechnology, Springer, 37-46.

[142] Klinkesorn, U., ve ark., (2005), Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes. Journal of agricultural and Food Chemistry, 53(21), 8365-8371.

[143] Hsieh, W.C., ve ark., (2006). "Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 53(2), 209-214.

[144] Singh, D. ve ark, (2010), Optimization and characterization of gentamicin loaded chitosan microspheres for effective wound healing. Indian Journal Of Pharmaceutical Education And Research 44(2), 171-182.

[145] Zhang, Y. ve ark., (2008), Physicochemical characterization and antioxidant activity of quercetin-loaded chitosan nanoparticles. Journal of Applied Polymer Science 107(2), 891-897

[146] Sinha, V.R., ve ark., (2004), Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, International Journal of Pharmacy, 274, 1- 33.

[147] De Paz, L.E.C. ve ark., (2011), Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on *Streptococcus mutans* biofilms. Applied and environmental microbiology, 77(11), 3892-3895.

[148] Skaugrud, O., (1991). Chitosan- new biopolymer for cosmetics and drugs. Drug cosmetic Industry, 148, 24- 29.

[149] Calvo, P. ve ark., (1997), Chitosan and chitosan : ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carries for protein and vaccinez, Pharmacology Research, 14, 1431-1436

[150] Keawchaoon, L., Yoksan, R., (2011), Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces, 1;84(1), 163-71.

[151] B. Benjilali, A. ve ark., (1986), Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes Médicinales et

Phytothérapie, 20, 155–167.

[152] Apak, R., ve ark., (2004), Novel Total Antioxidant Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

[153] Maron, D. M., Ames, B. N., (1983), Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 113(3), 173-215.

[154] Wessner, D. R., ve ark., (2001), Spot-overlay Ames Test of Potential Mutagens, 22nd Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education.

[155] Gracia, I. ve ark., (2004), Thermal degradation of allicin in garlic extracts and its implication on the inhibition of the in-vitro growth of *Helicobacter pylori*. *Biotechnol Prog.*, 20(1), 32-7.

[156] Sansone, F. ve ark., (2014) Technological properties and enhancement of antifungal activity of a *Paeonia rockii* extract encapsulated in a chitosan-based matrix. *Journal of Food Engineering* 120, 260–267.

[157] Rohn, S. ve ark., (2007) Thermal Degradation of Onion Quercetin Glucosides Under Roasting Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1568-1573.

[158] Souza, M.P. ve ark., (2014), Quercetin-Loaded Lecithin/Chitosan Nanoparticles for Functional Food Applications. *Food Bioprocess Technology*, 7, 1149–1159.

[159] Darsanaki, R.K. ve ark., (2012), Antimutagenic Activity of Olive Leaf Aqueous Extract by Ames Test. *Advanced Studies in Biology*, 4 (9), 397– 405.

[160] İpek, E. ve ark., (2005), Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. *Food Chemistry*, 93, 551–556.

[161] Resende, F.A. ve ark., (2012), Mutagenicity of Flavonoids Assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test. *Molecules*, 17, 5255-5268.

[162] Knasmüller, S. ve ark., (1989), Studies on the Antimutagenic Activities of Garlic

Extract. Environmental and Molecular Mutagenesis, 13, 357-365.

[163] Nam, K., Choi, Y. Ve Shon, Y., (2001), Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide: Rec, Ames and Umu tests. Biotechnology Letters, 23 (12), 971-975.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Buse BERBER
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul / 28.10.1989
Yazışma Adresi : İcadiye Mah. Arzu Ayaktar Sok. Alpay Apt.
No: 19/1 Üsküdar/İstanbul
E-posta : buseberbernanomik@gmail.com
: buseberber@nanomik-tech.com

Yayınlar

Ulusal ve uluslar arası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi – Galanthus nivalis’in klinik örneklerden izole edilmiş suşlar üzerindeki antibakteriyal etkisinin araştırılması

19. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi- MRSA

21. Ulusal Biyoloji Kongresi- Helleborus niger’in klinik örneklerden izole edilmiş suşlar üzerindeki antibakteriyal etkisinin araştırılması

20. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi- Bahçe Bitkilerindeki Toplam Antioksidan Miktarının CUPRAC Yöntemi İle Araştırılması

20. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi- Bazı Bahçe Bitkilerinin Toplam Fenol İçeriğinin Araştırılması

20. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi- Etnobotanikte Önemli Bazı Bitkilerin DPPH Yöntemi İle Antioksidan Miktarlarının Araştırılması

MİFTO 1. Ar-Ge İnovasyon Pazarı – Zararlı Katkı Maddelerine Son

IV. Kozmetik Kimyası, Ürün Standardizasyonu Kongresi- Kitosan Nanoparçacıkların Sentezi ve Antimikrobiyal Aktivitesinin Araştırılması

IV. Kozmetik Kimyası, Ürün Standardizasyonu Kongresi- Organik Kozmetiğe Yeni Bir Yaklaşım: Kitosan Nanoparçacıklar

22. Ulusal Biyoloji Kongresi- Ultrases Uygulamasıyla Kitosan Nano/mikro Parçacık Sentezi, Antibakteriyel ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

22. Ulusal Biyoloji Kongresi -Yerli Muzun Raf Ömrünün Uzatılması Üzerine Kitosan Ve Kitosan Nano/Mikroparçacıklarının Etkisinin Araştırılması

22. Ulusal Biyoloji Kongresi -Stevia rebaudiana (Bertoni)'nın Büyümesi ve Steviol Glikozit Üretimi Üzerine Kitosan ve Kitosan Nanoparçacıkların Etkilerinin Araştırılması

22. Ulusal Biyoloji Kongresi -Kutanöz Patojenlere Karşı Kitosan Nanoparçacıkların Antibakteriyel Etkisinin Araştırılması

22. Ulusal Biyoloji Kongresi -Ultrases Uygulamasının Kitosan Nanoparçacıkların Boyut ve Zeta Potansiyeline Etkilerinin Araştırılması

1. Ulusal Mikoloji Günleri- Kuersetin ve Kitosan ile Mikroenkapsüle Edilmiş Kuersetinin *Aspergillus niger* Üzerindeki Antifungal Özelliklerinin Karşılaştırılması

1. Ulusal Mikoloji Günleri- Farklı Maya Türleri Üzerinde Kitosan Nanoparçacıkların Antifungal Etkisi

1. Ulusal Mikoloji Günleri- Çeşitli Bahçe Bitkilerinin *Candida Cinsi* Mayalar Üzerine Antifungal Etkisi

XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi- Farklı Ortam Koşullarında Kuersetin ve Kitosan ile Mikrokaplanmış Kuersetinin Gıda Kaynaklı *Fusarium sp.*'ye Karşı Antifungal Özelliklerindeki Değişimlerin İncelenmesi

XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi- Ağız Patojenleri Üzerine Kitosan ve Kitosan Nano/mikroparçacıkların Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması

MITTO II. Ar-Ge İnovasyon Pazarı- Fitokimyasalların Mikro/nanoenkapsülasyonu, Fonksiyonel Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanımlarının Araştırılması

Yeditepe Üniversitesi- II. Mikoloji Günleri Sempozyumu'15 - Biberiye Yüklü Mikrokapsüllerin Gıdalardan İzole Edilen Mikrofunguslar Üzerindeki Antifungal Etkinliğinin Araştırılması

2. İVEK İlaç ve Eczacılık Kongresi- Farklı Moleküler Ağırlıklı Kitosanlardan Elde Edilen Kitosan Nanoparçacıkların Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması
2. İVEK İlaç ve Eczacılık Kongresi- Kuersetin Mikrokapsüllerin Gıda Kaynaklı Penicillium sp.'ye Karşı Antifungal Aktivitesinin Araştırılması
2. İVEK İlaç ve Eczacılık Kongresi- Acıbiber ve Hazır Pulbiberin Antioksidan Değerlerinin CUPRAC Yöntemi ile Karşılaştırılması

Projeler, Ödüller ve Yönetim Görevleri

TÜBİTAK 2209- A 2. Dönem: Ekmek Küflenmesinin Başlıca Etkeni Olan Rhizopus stolonifer ve Rhizopus nigricans Mantarlarına Karşı Etkili Kitosan ve Kitosan Nanoparçacıkların Antifungal Özelliklerinin Araştırılması- 2011 - 1919B011202227 (Proje Yürütücüsü)- *Tamamlandı*

YFYİ (ODTÜ Yeni Fikirler Yeni İşler Girişimcilik Yarışması)-2012- NanoAntioksidan-Final

Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı – Teknogirişim Sermayesi Desteği 2013: Kitosan Nanoparçacıkların Sentezi ve Antimikrobiyal Etkinliklerinin Araştırılması- 2013 (Proje Yürütücüsü)-663- *Tamamlandı*

TÜBİTAK 2209- A 2. Dönem: Ultrases Kullanılarak Farklı Boyutlarda Elde Edilen Kitosan Nanoparçacıkların Antimikrobiyal Aktivitelerinin İncelenmesi- 2014 (Sanayi Danışmanı)- *Tamamlandı*

TÜBİTAK 1511- Fitokimyasalların Kitosan İle Mikrokapslanması, Koruyucu Ve Fonksiyonel Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması (Proje Yürütücüsü) – 1150079- *Devam ediyor*

TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı (2014-1) -Gıda Alanı- Antimikrobiyal ve Antioksidan Özelliğe Sahip Bazı Fitokimyasalların Kitosan ile Mikro/Nanoenkapsülasyonu- 1649B021404381

Marmara Üniversitesi- BAPKO- Antimikrobiyal ve Antioksidan Özelliğe Sahip Bazı Fitokimyasalların Kitosan ile Mikro/Nanoenkapsülasyonu -FEN-C-YLP-121114-0363- *Tamamlandı*

1. Ulusal Mikoloji Günleri- Sözlü Sunum Birinciliği- Kuersetin ve Kitosan ile Mikroenkapsüle Edilmiş Kuersetinin *Aspergillus niger* Üzerindeki Antifungal Özelliklerinin Karşılaştırılması

1. Ulusal Mikoloji Günleri- Poster Sunumu İkinciliği- Farklı Maya Türleri Üzerinde Kitosan Nanoparçacıkların Antifungal Etkisi

1. Ulusal Mikoloji Günleri- Poster Sunumu Dördüncülüğü- Çeşitli Bahçe Bitkilerinin *Candida* Cinsi Mayalar Üzerine Antifungal Etkisi

2014 Sabri Ülker Bilim Ödülleri- Antioksidan ve Antimikrobiyal Etkili Fitokimyasalların Mikro/Nanoenkapsülasyonu- İlk 18

Yeditepe Üniversitesi- II. Mikoloji Günleri Sempozyumu'15 - Düzenleme Kurulu

2. İVEK İlaç ve Eczacılık Kongresi Bildiri Üçüncülüğü- Kuersetin Mikrokapsüllerin Gıda Kaynaklı *Penicillium sp.*'ye Karşı Antifungal Aktivitesinin Araştırılması