

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Adamou MAMOUDOU ANZA

**SODOM ELMASI (*Calotropis procera*) YAPRAĞININ
ANTİMİKROBİYEL VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SODOM ELMASI (*Calotropis procera*) YAPRAĞININ ANTİMİKROBİYEL
VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Adamou MAMOUDOU ANZA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 04/11/2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
DANIŞMAN

.....
Doç. Dr. Asiye AKYILDIZ
ÜYE

.....
Dr. Öğr. Üyesi Emel Ünal TURHAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2018-10627**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SODOM ELMASI (*Calotropis procera*) YAPRAĞININ ANTİMİKROBİYEL
VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Adamou MAMOUDOU ANZA

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Yıl: 2019, Sayfa: 51
Jüri : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Doç. Dr. Asiye AKYILDIZ
: Dr. Öğr. Üyesi Emel ÜNAL TURHAN

Bu çalışmada, Nijer’den taze olarak temin edilen ve batı Afrika peyniri (Wagashi) üretiminde sütü pıhtılaştırmak için kullanılan *Calotropis procera* bitkisinin yapraklarının antimikrobiyel etkisi ve antioksidan aktivitesi araştırılmıştır. Bu amaçla, *Calotropis procera* yaprakları dondurularak kurutulmuş, kurutulan yapraklar öğütüldükten sonra iki farklı çözücüde (metanol ve etanol) ekstrakte edilerek kullanılmıştır. Öncelikle *Calotropis procera* bitkisinin fitokimyasal bileşimleri belirlenmiş, ardından bu bitkinin çeşitli bakteri (*Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*), maya (*Debaryomyces hansenii*, *Candida rugosa*) ve küf (*Aspergillus niger* ve *Penicillium chrysogenum*) üzerine antimikrobiyel etkisi ve antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda sodom elmasının yapraklarında kardiyak glikozitler hariç tanenlerin, saponinlerin, flavonoidlerin ve terpenoidlerin varlığı tespit edilmiş, toplam fenolik madde miktarının 7.683 ± 0.362 mg galik asit/g, toplam flavonoid madde miktarının ise 7.683 ± 0.362 mg galik asit/g olduğu belirlenmiştir. *Calotropis procera*’nın antimikrobiyel etkisinin tespiti için yapılan analizler sonucunda; bitkinin metanolik ekstraktı ile daha etkili sonuçlar elde edildiği, *Salmonella Typhi*, *Listeria innocua*, *Debaryomyces hansenii* ve *Candida rugosa*’ya karşı inhibisyon zon çaplarının sırasıyla 16.5, 17, 17.25 ve 18 mm olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca analiz sonuçlarına göre metanolik ekstraktın *Penicillium chrysogenum*’a karşı inhibe edici bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Minimum inhibisyon konsantrasyonu ise bütün bakteriler ve *Debaryomyces hansenii* için 160 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonun *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* için minimum letal konsantrasyon olduğu saptanmış ve % 43.62 olan antioksidan aktivitesinin % 10 oranında seyreltilmiş bir ekstraktan elde edildiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Calotropis procera*, sodom elması, antimikrobiyel, antioksidan aktivite

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINATION OF THE ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF THE LEAVES OF SODOM APPLE (*Calotropis procera*)

Adamou MAMOUDOU ANZA

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

Supervisor : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
Year: 2019, Pages: 51
Jury : Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA
: Assoc. Prof. Dr. Asiye AKYILDIZ
: Asst. Prof. Dr. Emel ÜNAL TURHAN

In this study, antimicrobial effect and antioxidant activity of the leaves of *Calotropis procera* plant obtained from Niger and used to coagulate milk in the production of West African cheese (Wagashi) was investigated. The leaves freshly supplied from Niger, were freeze dried. The dried leaves were ground and leaf contents were extracted using two different solvents (methanol and ethanol). Firstly, phytochemical composition and antioxidant activity of *Calotropis procera* leaves were determined. Then antimicrobial effect of this plant extracts on various bacteria (*Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*), yeasts (*Debaryomyces hansenii*, *Candida rugosa*) and molds (*Aspergillus niger* ve *Penicillium chrysogenum*) were determined. Analyses were done using SPSS (ver. 25). As a result of the analysis, the presence of tannins, saponins, flavonoids and terpenoids were detected in the leaves except cardiac glycosides. Total phenolic content was 7.683 ± 0.362 mg gallic acid/g, total flavonoid substance was 3.966 ± 0.573 mg quercetin/g and 43.62 % antioxidant activity was obtained from a 10 % diluted extract. It was found that more effective results were obtained with methanolic extract of the leaves. Inhibition zone diameters against *Salmonella Typhi*, *Listeria innocua*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida rugosa* were 16.5, 17, 17.25 and 18 mm, respectively. The highest inhibitions were found against *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* with 20, 26.25, 26.5 and 29.5 mm inhibition zone respectively, for the antimicrobial effect. In addition, it was concluded that neither ethanolic nor methanolic leaf extract of *Calotropis procera* had inhibitory effect against *Penicillium chrysogenum*. The minimum inhibitor concentration was 160 mg/mL for all bacteria and *Debaryomyces hansenii*. This concentration was found to be a lethal concentration for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*.

Keywords: *Calotropis procera*, sodom apple, antimicrobial, antioxidant activity.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Sahra'nın güneyindeki çoğu Afrika ülkesinin ekonomisi, ağırlıklı olarak tarıma dayanmaktadır. Özellikle de hayvancılık ön planda olup, et, süt, peynir, yumurta gibi çeşitli ürünler, yörede yaşayan halkın ana protein kaynağını oluşturmaktadır. Ancak, gıda güvenliği açısından bu ürünlerde önemli sorunlar yaşanmaktadır. Soğuk zincir eksikliği nedeniyle, taze süt ve süt ürünlerinde patojenik mikroorganizmalar bulunabilmekte ve ürünlerin raf ömrü kısalmaktadır.

Batı Afrika'da, yoğurt, lor gibi süt ürünlerinin yanı sıra, geleneksel olarak üretilen ve bir peynir türü olan "wagashi" bulunmaktadır. Wagashi en popüler ve en çok tüketilen süt türevi ürünüdür (Aïssi ve ark., 2009). Wagashi, özellikle düşük gelirli insanlar için önemli bir hayvansal protein kaynağıdır ve Afrika'daki diyetlerdeki protein eksikliği ile ilgili sorunların çözülmesine etkili bir şekilde katkıda bulunmaktadır (Keke ve ark., 2008). Ancak, daha önce de belirtildiği üzere, wagashi'nin de kontrolsüz koşullar altında üretimi yapıldığı için, ürünün kalitesi olumsuz etkilenmekte ve gıda güvenliği açısından da önemli riskler taşıma olasılığı bulunmaktadır (Aïssi ve ark., 2009; Philippe ve ark., 2012; Sessou ve ark., 2012).

Wagashi peyniri yapımında kullanılan, sodom elması bitkisi (*Calotropis procera*) peynir üretiminin çoğunun gerçekleştiği kuru bölgelerde yetişen bir bitkidir. Sodom elmasının bazı toksik maddeler içermesine rağmen (heterositler kardiyak oksik asit, özellikle calotropin), üretim sırasındaki ısıtma işlemi nedeniyle, peynirlerde ve peynir altı suyunda söz konusu toksik bileşikler tespit edilememiştir ve bu nedenle wagashi peyniri tüketimine bağlı gıda zehirlenmesi vakası rapor edilememiştir (Egounléty ve ark., 1994; Messessi, 2018). Sodom elması, sekonder metabolitler açısından zengin olması nedeniyle, tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Shoaib Quazi ve ark., 2013). Sodom elmasının, Nijerya'da ateş, egzama, ishal, cüzzam, saçkıran, öksürük, astım ve kasılma gibi hastalıkları tedavi etmek amacıyla, geleneksel olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Odugbemi ve ark., 2006a). Batı Afrika'daki bazı doktorların, birçok hastalığı iyileştirmek için, bu

bitkiyi geleneksel Asya tıbbi sisteminde bronşit, ağrı, astım ve tümörler için kullandıkları rapor edilmiştir (Muzammal, 2014).

Bu çalışmada, Nijer'den taze toplanan sodom elması yaprakları, bitkinin aktif bileşiklerinin korunmasına yönelik bir yöntem olan dondurarak kurutma yöntemi kullanılmıştır. Kurutulmuş yaprakların öğütülmesinden sonra, iki farklı çözücü (etanol ve metanol) kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak bitkinin antimikrobiyel özelliklerini belirlemek amacıyla, bakteri olarak *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhi*, maya olarak *Debaryomyces hansenii* ve *Candida rugosa* ve *Aspergillus niger* ve *Penicillium chrysogenum* küf kültürleri kullanılmıştır. Bu mikroorganizmalar, gıda kaynaklı ve özellikle de peynirde gıda güvenliği ve kalitesi açısından potansiyel tehlike olarak bilinen mikroorganizmalardır. Yapılan çalışma sonucunda da bitkinin metanolik ekstraktı ile daha etkili inhibisyon etkisi belirlenmiş olup, *Salmonella Typhi*, *Listeria innocua*, *Debaryomyces hansenii* ve *Candida rugosa* 'ya karşı sırasıyla 16.5, 17, 17.25 ve 18 mm'lik inhibisyon çapları elde edilmiştir. Bununla birlikte, metanolik ekstraktın *Penicillium chrysogenum*'a karşı inhibe edici bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu belirlemek amacıyla yapılan çalışmada ise 1,6 mg/mL konsantrasyonda, hiçbir inhibisyon aktivite bulunmazken, 160 mg/mL konsantrasyonda, bütün bakterilerde ve *Debaryomyces hansenii*'de inhibisyon gözlenmiştir. Ayrıca 160 mg/mL konsantrasyonun, *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* için minimum letal konsantrasyon olduğu saptanmıştır.

Sodom elmasının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerde, kardiyak glikozitler hariç tanenlerin, saponinlerin, flavonoidlerin, terpenoidlerin varlığı tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarının 7.683 ± 0.362 mg gallik asit/g ve toplam flavonoid madde miktarının 3.966 ± 0.573 mg kuersetin/g olduğu belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivitesi (% 43.62) 60 dakika sonra gözlenmiştir. Ancak, sonuçların istatistiksel analizine göre, 50. dakikada elde edilen sonuçlar ile 60. dakikadaki sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmadığı ($P=0,05$), bu antioksidan etkinin % 10 oranında seyreltilmiş bir ekstraktan elde edildiği tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Öncelikle, benim eğitim hayatım boyunca bana verdiği sağlık ve güç için Tanrı'ya teşekkür etmek istiyorum.

Bu çalışmanın sonunda, aktif olarak katkıda bulunan herkese derin teşekkürlerimi sunmak isterim. Özellikle, yüksek lisans eğitimi boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında tavsiyeleriyle beni yönlendiren ve destekliğini hiçbir zaman benden esirgemeyen kıymetli danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Zerrin ERGİNKAYA'ya;

Jüri üyesi olarak tezimi değerlendiren Doç. Dr. Asiye AKYILDIZ ve Dr. Öğr. Üyesi Emel ÜNAL TURHAN'a;

Laboratuvar çalıştırmalarımın çeşitli aşamalarında yardımcı olan, Arş. Gör. Gözde KONURAY, Dr. Arş. Gör. Süleyman POLAT, Seda Sultan YILMAZ'a,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım esnasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na ve son olarak da maddi destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Project no. FYL-2018-10627) içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Sodom elması bitkisi (<i>Calotropis procera</i>) ile ilgili yapılan çalışmalar.....	5
2.2. Fitokimyasallar	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Sodom elması (<i>Calotropis procera</i>)	11
3.1.2. Besiyerleri.....	11
3.1.3. Mikroorganizma kültürleri.....	12
3.2. Yöntem	12
3.2.1. Bitki örneklerinin hazırlanması.....	12
3.2.2. Fitokimyasal bileşenlerin belirlenmesi	13
3.2.2.1. Fitokimyasal bileşenler üzerinde kalitatif analiz	13
3.2.2.2. Fitokimyasal bileşenler üzerinde kantitatif analiz	14
3.2.2.3. Antioksidan Aktivite Tayini	16
3.2.3. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi.....	16
3.2.3.1. Bakteri kültürünün hazırlanması.....	16
3.2.3.2. Antibakteriyel etkinin belirlenmesi.....	17
3.2.4. Antifungal aktivitenin belirlenmesi	17

3.2.4.1. Küf sporunun hazırlanması	18
3.2.4.2. Maya kültürünün hazırlanması	18
3.2.4.3. Antifungal etkinin belirlenmesi	18
3.2.5. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi	19
3.2.6. İstatiksel Değerlendirme	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	21
4.1. Fitokimyasal bileşenlerin belirlenmesi	21
4.1.1. Fitokimyasal bileşenler üzerinde kalitatif analizlerin sonuçları	21
4.1.2. Fitokimyasal bileşenler üzerinde kantitatif analizlerin sonuçları.....	24
4.1.2.1. Sodom elması yaprağının toplam fenolik madde içeriği	24
4.1.2.2. Sodom elması yaprağının toplam flavonoid madde içerikleri	25
4.2. Antioksidan aktivite değerleri.....	25
4.2.1. DPPH	25
4.3. Antibakteriyel ve antifungal aktivitenin belirlenmesi.....	27
4.3.1. Sodom elması yaprağının etanolik özütün antibakteriyel ve antifungal aktivitesi.....	27
4.3.2. Sodom elması yaprağının metanolik özütün antibakteriyel ve antifungal aktivitesi.....	29
4.4. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) sonuçları	32
4.4.1. Sodom elmasının yaprağının etanolik ekstraktın MİK ve MLK sonuçları.....	32
4.4.2. Sodom elmasının yaprağının metanolik ekstraktın MİK ve MLK sonuçları.....	34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. İnhibisyon yeteneğinin değerlendirilmesi	17
Çizelge 4.1. Sodom elması yaprağının etanolik özütünün antimikrobiyel aktivitesi	28
Çizelge 4.2. Sodom elması yaprağının metanolik özütünün inhibisyon aktiviteleri.....	31
Çizelge 4.3. Sodom elması yaprağının etanolik ekstraktına ait MİK ve MLK sonuçları	33
Çizelge 4.4. Sodom elması yaprağının metanolik ekstraktına ait MİK ve MLK sonuçları	35



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Sodom elması bitkisi.....	2
Şekil 1.2. Wagashi peyniri üretimi (Dossou ve ark., 2006)	3
Şekil 3.1. Sodom elmasının yaprakları	11
Şekil 4.1. Tanenlerin varlığının tespiti.....	22
Şekil 4.2. Saponinlerin varlığının tespiti.....	22
Şekil 4.3. Flavonoidlerin varlığının tespiti.....	23
Şekil 4.4. Terpenoidlerin varlığının tespiti	24
Şekil 4.5. Sodom elması yaprağının antioksidan aktivitesi.....	26
Şekil 4.6. Sodom elması yaprağının etanolik ekstraktın etkisi	27
Şekil 4.7. Sodom elmasının metanolik ekstraktın etkisi	29
Şekil 4.8. İnhibisyon yeteneğinin değerlendirilmesi.....	32
Şekil 4.9. Sodom elması yaprağının etanolik ekstraktına ait MİK testi.....	34
Şekil 4.10. Sodom elması yaprağının metanolik ekstraktına ait MİK testi.....	36



SİMGELER VE KISALTMALAR

GIN	: Gastro intestinal nematod
GSH	: Glutathione
GSL	: Glucosinolates
UV/VIS	: Ultraviolet–visible spectroscopy
NA	: Nutrient Agar
PDA	: Potato Dextrose Agar
MIK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyon
MLK	: Minimum Letal Konsantrasyon
YEPD	: Yeast Extract Potato Dextrose
MHB	: Mueller Hilton Broth
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
Kob	: Koloni oluşturma birimi
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
DMRT	: Duncan’s Multiple Range Test
TF	: Toplam Fenolik madde
TFI	: Toplam Flavonoid madde



1. GİRİŞ

Sodom elması, *Apocynaceae* familyasına ait olup, kuzey ve tropikal Afrika, batı ve güney Asya'da yetişen *Calotropis procera* ve *Calotropis gigantea* gibi çeşitleri bulunan bir bitkidir (Şekil 1). İngilizce adları; *milk weed*, *Sodom's milkweed*, *rubber bush*, *swallow-wort*, *Dead Sea apple*'dir. Özellikle Batı Afrika'da, Fulanis Kabilesi tarafından "*bambamby*", Yorubas Kabilesi tarafından "*bomubomu*", Hausas Kabilesi tarafından ise "*tumfafa* " olarak bilinmektedir. Arapça ise "*kisher*" ve Fransızca "*pomme de sode*" denilmektedir. Bitki yıl boyunca yeşildir, içi boş yeşil kürelere sahiptir. Bitki gövdesinde deterjanlara dayanıklı yapışkan ve acı bir madde bulunmaktadır. Meyveler önce yeşil, daha sonra açık sarıya dönmekte ve olgunlaştıkça da kurumaktadır (Little ve ark., 1974). Meyvesi çok sayıda tohum içerir. Yabani koşullarda büyüyen önemli bir tıbbi bitki olup, Pakistan'da bitkinin yaprakları astım ve öksürüğü iyileştirmek için, yerel halk tarafından kullanılmaktadır (Husain ve ark., 2008).

Sodom elması, sütlü lateks üretimi ile, tropik ve subtropikal bölgelerde, 5.4 m yüksekliğe kadar büyüyen dik, uzun boylu, büyük, çok dallı bulunan yaygın bir bitki türüdür (Teixeira de Freitas ve ark., 2011; Thakkar ve ark., 2014). Bu bitki yeşil yapraklarından ve kabuklarından kolaylıkla toplanabilen büyük miktarda lateks üretir (Teixeira de Freitas ve ark., 2011). Bu türe ait lateks, Afrika ve Asya ülkelerinde geleneksel tıpta çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Al-Qarawi ve ark., 2001; Iqbal ve ark., 2005).

Lateks, 12.500'den fazla bitki tarafından üretilen süt görünümüne sahip sıvıyı tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Bu sıvı laticifers adı verilen özel hücrelerin sitoplazmasıdır (Lopes ve ark., 2009). Bunlar, kök, gövde, yaprak ve çiçekler içerisinde bulunan bir maddedir. Lateks, mekanik hasarın neden olduğu doku hasarı sonrası laticifersden salınır. Lateksler ikincil metabolizma kaynaklı kimyasalların zengin bir kaynağıdır (Hagel ve ark., 2008). Laticifer sıvıların biyokimyasal kompozisyonu üzerine bulgular, avcı (predatör) ve yayılımcı (invaziv) mikroorganizmalara karşı oldukça etkili olduğunu göstermiştir (Giordani

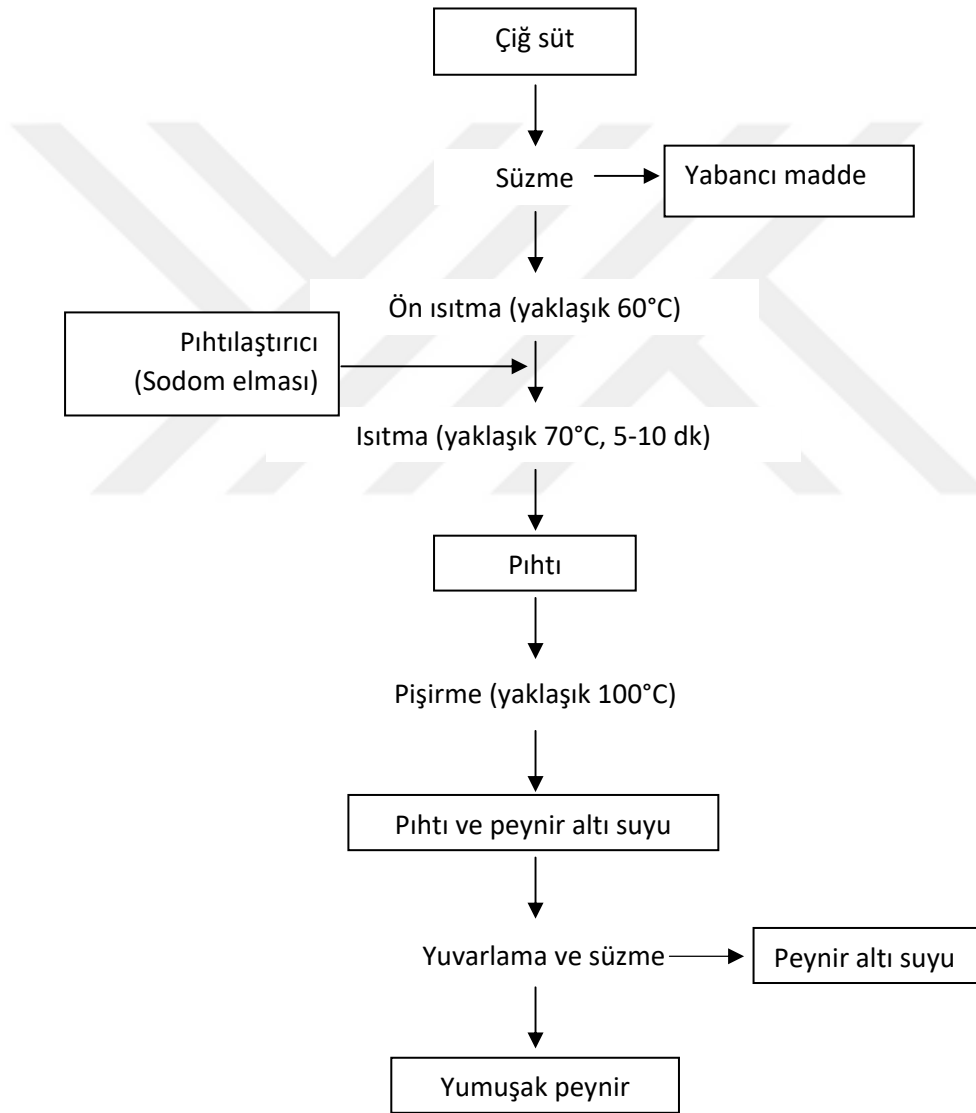
ve ark., 1991; Ramos ve ark., 2007). Lateks, mantar hastalığı, köpek ısırması sonucu oluşan yaraların tedavisinde, cilt hastalıklarını iyileştirilmesi ve bronzlaşma endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, zehirli olduğu düşünülen bahçe bitkilerinden biri olduğu da bildirilmektedir (Johnson ve ark., 2006).



Şekil 1.1. Sodom elması bitkisi

Wagashi, keçi veya inek sütlerinin fermantasyonu sonucu elde edilen yumuşak, olgunlaşmamış bir peynir türüdür (Iwuoha ve ark., 1996). Bu peynir, Fulanis Kabilesi arasında oldukça popülerdir. ‘Wagashi’, geleneksel olarak önce inek sütünün sağımı yapıldıktan sonra, sodom elması (*Calotropis procera*) bitkisinin yaprakları, tomurcukları veya sapları ile karıştırılır. Karışım, ortam sıcaklığında 12 saatten uzun süren doğal fermantasyona bırakılır. Fermente edilmiş karışım, 40-75 dakika hafifçe ısıtılarak, pıhtı oluşumu sağlanır. Daha sonra, üründe aroma geliştirme ve enzim inaktivasyonunu sağlamak amacıyla ısıtma (70°C’de, yaklaşık 10 dakika) işlemi gerçekleştirilir. Ortaya çıkan ‘wara’ kalıplara konur ve peynir altı suyunun birkaç dakika akmasına izin verilir.

Sodom elması (*Calotropis procera*) kullanılarak yapılan endüstriyel peynir üretimi ise; süte önce, 60°C’de 5-10 dakika ön ısıtma işlemi uygulandıktan sonra, sodom elması ilave edilmektedir. Şekil 1.2’de sodom elması kullanılarak üretilen Wagashi peynirinin üretimi gösterilmiştir (Aïssou ve ark., 2015; Dossou ve ark., 2006).



Şekil 1.2. Wagashi peyniri üretimi (Dossou ve ark., 2006)

Kimosin, peynir üretiminde kullanılan en önemli enzimdir, ancak lateks enzimleri de bu amaçla kullanılmaktadır (Rayanatou ve ark., 2017). Geleneksel olarak üretilen Wagashi peynirinin mikrobiyolojik kalitesinin, kullanılan koagülant türüne ve özellikle süreç boyunca yapılan işlemlere göre ve üretim özelliklerine göre değiştiği belirtilmektedir (Fashakin ve ark., 1993; Ogundiwin, 1978; Uzogara ve ark., 1990).

Geleneksel olarak fermente edilmiş ekşi süt ürünleri, Afrika'da yaygın olarak üretilmekte ve tüketilmektedir (Jans ve ark., 2017). Bu nedenle, süt ve süt ürünlerinin tüketimi özellikle Afrika'nın büyük bir kısmında insan hayatının her aşamasında önemli bir rol oynamaktadır. Süt önemli bir besin kaynağıdır, ancak özellikle çiğ süt tüketildiğinde zoonotik gıda kaynaklı hastalıkların bir aracı olabilmektedir (Larpant, 1997).

Bunların yanında küresel antibiyotik direnç krizinin ortaya çıkması nedeniyle, antibiyotik dirençliliği hızla yayılmakta ve hastalıkların antibiyotiklerle tedavi olanakları azalmaktadır. Böylece, yaygın olarak incelenen, fitokimyasallar ve metaller olmak üzere iki ana grup antibakteriyel madde olarak geleneksel antibiyotiklere alternatifler araştırılmaktadır. Bu gruplar içinde, polifenoller ve metal nanopartiküller dahil olmak üzere birçok bileşik bulunmaktadır. Bu nedenle de çalışmada, farklı bir kaynak arayışı içerisinde sodom elmasında yer alan fitokimyasalların yanı sıra antimikrobiyel özelliklerine odaklanılmıştır.

Bu çalışmada, sodom elması yapraklarından farklı çözenler (metanol ve etanol) kullanılarak elde edilen özütlerin antioksidan özellikleri incelenmiş ve bu ekstraktların bazı gıda kaynaklı ve özellikle de peynirde gıda güvenliği ve kalitesi açısından potansiyel tehlike olarak bilinen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivitesi belirlenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sodom elması bitkisi (*Calotropis procera*) ile ilgili yapılan çalışmalar

Bitkiler ve uçucu yağları, tarih öncesi çağlardan beri antimikrobiyel aktivite ile ilişkilendirilmiştir (Chang, 1995; Shelef, 1984). Bitkiler, fenoller ve türevleri gibi aromatik maddeleri sentezleyebilme yeteneği ile bulunmaktadır (Geissman, 1963). Bu sekonder metabolitlerin terapötik önemi söz konusudur. Tıbbi değere sahip bitkilerin, sağlık üzerine potansiyel yararları nedeniyle (Gomez-Flores ve ark., 2008), doğal antimikrobiyel olarak gıdalarda kullanımları ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Geleneksel olarak küçük geviş getiren hayvanlarda parazitlerin tedavisi için kullanılan tıbbi bitki türlerindendir (Cavalcante ve ark., 2016). Şifalı bitkiler, farklı ülkelerdeki küçük ruminantlarda gastrointestinal nematod (GİN) enfeksiyonlarına karşı kullanılan doğal kaynaklardan biridir ve parazitlerin kontrolü için etkili bir alternatif olarak bilinmektedir.

Salgının veya bitkinin farklı kısımları, Hint geleneksel tıp sisteminde, cüzzam, ülser, tümör ve dalak, karaciğer ve karın hastalıkları tedavisinde (Basu ve ark., 1991; Parrotta, 2001) ve Nijerya’da ise geleneksel olarak ateş, egzama, ishal, cüzzam, öksürük ve astım gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Odugbemi ve ark., 2006b). Bitkinin farklı kısımlarından yapılan çalışmalarda anti-enflamatuvar (Kumar ve ark., 1994) olarak gösterilmiştir. Bu özelliği, karragenan ve formalin kaynaklı sıçan pençesi ödem modeli üzerinde çalışılmıştır. Sonuç olarak kurutulmuş lateksin sulu süspansiyonu, akut inflamasyona karşı önemli bir seviyede etkili olmuştur.

Daha sonra, diğer çalışmalarda analjezik (Dewan, Sangraula, ve ark., 2000), antipiretik (Dewan, Kumar, ve ark., 2000), antikoagülan (Athar ve ark., 1962), antidiarhoeal (Kumar ve ark., 2001), antimikrobiyel (Srinivasan ve ark., 2001) ve antelmintik (Derasari HR ve ark., 1965) olarak gösterilmiştir.

Bitkinin farklı kısımları ile yapılan araştırmalarda, pentasiklik triterpenler içerdiği tespit edilmiştir (Ansari ve ark., 2000; Gupta ve ark., 2003; Khan ve ark., 1988; Yoganasimhan, 2011). Bitki ile yapılan diğer bazı çalışmalarda ise; kardenolitler (Agrawal, 2004; S. Quazi ve ark., 2013), fitosteroller (Chundattu ve ark., 2016; Khan ve ark., 1989; Lal ve ark., 1985), saponinler (Gupta ve ark., 2000; Shobowale ve ark., 2013), alkaloidler (Israili A ve ark., 1978; Shobowale ve ark., 2013), flavonoidler ve tanenler (Shobowale ve ark., 2013) bulunmuştur. Sodipo ve ark. (1991), tanenlerin, proteinlere etki ederek, mikroorganizmaların gelişimini önlediğini belirlemiştir. Tanenler bakımından zengin olan bitkiler doğada peklik veren bitkiler olarak bilinmekte ve birçoğu bağırsak bozukluğunun tedavisinde kullanılmaktadırlar (Mungole ve ark., 2010). Bazı bitki metabolitleri, bulaşıcı hastalıkların, kanserin veya bağışıklık sisteminin kuvvetlendirilmesine yönelik tedavilerde başarıyla kullanılmaktadır. Bitkilerin bu özellikleri, insan vücudu üzerinde etki yaratan biyoaktif fitokimyasal bileşenlerinden kaynaklanmaktadır (Akinmoladun ve ark., 2007). Bu bileşenlerden en önemlileri, alkaloidler, taninler ve fenolik bileşiklerdir (Edeoga ve ark., 2005; Okwu, 2001). Bu fitokimyasallar, bitki metabolizmasındaki işlevlerine göre, birincil ve ikincil bileşenler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Birincil bileşenler; şekerler, amino asitler, proteinler ve klorofil içerirken, ikincil bileşenler; alkaloidler, terpenoidler ve fenolik bileşiklerden oluşur (Krishnaiah ve ark., 2009). Bu bileşenler, bitkilerle ve bitki türevi bileşiklerle ilişkili olduğu bildirilen biyolojik faaliyetler ve hastalık alanına göre kategorize edilmektedirler (Butler, 2005). Bu maddelerin, antijenik aktivitelerinin yanı sıra, sinir sistemini aktive / inaktive etme ve antimikrobiyel etkileri gibi birçok özellikleri söz konusudur.

Flavonoidlerin düşük yoğunluklu lipit peroksidasyonunu önlediği ve böylece aterosklerotik plak oluşumunu, nörodejeneratif hastalıkları ve iskemik hasarı önlediği bulunmuştur (Heim ve ark., 2002; McCord, 2000; Pearce ve ark., 1991). Ayrıca serbest radikalleri yakalarlar ve serbest radikal oluşumunu teşvik edebilen bakır ve demir iyonlarını şelatlarlar. Ayrıca, kansere neden olan

maddelerin detoksifikasyonunda rol oynayan enzimleri uyarıp, iltihaplanma ve yaşlanma süreçlerini önlerler (Gaitan ve ark., 1989).

Calotropis gigantea'nın anti-*Candida* aktivitesi, sitotoksik aktivitesi, anti-piretik aktivite ve yara iyileşme aktivitesi hakkında bazı bilimsel raporları da bulunmaktadır (Kumar ve ark., 2010; Subramanian ve ark., 2010; Wang ve ark., 2008). Yaprak, kök, çiçekler ve lateks ekstraktlarının araştırmacılar tarafından antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahip oldukları bildirilmiştir (Gouri ve ark., 2014; Kumar ve ark., 2010; Suresh Babu ve ark., 2012).

Bitki özlerinin, genel olarak hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterdikleri bildirilmiştir (Ashafa ve ark., 2009; Lima ve ark., 2014). Kar ve ark. (2016), sodom elmasının farklı kısımlardan (çiçek, yaprak ve köklerinden) elde edilen etanol, metanol ve kloroform ekstraktlarının, antimikrobiyel aktivitesini agar difüzyon yöntemi kullanarak, incelemiştir. Çalışmada, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* ve *Candida albicans* olmak üzere patojenik ve patojenik olmayan mikroorganizma türlerine karşı özütlerin antimikrobiyel özelliklerini belirlemiştir. Sonuçta, çiçek özütünde maksimum antimikrobiyel aktivite tespit etmişlerdir. Ancak, *Calotropis gigantea*'nın metanol yaprak ekstraktı, *Klebsiella pneumonia*'ya (12 ± 0.44 mm) karşı, 20 mg konsantrasyonda daha aktif olduğu ve *Escherichia coli*'ye karşı kloroform ekstraktında daha az aktif olduğu gözlenmiştir. Gouri ve ark. (2014) diğer bir çalışmada, antimikrobiyel ve fitokimyasal aktiviteleri için *Calotropis gigantea*'yı incelemiştir. *Calotropis gigantea*'nın diğer çözücü ekstraktları ile karşılaştırıldığında Aseton özütü, *Candida albicans*'a (14.5 mm) ve *Escherichia coli*'ye (17.5 mm) karşı daha fazla antimikrobiyel aktivite göstermiştir.

Kumar ve ark. (2010) *Calotropis gigantea* bitkisinin antimikrobiyel aktivitesi için agar difüzyon yöntemi kullanarak *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* ve *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı antagonistik aktivitesini belirlemiştir. Ekstrakt,

Escherichia coli'ye karşı maksimum inhibisyon zonu göstermiş (17.6 ± 1.15 mm), *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı en düşük (12.6 ± 1.52 mm). Ham ekstraktı, *Bacillus cereus*'a karşı maksimum inhibisyon (% 188.52) ve *Micrococcus luteus*'a karşı en düşük inhibisyonu (% 24.92) göstermiştir. Bununla birlikte, ekstrakt, sırasıyla *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* ve *Escherichia coli* için 50, 25, 6.25, 3.1, 1.5 ve 12.5 mg/mL Minimum İnhibisyon Konsantrasyon değerleri göstermiştir. Aynı şekilde Senthil ve ark. (2012) çalışmalarında agar difüzyon yöntemini kullanarak, etanol, metanol, kloroform ve n-Heksan ekstraktlarını, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigata*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* gibi funguslar ve *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhi*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bakteriler üzerine antimikrobiyel özelliklerini incelemişlerdir. *Calotropis gigantea*'nın etanol ekstraktı, *Candida albicans* (15.06 ± 0.11 mm), *Candida tropicalis* (13.30 ± 0.26 mm) ve *Proteus mirabilis* (12.16 ± 0.15 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (8.0 ± 0.00 mm) gibi bakterilere karşı daha fazla aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, insanlarda patojenik organizmalara karşı kurutulmuş *Calotropis gigantea* ekstresinde antifungal ve antibakteriyel aktivitenin varlığı doğrulanmıştır. Kori ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada *Calotropis gigantea*'nin lateksi, etanolik ve aseton ekstraktı 10 mm ile 16 mm çapındaki inhibitör zonu olan tüm test mikroorganizmalarına (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) karşı etkili olduğunu bulmuştur. Ishnava ve ark. (2012), *Calotropis gigantea*'nın organik solvent ekstraktının, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mitis* ve *Streptococcus mutans* üzerine antimikrobiyel özellik gösterdiğini bulmuşlar ve lateksin kloroform ekstraktının, *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus acidophilus*'a karşı MİK değerlerini sırasıyla 0,032 ve 0,52 mg/mL olarak belirlemişlerdir.

Yesmin ve ark. (2008), sodom elmasının (*Calotropis procera*) yapraklarını metanol ve sulu özünü, potansiyel antioksidan ve antibakteriyel aktivitelere tabi

tutmuşlardır. Sodom elması bitkisinin metanol ekstresinin IC₅₀'si, bitkinin güçlü antioksidan aktivitesini gösteren (110.25 µg/mL) kısmı olduğunu belirlemişlerdir. Ancak, sulu ekstraktı hafif antioksidan aktivite göstermiştir. Antibakteriyel aktivite testi için ekstrakt, agar difüzyon yöntemiyle hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı araştırılmıştır. Sonuç olarak hem metanol hem de sulu *Calotropis procera* ekstresinin, bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakteri suşuna karşı önemli antibakteriyel aktivite gösterdiği saptanmıştır. Böylece, *Calotropis procera*'nın geleneksel olarak ishal ve dizanteri dahil olmak üzere farklı mikrobiyel hastalıklar için çare olarak gösterilmesi, antibakteriyel tarama testleri ile desteklenmiştir. Shobowale ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, sıcaklıkla kurutulan yaprakların su özütü ile yaprakların etanol özütünün antimikrobiyel aktivitesi arasında önemli bir fark bulunmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, lateksin etanolik ekstraktının, *Bacillus subtilis* (21 mm), *Escherichia coli* (16 mm) ve *Aspergillus niger*'e (16 mm) karşı antimikrobiyel etkisi olduğu saptanmıştır. Yine aynı çalışmada; *Calotropis procera* lateksi özütünün MİK değeri, *Salmonella Typhi* 'ye karşı sulu ekstre için 5.0 mg/mL ve *Escherichia coli* 'ye karşı etanolik ekstre için 3.0 mg/mL olarak bulunmuştur. Çalışmada, Sodom elmasının ekstraktının, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio harveyi*, *Aeromonas hydrophila*, *Fusarium sp* ve beyaz nokta sendromu virüsüne karşı bir antimikrobiyel ve antiviral etki gösterdiği saptanmıştır.

Nenaah (2013), Suudi Arabistan'da yetişen sodom elmasının çözücü ekstraktlarının ve flavonoidlerinin antimikrobiyel aktivitesini, agar difüzyon metodu kullanılarak araştırmıştır. Sonuçta, metanolik ekstresinin biyolojik bir biyoaktif bileşenler olarak dört flavonoid glikositlerin izolasyonuna yol açtığını ve elde edilen ekstraktların çoğunun test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ancak, saf flavonoid fraksiyonunda en yüksek antimikrobiyel aktivite bulunmuştur. İnhibisyon bölgelerinin çapı, test edilen bakteri (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae*

ATCC 13883 ve *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076) suşlarına karşı 15.5 ila 28.5 mm arasında değişirken, *Candida albicans* 'a karşı 30 mm'ye ulaşmıştır.

2.2. Fitokimyasallar

Bitki sekonder metabolitleri, British Nutrition Foundation tarafından dört ana kategoride sınıflandırılır (Goldberg, 2008). Bunlar; **terpenoidler** (karotenoidler, steroller, kardiyak glikozitler ve bitki uçucuları gibi), **fenolikler** (liganlar, fenolik asit, tanenler, kumarinler, ligninler, stilbenler ve flavonoidler gibi), **azot içeren bileşikler** (örneğin, protein olmayan amino asitler içerir. siyanojenik glikozitler ve alkaloidler) ve **sülfür içeren bileşiklerdir** (örneğin GSH, GSL, fitoaleksinler, tiyoninler, defensinler ve lektinler) (Mazid ve ark., 2011).

Fitokimyasallar bitkilerde bulunan, metabolizma sırasında üretilen ve bitkilerin hayatta kalması için gerekli olan biyolojik olarak aktif bileşiklerdir (Molyneux ve ark., 2007). Birçok fitokimyasal madde araştırılmış ve bunların antimikrobiyel, antikanser ve kalp hastalıklarından korunma gibi çeşitli özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Leitzmann, 2016).

Fenolik bileşiklerin biyosentezinde, shikimate, fenilpropanoid ve flavonoid yollar gibi çeşitli yollar vardır (Crozier ve ark., 2008; Fraga, 2009). Sekonder metabolitler olarak, fenolik bileşikler savunma, büyüme ve gelişme etkileri gösterir (Crozier ve ark., 2008; Fraga, 2009; Roberts, 2013). Antibiyotik aktivitesi olan ana fenolik bileşiklerin başında flavonoidler gelmektedir (Aherne ve ark., 2002; Havsteen, 2002; Lobo ve ark., 2007).

Polifenoller, fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler, lignanlar ve tanenler olarak sınıflandırılır. Bu sınıflamalar, içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve flavonoid yapılarına göre yapılır. Polifenollerin bu altı alt sınıfı, meyve ve sebzelerde ana biyoaktif bileşik grubudur. Fenolik asitler, meyve ve sebzelerde bulunan diğer fenolik kategorilerini oluşturur (Yamagata, 2018). Onların birçoğu antioksidanlar olarak davranır ve bitkiler ve hayvanlarda normalde oksidatif strese neden olabilen reaksiyon oksijen türlerine karşı savunmak için bitkiler tarafından kullanılır (Choi ve ark., 2012). Fenolikler yapılarına göre flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmıştır (Crozier ve ark., 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Sodom elması (*Calotropis procera*)

Sodom elmasının yaprakları taze olarak (Şekil 3.1.), Nijer'den toplanmış ve daha sonra, aseptik koşullarda ve izotermal ambalajda Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği'ne getirilmiştir. Farklı analizlerde kullanılmak üzere, sodom elmasının yaprakları toz haline getirilene kadar -60 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Sodom elmasının yaprakları

3.1.2. Besiyerleri

Bu çalışmada farklı ekstraktların antimikrobiyel özelliklerin belirlenmesi amacıyla uygulanan MİK testinde bakteriler için; Mueller-Hinton Broth (MHB), mayalar ve küfler için; YEPD broth kullanılmıştır. Antibakteriyel etkiyi belirlemek

amacıyla Nutrient Agar (NA) kullanılmıştır. Antifungal etkiyi belirlemek amacıyla ise Potato Dextrose Agar (PDA) besiyeri kullanılmıştır.

3.1.3. Mikroorganizma kültürleri

Farklı çözenler kullanılarak elde edilen ekstraktların (etanol ve metanol), antibakteriyel ve antifungal etkilerini araştırmak için, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* ve *Penicillium chrysogenum* Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği'nden temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

Bu çalışma, yaprakların antimikrobiyel analizleri için 2 tekerrürlü, fitokimyasal bileşenlerin tespiti için 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

3.2.1. Bitki örneklerinin hazırlanması

Bitki örnekleri tepsiler üzerinde -30°C de 24 saat boyunca dondurulmuştur. Dondurulan bitki örnekleri, dondurarak kurutucu içerisinde -66°C de 5 mtorr basınç altında yaklaşık 62 saat sürede kurutulmuştur. Bu sürenin sonunda kurutulan bitki örnekleri, daha sonraki yapılan ekstraksiyon ve analizler nem kapmalarını önlemek için hiç bekletilmeden vakum poşetlere aktarılmış ve otomatik vakum kapama makinası yardımıyla vakum paketlenme yapılmıştır (Akyıldız ve ark., 2017).

Toz haline getirilmiş örneğin 5 g'lık bölümüne, her biri 100 mL etanol (% 80'lık) ve metanol (% 80'lık) ayrı ayrı steril 500 mL'lik cam şişeler içine ilave edilmiş ve 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme sırasında ortalama 3 saatte bir çalkalama işlemi uygulanmış ve daha sonra özütler filtre kâğıdı kullanılarak süzümüştür. Tam ekstraksiyon sağlamak için ise rotary evaporatör kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapılmıştır (Akerle ve ark., 2008;

Doughari ve ark., 2008; Nenaah ve ark., 2011). Elde edilen tortu analize kadar 4°C’de vida kapaklı bir saklama kabında saklanmıştır.

3.2.2. Fitokimyasal bileşenlerin belirlenmesi

Yapraklarda bulunan fitokimyasal bileşenlerin belirlenmesi amacıyla, Krishnaiah ve ark. (2009) ve Mikail (2010) tarafından tarif edilen yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Tanenler, alkaloidler, flavonoidler, glikozidler ve saponinler olmak üzere farklı bileşenler araştırılmıştır.

3.2.2.1. Fitokimyasal bileşenler üzerinde kalitatif analiz

- Tanenler

Her bitkinin 0.5 g toz numunesi, bir test tüpünde 20 mL damıtılmış su içinde kaynatıldıktan sonra 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve üst kısmı analiz için kullanılmıştır. Filtrelenmiş numunelere % 0.1 FeCl₃ eklenerek tanenlerin varlığını gösteren kahverengimsi yeşil veya mavi siyah renk oluşumu değerlendirilmiştir (Krishnaiah ve ark., 2009).

- Saponinler

Her bitkinin 2 g toz numunesi, bir su banyosunda 20 mL damıtılmış su ile kaynatılmış ve daha sonra 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir ve üst kısmı analiz için kullanılmıştır. Filtrelenmiş numunenin 10 mL’si, bir test tüpünde 5 mL damıtılmış su ile karıştırılarak, stabil bir kalıcı köpük elde etmek üzere kuvvetli bir şekilde çalkalanmıştır. Köpürtme işleminden sonra, 3 damla zeytinyağı ile karıştırılmış ve saponinlerin varlığını gösteren emülsiyon oluşumu değerlendirilmiştir (Krishnaiah ve ark., 2009).

- Flavonoidler

Bir test tüpünde her bir bitki numunesinin sulu ekstresine bir kaç % 1 NH_3 solüsyonu damlatılarak, flavonoid bileşiklerinin varlığı sarı renk oluşumu ile belirlenmiştir (Krishnaiah ve ark., 2009).

- Terpenoidler

Her bitki numunesinin 5 mL sulu ekstraktı, bir test tüpünde 2 mL CHCl_3 ile karıştırılmıştır. Daha sonra, bir tabaka oluşturmak için 3 mL konsantre H_2SO_4 karışımı dikkatlice eklenmiştir. Terpenoid bileşenleri mevcutsa kırmızımsı kahverengi renklenme değerlendirilmiştir (Krishnaiah ve ark., 2009).

- Kardiyak glikozitler

Bir test tüpünde 1 mL konsantre H_2SO_4 hazırlanmıştır. Her bir bitki numunesinden 5 mL sulu ekstrakt, 1 damla FeCl_3 içeren 2 mL buzlu $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ile karıştırılmıştır. Karışıma daha sonra, 1 mL konsantre H_2SO_4 'e dikkatlice eklenmiştir. Örnekteki kardiyak glikozit varlığı, kahverengi bir halka görünmesi ile değerlendirilmiştir (Krishnaiah ve ark., 2009).

3.2.2.2. Fitokimyasal bileşenler üzerinde kantitatif analiz

- Bitki özütün hazırlanması

0.1 g sodom elmasının yaprakları tozu 100 mL metanol (% 80'lık) ile karıştırılmış ve 2 saat boyunca çalkalayıcıda tutulmuş. Daha sonra, karışım 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Toplanan süpernatant, daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere 4 ° C'de buzdolabında saklanmıştır.

- Toplam fenolik madde tayını

Ekstraktların toplam fenolik bileşiklerin miktarı spektrofotometrik olarak Folin-Ciocalteu kolorometrik metoda göre bir kaç değişiklik yapılarak gerçekleştirilmiştir (Mabel ve ark., 2017). Bitki özütlerinden 1'er mL alınıp,

üzerinde 60 mL saf su eklenmiş, karıştırıldıktan üzerine 5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi konularak iyice karıştırılmıştır. Sonra 7.5 dakika içerisinde % 20'lik sodyum karbonat çözeltisinden 15 mL ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Daha sonra çözeltilerin hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltiler, 20 °C'de karanlıkta 2 saat bekletildikten sonra, absorbansları UV spektrofotometresi'nde 750 nm' de okunmuştur.

Toplam fenol miktarları galik asitle çizilen kalibrasyon eğrisinden, mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

$$A = 0,002514x + 0,043865$$

$$r^2 = 0,98$$

A, absorbanstır ve x, mg / g cinsinden toplam fenolik içeriğidir.

- Toplam Flavonoid madde tayını

Bitki özütlerinin flavonoid içeriği Zhishen ve ark. (1999) metodu modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bitki özütlerinden 1'er mL alındıktan sonra üzerine 5mL saf su eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra üzerine % 5'lik 0.3 mL sodyum nitrit eklenmiş ve vorteks ile iyice karıştırılmıştır. 5 dk. beklettikten sonra, üzerine % 10'luk 0.6 mL alüminyum klorür ilave edilip karıştırılmıştır, ardından 5 dakika bekletilmiştir. Sonunda çözeltilerin üzerine 2 mL 1 M'lik sodyum hidroksit çözeltisi eklenip, çözeltilerin absorbansları UV spektrofotometresi'nde 510 nm'de okunarak flavonoid miktarları kuersetinle çizilen kalibrasyon eğrisinden, mg kuersetin eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

Toplam flavonoid içeriği, kalibrasyon eğrisine dayanarak aşağıdaki lineer denklemi kullanılarak hesaplanmıştır:

$$A = 0,001086C + 0,150328$$

$$r^2 = 0,9904$$

A, absorbanstır ve x, mg / g cinsinden toplam flavonoid içeriği.

3.2.2.3. Antioksidan Aktivite Tayini

1 mg bitki örneğinin üzerine 10 mL % 80'lik metanol çözeltisi ilave edilmiş ve 2 saat vorteks ile yeterince karıştırıldıktan sonra 4 °C' de 4000 rpm' de 20 dakika süre cihazda santrifüjlenmiştir. Santrifüj edilmiş örnekten alınan 100 µL bitki örneğine 2460 µL 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH; % 80 metanolda 0.025 g/L) ilave edilmiştir. Kontrol örneğinde 100 µL distile su kullanılmıştır. Daha sonra, vakit kaybedilmeden örneklerin absorbansı % 80 metanole karşı 0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60. dakikalarda UV/VIS spektrofotometrede 515 nm'de ölçülmüştür. Antioksidan aktivitesi, aşağıdaki eşitlik kullanılarak DPPH'ın inhibisyon %'si olarak ifade edilmiştir (Klimczak ve ark., 2007).

$$\text{Antioksidan aktivitesi (\%)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

A_{kontrol} : Kontrolün absorbansı

$A_{\text{örnek}}$: Örneğin absorbansı

3.2.3. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi**3.2.3.1. Bakteri kültürünün hazırlanması**

Sodom elmasının antibakteriyel etkisinin belirlenmesinde agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılmıştır. İlk olarak mikroorganizmaların yoğunluğu ayarlanmış ve bu işlem 0.5-0,6 McFarland ($\sim 1.5 \times 10^8$ kob/mL) standardına göre yapılmıştır (Valgas ve ark., 2007). Ependorf tüplerinde stok edilen mikroorganizma izolatlarından 0.1 mL alınıp 5mL'lik Nutrient broth'a inoküle edilmiştir ve 30 °C'de 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* bakterilerin her birinin yoğunluğu ayrı tüplerde $\sim 1.5 \times 10^8$ kob/mL'ye ayarlanmıştır. Daha sonra tüpleri 5000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatanti ortamdan uzaklaştırıp pellet üzerine 5 mL dilüsyon sıvısı ilave

edilmiştir. Sonraki analizlerde kullanılmak üzere, elde edilen karışımın 1 mL'sine 9 mL steril fizyolojik tuzlu su ilave edilip homojenize hale getirilmiştir.

3.2.3.2. Antibakteriyel etkinin belirlenmesi

Sodom elmasının antibakteriyel etkisi, agar kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Nutrient Agar besiyeri kullanarak patojen bakteri süspansiyonlarının her birinden ayrı petrilere ekim yapılmıştır. Daha sonra katılaştıran besiyerinin belirli yerlerinden 3 mm çapında 3 kuyucuk açılarak, bu kuyucuklardan 2 sine 100 µL sodom elması ekstraktı pastör pipeti ile aktarılmıştır. Kontrol olarak 1 kuyucuğa steril fizyolojik tuzlu su aynı miktarda ilave edilmiştir. Bu işlem, farklı çözümler (etanol ve metanol) kullanılarak elde edilen ekstraktlar için ayrı ayrı uygulanmıştır. Daha sonra petriler, 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Esimone ve ark., 1998). İnkübasyonun sonunda, inhibisyon bölgeleri (zon oluşumları) mm cinsinden Çizelge 3.1'de verildiği şekilde değerlendirilmiştir (Bonadè ve ark., 2001; Rodríguez ve ark., 2000).

Çizelge 3.1. İnkübasyon yeteneğinin değerlendirilmesi (Rodríguez ve ark., 2000)

Zon çapı (mm)	İnkübasyon
Görülmedi	-
<10	(+)
10-14	(++)
15-19	(+++)
>20	(++++)

(-): Görülmedi, (+): Zayıf, (++) : Orta, (+++) : İyi, (++++): Çok iyi

3.2.4. Antifungal aktivitenin belirlenmesi

Antifungal etkiye duyarlılığı araştırılan küf ve maya türleri önceden hazırlanan yatık Potato Dextrose Agar'a steril öze yardımıyla stok kültürden ekilerek, 25 °C'de 3 - 5 gün inkübe edilmiştir.

3.2.4.1. Küf sporunun hazırlanması

Misel oluşturuncaya kadar yatık PDA'da geliştirilen küf türlerinin sporlarını ayırmak için aseptik koşullarda 5 mL steril % 0.05 Tween 80 içeren tamponlanmış fosfat buffer solüsyonu yatık agara ilave edilerek, steril öze yardımıyla yavaşça miseller gevşetilmiştir. Daha sonra önceden sterilize edilen tülbent bezi yine steril cam huni içine yerleştirilmiş ve süspansiyon süzölmüştür. Böylece miseller üstte kalarak ayrılması sağlanmıştır.

Küf sporunun konsantrasyonunun ayarlanmasında, küf sporlarından ön denemelerle ardışık dilüsyonlar hazırlanarak, her bir dilüsyondan PDA'ya ekim yapılarak, sayım yöntemiyle bulunmuştur (Dal Bello ve ark., 2008). Altta kalan küf sporlarının 10^5 spor/mL'ye ayarlanan konsantrasyonu antifungal etkinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.4.2. Maya kültürünün hazırlanması

Maya kültürleri yatık PDA besiyerine ekimi yapılarak, 25 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen mayaların üzerine, 5 mL steril % 0.05 Tween 80 içeren tamponlanmış fosfat solüsyonu eklenip, mayaların geliştiği yatık agar steril öze yardımıyla yıkanmıştır. Duyarlılık testinde kullanılacak mayaları 10^6 kob/mL konsantrasyonuna ayarlanmıştır (Dal Bello ve ark., 2008).

3.2.4.3. Antifungal etkinin belirlenmesi

Sodom elmasının antifungal etkisi "Agar Kuyu Difüzyon" metodu ile belirlenmiştir. Antifungal etkiye duyarlılığı araştırılacak maya ve küf süspansiyonlarından, 1'er mL YEPD agar besiyerine dökme ekim yöntemiyle ekimi yapıldıktan sonra, katılaştıran besiyerinde 3 mm çapında 2 kuyucuk açılmıştır. Kuyucuklardan ikisine, 100 µL sodom elması ekstraktı pastör pipeti ile aktarılmıştır. Kontrol olarak 1 kuyucuğa steril fizyolojik tuzlu su aynı miktarda ilave edilmiştir. Petriler, 25 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılarak, süre sonunda zon

oluşumu değerlendirilmiştir (Magaldi ve ark., 2004). Oluşan zon çaplarının değerlendirilmesi Çizelge 2’de verilen değerlere göre yapılmıştır.

3.2.5. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Mueller-Hinton Broth besiyerinde aktif maddenin 10 katlı dilüsyonları yapılarak, gittikçe azalan yoğunlukta 160, 16, 1.6 mg/mL olmak üzere sodom elması ekstraktı içeren dilüsyonlar elde edilmiştir. Üzerine yukarıda ayarlandığı 24 - 48 saatlik aktif duyarlılığı belirlenecek olan mikroorganizma kültüründen 0.1 mL aktarılıp, bakteriler, 37 °C’de 24 - 48 saat, küf ve mayalar ise 25°C’de 48 - 72 saat inkübe edilmiştir. Tüplerdeki gelişme bulanıklık değerlendirilerek gözle yapıp böylece gelişmenin olmadığı son dilüsyon, MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Gelişmenin olmadığı son dilüsyondan alınacak 0.1 mL inokulum, 10 mL besiyerine (bakteri için; Mueller-Hinton Broth, maya ve küf için; YEPD broth) inoküle edilerek ve inkübasyon sonunda tüpte gelişmenin olmaması Minimum Letal Konsantrasyonu (MLK) değerini vermiştir.

3.2.6. İstatiksel Değerlendirme

Elde edilen bulgulara IBM SPSS 25 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu aralık testine (DMRT) göre 0.05 anlamlılık düzeyinde (α) değerlendirilmiştir.

Kullanılan çözücüler (etanol ve metanol) arasında önemli bir fark olup olmadığını belirlemek için, her mikroorganizma için inhibisyon bölgelerinin karşılaştırılması ki-kare testi kullanılarak yapılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, wagashi peyniri üretimi sırasında kullanılan sodom elmasının antioksidan özellikleri ve antimikrobiyel etkisi, gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmalar ve patojen mikroorganizmalara etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda, toz haline getirilmiş sodom elması yaprağının metanolik ve etanolik özütleri kullanılarak *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* ve *Penicillium chrysogenum*'e karşı antibakteriyel ve antifungal etkileri araştırılmıştır. Daha sonra fitokimyasal testlere (Toplam fenolik bileşenleri, toplam flavonoid) tabi tutup DPPH testi ile bitkinin antioksidan etkisi incelenmiştir.

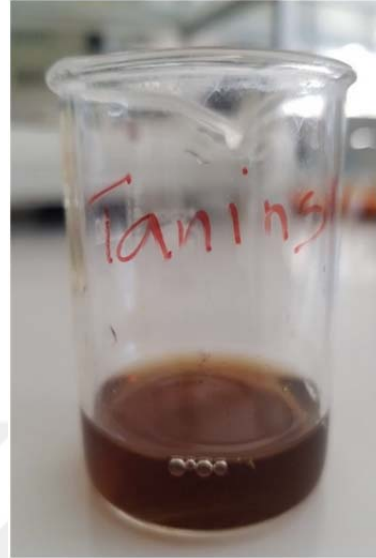
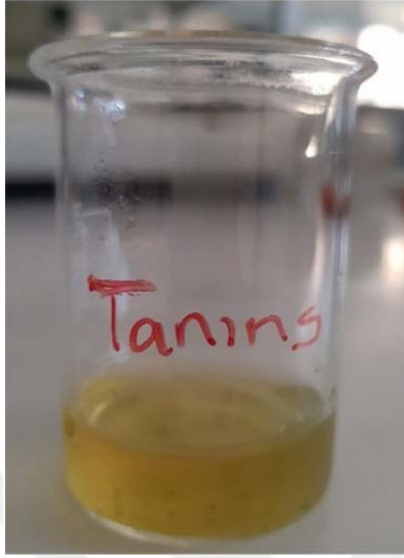
4.1. Fitokimyasal bileşenlerin belirlenmesi

4.1.1. Fitokimyasal bileşenler üzerinde kalitatif analizlerin sonuçları

Yapılan kalitatif analiz sonucunda sodom elması yaprakları örneğinde tanen, saponin, flavonoid ve terpenoidler tespit edilirken kardiyak glikozitler tespit edilmemiştir. Kardiyak glikozitlerin bulunmaması dışında, bu sonuçlar Mishra ve ark. (2018); Murti ve ark. (2010) tarafından elde edilen sonuçlara benzerlik göstermektedir. Ek olarak, farklı çözücüler (etil asetat, etanol, metanol, kloroform) kullanarak sodom elmasında kardiyak glikozitlerin varlığını gösterilmiştir. Bu çalışmada ise metanol kullanılmıştır. Kardiyak glikozitler termolabildir, ekstraksiyon işlemlerinde hiçbir ısı işlem uygulanmamış olmasına rağmen, sodom elması örneğimizde bulunmaması yetiştirme bölge farklılığından kaynaklı olabileceğini düşünülmüştür. Diğer bileşikler ise kalitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4).

Analiz için kullanılan sodom elması numunelerine % 0.1 FeCl₃ eklenerek, karışımın rengi kahverengiye dönüşmesi ile tanenlerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA



Şekil 4.1. Tanenlerin varlığının tespiti

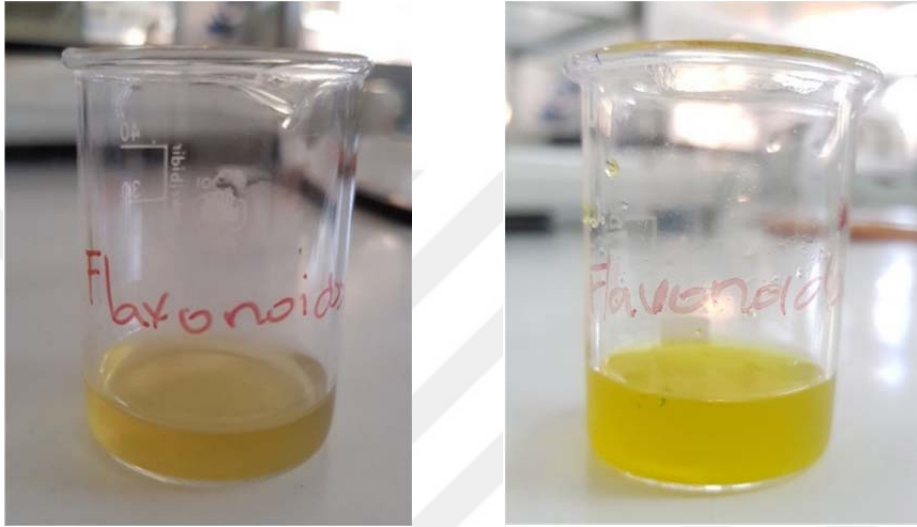
Saponinlerin varlığı emülsiyon yöntemiyle incelenmiştir. Hazırlanan sodom elması numuneleri zeytinyağı ile karıştırılmış ve saponinlerin varlığını gösteren emülsiyon oluşumuyla değerlendirilmiştir (şekil 4.2).



Şekil 4.2. Saponinlerin varlığının tespiti

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

Daha sonra, flavonoidlerin varlığının tespiti için Krishnaiah ve ark. (2009) yöntemi kullanılmıştır. Flavonoid bileşiklerinin varlığı hazırlanan numuneye % 1 NH_3 (amonyak) solüsyonu damlatılarak sarı renk oluşumu ile tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Flavonoidlerin varlığının tespiti

Aynı şekilde Krishnaiah ve ark. (2009) yöntemini kullanarak sodyum elmasında terpenoidlerin varlığını tespit edilmiştir. Kısaca hazırlanan numune, CHCl_3 ile karıştırıldıktan sonra terpenoid bileşenlerin varlığını gösteren kırmızımsı kahverengi renklenme görünmüştür (Şekil 4.4).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA



Şekil 4.4. Terpenoidlerin varlığının tespiti

4.1.2. Fitokimyasal bileşenler üzerinde kantitatif analizlerin sonuçları

4.1.2.1. Sodom elması yaprağının toplam fenolik madde içeriği

Sodom elması ekstresi oldukça yüksek toplam fenolik içerik göstermiştir. Örnekten 0.1 g toplam fenolik (TF) madde içerikleri aşağıdaki gibi bulunmuştur:

$$\text{TF} = 7.683 \pm 0.362 \text{ mg galik asit/g}$$

Bu konsantrasyonun Ahmad ve ark. (2011) tarafından elde edilenden daha yüksek olduğu bulunmaktadır. Nitekim, sodom elmasının yapraklarından elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin incelenmesi ile ilgili çalışmalarında, toplam fenolik madde içeriği 1.5 ± 0.1 mg galik asit/g olarak bildirilmiştir. Joshi ve ark. (2009) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, 3.6 mg galik asit/g bulunan toplam fenolik madde içeriği önceki çalışmasından yüksek bulunmuş fakat bizim sonuçlarımızdan daha düşük görünmektedir. Sodom elması örneğimizde toplam fenolik madde içeriği yüksek çıkması yetiştirme bölge ve

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

bizim çalışmamızda kullanılan dondurarak kurutma yöntemi farklılığından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür.

4.1.2.2. Sodom elması yaprağının toplam flavonoid madde içerikleri

Sodom elması yaprağının toplam flavonoid (TFl.) madde içerikleri aşağıdaki gibi bulunmuştur:

$$\text{TFl.} = 3.966 \pm 0.573 \text{ mg kuersetin/g}$$

Diğer çalışmalara göre, toplam flavonoid madde içerikleri daha yüksek bulunmaktadır. Joshi ve ark. (2009) sodom elması yapraklarının antioksidan aktivitesini incelerken toplam flavonoid madde içeriklerinin 1.24 mg kuersetin/g olduğunu belirlemiştir. Aynı şekilde yapılan başka bir çalışmada 1.62 ± 0.05 mg kuersetin/g olarak bulunmuştur (Kumar ve ark., 2013).

4.2. Antioksidan aktivite değerleri

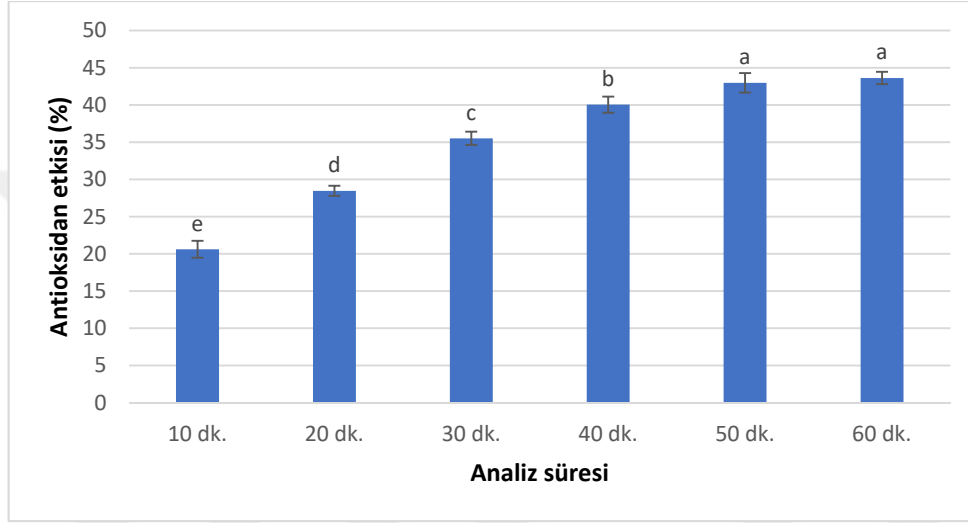
4.2.1. DPPH

DPPH testi ilk olarak 1950’lerde doğal ürünlerde elektron dönerlerini bulmak için önerilmiştir (Blois, 1958). Daha sonra fenolik bileşiklerin ve bitkisel besinlerin antioksidan aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır (Mensor ve ark., 2001).

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) bir organik azot radikalidir. Bir atom azot köprüsünde eşlenmemiş bir değerlik elektronuna sahip olan, organik ortamda çözünen (özellikle alkollü), mor bir renge sahip olan ve 515–520 nm aralığında absorbe edilen bir radikaldir. Ticari olarak temin edilebilen radikal, kullanılmasını sağlar ve radikal üretimi ile reaksiyonlarda olası girişimleri azaltır (Pulido ve ark., 2000). Bir elektron donörünün varlığında radikal olan çözelti yoğunluğunu kaybeder ve sararır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

Sodom elması, antioksidan etkiye sahip olan maddelerden özellikle fenolik bileşenleri yapısında bulundurduğu için antioksidan aktivite değerinin yüksek çıkması beklenmektedir. Klimczak ve ark. (2007)'in yöntemine göre yapılan DPPH antioksidan tayinin sonuçları Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Sodom elması yaprağının antioksidan aktivitesi

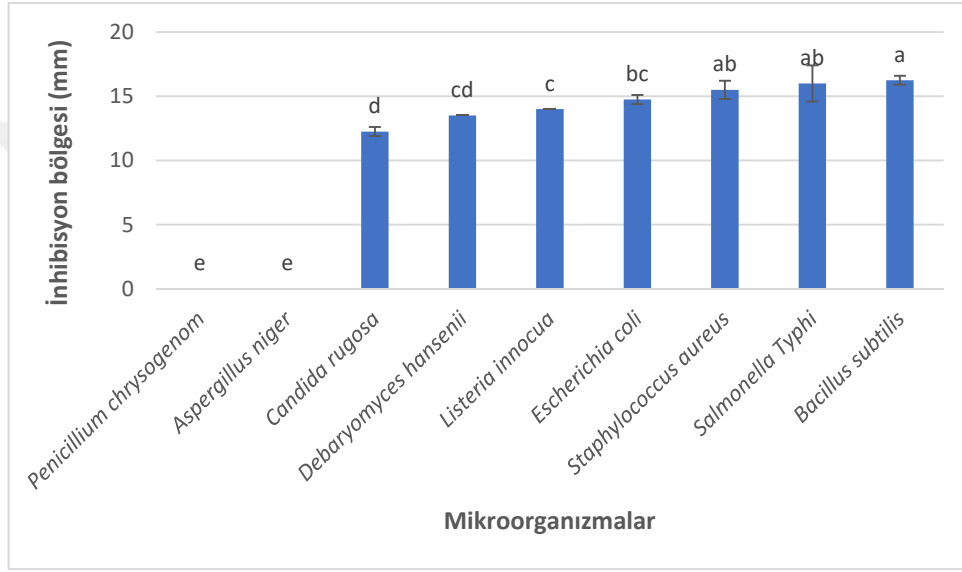
Bitki ekstraktın antioksidan aktivite değerleri 60 dakika boyunca % 20.60 ile % 43.62 arasında değişmiştir. En yüksek inhibisyon aktivitesi (% 43.62) 60 dakika sonra gözlenmiştir. Ancak, sonuçların istatistiksel analizine göre, 50. dakikada elde edilen sonuçlar ile 60. dakikadaki sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P=0.05$). Sodom elmasının antioksidan aktivite analizi ile ilgili çalışmalarında, DPPH analiz sonuçlarına göre en yüksek antioksidan aktivite bitki lateksinde bulunmuş (%82.47). Ancak oda sıcaklığında kurutulmuş bitki yapraklarında daha düşük olup % 23.93 olarak belirlemiştir (Joshi ve ark., 2009).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

4.3. Antibakteriyel ve antifungal aktivitenin belirlenmesi

4.3.1. Sodom elması yaprağının etanolik özütün antibakteriyel ve antifungal aktivitesi

Etanol kullanarak elde edilen bitki özütün Agar difüzyon testi ile yapılan antibakteriyel ve antifungal test sonuçları şekil 4.6’da verildiği gibi bulunmuştur.



Şekil 4.6. Sodom elması yaprağının etanolik ekstraktın etkisi

İstatistiksel düzeyde aynı harf (ler) e sahip olan ortalama değerlerin arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($\alpha=0.05$)

Şekil 4.6’da bulunan analiz sonuçlarına göre, sodom elmasının etanolik ekstraktının inhibisyon bölgesi, 0 ile 16.25 mm arasında değişim göstermiştir. En yüksek inhibisyon, *Bacillus subtilis*’e karşı (16.25 ± 0.35 mm), en düşük inhibisyon ise inhibisyonun olmadığı küflerde (*Penicillium chrysogenum* ve *Aspergillus niger*) gözlenmiştir. İstatistiksel olarak, *Debaryomyces hansenii*’nin inhibisyon zonu ile *Listeria innocua*’nın zonu arasında bir fark yoktur, fakat mayaların inhibisyon bölgeleri bakterilerinkine kıyasla daha düşüktür. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara paralel olarak, Kareem ve ark. (2008)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

tarafından, sodom elmasının seçilmiş patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivitelerinin incelendiği çalışmada, etanolik ekstraktın etkili olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, bakteri türü üzerindeki inhibisyon bölgesinde anlamlı bir fark yoktur (Gram pozitif veya Gram negatif). Fakat yaptıkları çalışmada *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'e karşı inhibisyon bölgeleri daha düşük olup sırasıyla 8.5 mm ve 7 mm olarak bulunmuştur. Bunlardan farklı olarak, Shobowale ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada sodom elmasının etanolik ekstraktının *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* ve *Bacillus subtilis*'e karşı bu çalışmadaki sonuçlardan daha düşük inhibisyon elde edilirken (sırasıyla 10 mm, 9.5 mm ve 0 mm) *Aspergillus niger*'e karşı (10 mm) daha yüksek inhibisyon aktivitesi kaydedilmiştir. Sodom elmasının etanolik ekstraktın etkisi yüksek çıkması yetiştirme bölgesinden ve bizim çalışmamızda kullanılan dondurarak kurutma yöntemi farklılığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. İnhibisyon aktiviteleri, Çizelge 4.1 'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Sodom elması yaprağının etanolik özütünün antimikrobiyel aktivitesi

Mikroorganizmalar	Zon çapı (mm)	İnhibisyon Aktivitesi
<i>Bacillus subtilis</i>	16.25	(+++)
<i>Escherichia coli</i>	14.75	(++)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.50	(+++)
<i>Listeria innocua</i>	14.00	(++)
<i>Salmonella Typhi</i>	16.00	(+++)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	13.50	(++)
<i>Candida rugosa</i>	12.25	(++)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.00	-
<i>Aspergillus niger</i>	0.00	-

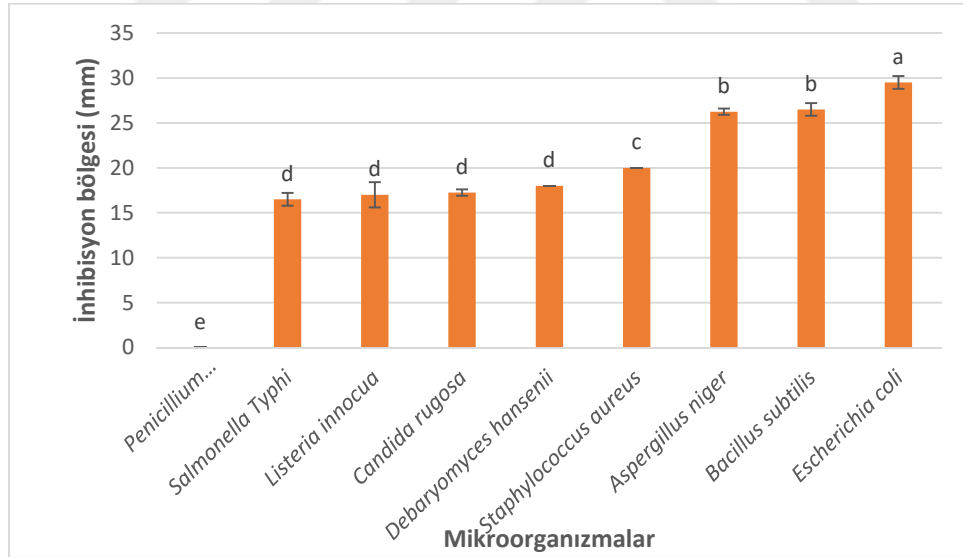
(-): görülmedi, (+): Zayıf, (++) : Orta, (+++) : İyi, (++++): Çok iyi

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

Çizelge 4.1’de görülebileceği gibi, etanolik ekstraktın küf (*Aspergillus niger* et *Penicillium chrysogenum*) gelişimi üzerinde inhibe edici bir etkisi olmamıştır. Bununla birlikte, inhibitör etkisinin 12.25, 13.50, 14 ve 14.75 mm’lik inhibisyon bölgeleriyle *Candida rugosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Listeria innocua* ve *Escherichia coli*’ye karşı olmak üzere "orta" olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, sodom elmasının etanolik ekstraktının, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi* ve *Bacillus subtilis*’e karşı sırasıyla 15.50, 16.00 ve 16.25 mm inhibisyon özelliği olarak "iyi" olduğu gözlenmiştir.

4.3.2. Sodom elması yaprağının metanolik özütün antibakteriyel ve antifungal aktivitesi

Metanol kullanarak elde edilen bitki özütün Agar difüzyon testi ile yapılan antibakteriyel ve antifungal test sonuçları Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7. Sodom elmasının metanolik ekstraktın etkisi
İstatistiksel düzeyde aynı harf (ler) e sahip olan ortalama değerlerin arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($\alpha=0.05$)

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

Elde edilen analiz sonuçlarına göre, sodom elmasının metanolik ekstraktının inhibisyonu ile 29.50 mm arasında değişmiştir. En yüksek inhibisyon *Escherichia coli*'e karşı (29.50 ± 0.71 mm), en düşük inhibisyon ise inhibisyonun olmadığı *Penicillium chrysogenum*'a karşı gözlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara paralel olarak, Yesmin ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, metanolik ekstraktın etkili olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, bakteri türü üzerindeki inhibisyon bölgesinde anlamlı bir fark yoktur (Gram pozitif veya Gram negatif) fakat yaptıkları çalışmada *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*'ye karşı inhibisyon bölgeleri daha düşük (9 mm) olup *Salmonella Typhi*'ye karşı hiçbir etki kaydedilmemiştir.

Bunlardan farklı olarak yapılan bir çalışmada *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*'e karşı metanol ekstraktı daha etkili olup sırasıyla 18.50 ± 0.80 mm, 16.00 ± 0.55 mm, 14.50 ± 0.80 mm, 11.50 ± 0.85 mm, 19.50 ± 1.00 mm olarak bulunmuştur fakat sonuçlarımıza göre daha düşük bulunmaktadır (Nenaah ve ark., 2011). Aynı çalışmada metanolik ekstraktın *Penicillium chrysogenum* yüksek etki (18.50 ± 0.55 mm) göstermişken, çalışmamızda hiçbir etki görülmemektedir. Gözlemlenen farklılıklar daha düşük mikroorganizma yoğunluğu ile çalışmalarından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Mikroorganizma yoğunluğuna ek olarak, sodom elmasının yetiştirme bölgesinin ve bizim çalışmamızda kullanılan dondurarak kurutma yöntemi daha yüksek sonuç elde edilmesine olanak sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen inhibisyon aktiviteleri çizelge 4.2'de gösterilmektedir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

Çizelge 4.2. Sodom elması yaprağının metanolik özütünün inhibisyon aktiviteleri

Mikroorganizmalar	Zon çapı (mm)	İnhibisyon Aktivitesi
<i>Bacillus subtilis</i>	26.50	(++++)
<i>Escherichia coli</i>	29.50	(++++)
<i>Staphylococcus aureus</i>	20.00	(++++)
<i>Listeria innocua</i>	17.00	(+++)
<i>Salmonella Typhi</i>	16.50	(+++)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	17.25	(+++)
<i>Candida rugosa</i>	18.00	(+++)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.00	-
<i>Aspergillus niger</i>	26.25	(++++)

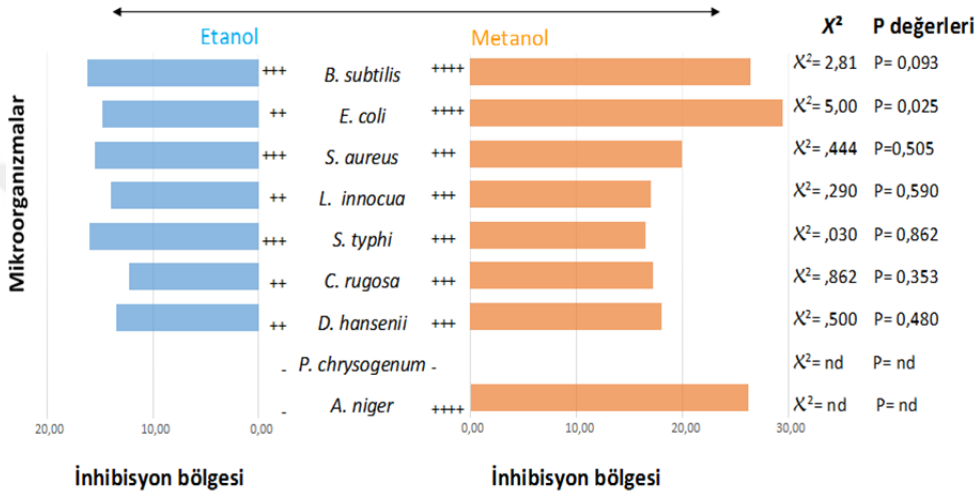
(-): görülmedi, (+): Zayıf, (++) : Orta, (+++) : İyi, (++++): Çok iyi

Çizelge 4.2’de, Sodom elması yaprağının metanolik ekstraktının mikroorganizmalar karşı inhibisyon aktivitelerini gösterilmiştir. Analizin sonuçlarına göre, metanolik ekstraktın *Penicillium chrysogenum*’a karşı inhibe edici bir etkisi olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte, inhibisyon etkisinin *Salmonella Typhi*, *Listeria innocua*, *Debaryomyces hansenii* ve *Candida rugosa* ‘ya karşı sırasıyla 16.5, 17, 17.25 ve 18 mm’lik inhibisyon çapları ile "iyi" olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, Rodríguez ve ark. (2000) sınıflamasına göre, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* için sırasıyla 20.00, 26.25, 26.50 ve 29.50 mm inhibisyon bölgeleri gözlemlenebildiği için, metanolik ekstresi "çok iyi" olarak kabul edilmektedir.

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Aspergillus niger* hariç diğer mikroorganizmaların inhibisyon bölgeleri kullanılan çözücüye göre anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Fakat Rodríguez ve ark. (2000) yapmış olduğu inhibisyon bölgeleri sınıflandırmasına göre bu mikroorganizmaların kullanılan farklı çözücülerde farklı inhibisyon bölgelerine sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, etanolik ekstrenin

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

Staphylococcus aureus için "iyi" iken metanolik ekstrenin "çok iyi" olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde etanolik ekstraktın *Listeria innocua*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida rugosa*'ya karşı "orta" bir inhibitör etkiye sahip iken metanolik ekstraktın inhibe edici etkisi "iyi" olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. İnhibisyon yeteneğinin değerlendirilmesi

4.4. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) sonuçları

4.4.1. Sodom elmasının yaprağının etanolik ekstraktın MİK ve MLK sonuçları

Sodom elmasından elde edilen etanolik ekstrakt örneklerinde MİK testi ile yapılan antimikrobiyel test sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

Çizelge 4.3. Sodom elması yaprağının etanolik ekstraktına ait MİK ve MLK sonuçları

	160 mg/mL	16 mg/mL	1.6 mg/mL
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	-	-	-
<i>Salmonella Typhi</i>	+	-	-
<i>Candida rugosa</i>	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-

-: Görülmedi; +: MİK; ++: MLK

Elde edilen sonuçlara göre, etanolik ekstrenin, sadece *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhi* üzerinde, ancak sadece 160 mg/mL konsantrasyonunda inhibe edici bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, en yüksek konsantrasyonda bile hiçbir mikroorganizmada (160 mg/mL) minimum letal konsantrasyon kaydedilmemiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA



Şekil 4.9. Sodom elması yaprağının etanolik ekstraktına ait MİK testi

Yapılan diğer çalışmalarda etanolik ekstraktı konsantre haline getirildikten sonra tamamen kurutup kullanılmıştır. Dolayısıyla daha küçük dozlarda etki bulunmuştur. Bunların arasında Kareem ve ark. (2008) yaptıkları çalışmasında *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Aspergillus niger* sırasıyla 5 mg/mL, 7.5 mg/mL ve 10 mg/mL olmak üzere MİK değerleri olduğu tespit edilmiştir. Daha düşük (10^7 kob/mL) mikroorganizma yoğunluğu ile çalışmalarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

4.4.2. Sodom elmasının yaprağının metanolik ekstraktın MİK ve MLK sonuçları

Sodom elmasından elde edilen metanolik ekstrakt örneklerinde MİK testi ile yapılan antimikrobiyel test sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA

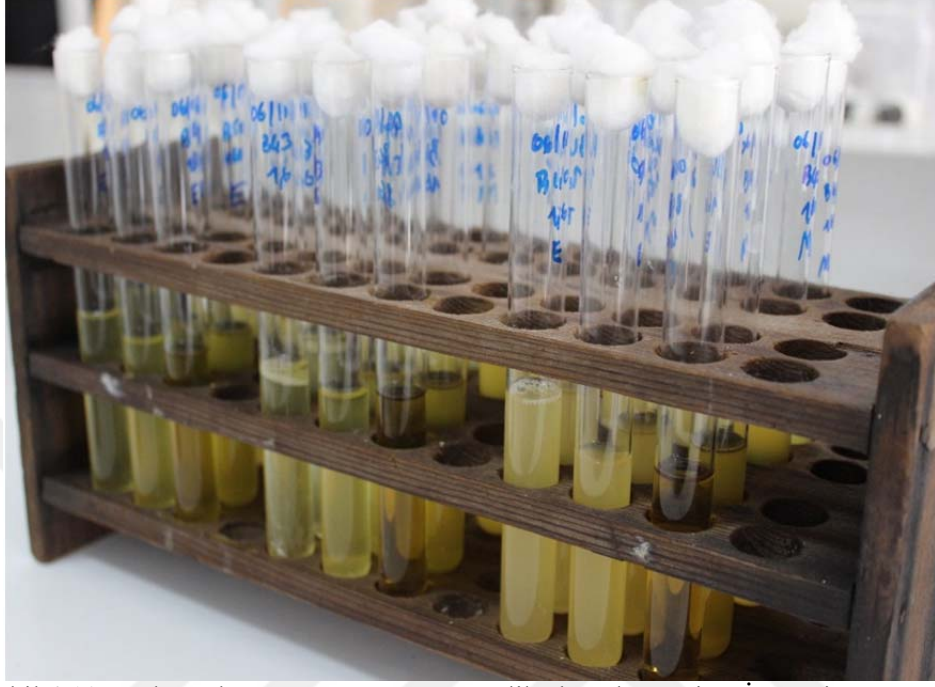
Çizelge 4.4. Sodom elması yaprağının metanolik ekstraktına ait MİK ve MLK sonuçları

	160 mg/mL	16 mg/mL	1.6 mg/mL
<i>Bacillus subtilis</i>	++	-	-
<i>Escherichia coli</i>	++	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-
<i>Listeria innocua</i>	+	-	-
<i>Salmonella Typhi</i>	+	-	-
<i>Candida rugosa</i>	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-

-: Görülmedi; +: MİK; ++: MLK

Elde edilen sonuçlara göre, 16 ve 1.6 mg/mL konsantrasyonlarda hiçbir inhibisyon aktivitesi bulunmazken, bütün bakterilerde ve *Debaryomyces hansenii*'de 160 mg/mL minimum inhibisyon konsantrasyon olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, 160 mg/mL konsantrasyonu *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* mikroorganizmalar için minimum letal konsantrasyon olduğunu saptanmıştır (Şekil 4.10).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA Adamou MAMOUDOU ANZA



Şekil 4.10. Sodom elması yaprağının metanolik ekstraktına ait MİK testi

Etanolik ekstraktı gibi diğer çalışmalara göre daha düşük sonuçları edilmiştir. Nenaah ve ark. (2011) tarafından elde edilen sonuçlara göre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* sırasıyla 0.25 mm, 0.75 mm, 2.50 mm, 1.00 mm, 0.75 mm olmak üzere MİK değerleri olduğunu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmamızda sodom elması yapraklarının metanolik ekstraktı kullanılarak MİK testinde bakteri, küf, mayalara karşı sırasıyla 1.5×10^8 kob/mL, 10^5 spor/mL ve 10^6 kob/mL mikroorganizma yoğunlukla çalışırken Nenaah ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada daha düşük (10^6 kob/mL) mikroorganizma yoğunluğu ile çalışmışlardır. Dolayısıyla sodom elması yapraklarının metanolik ekstraktı daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada, Batı Afrika ve özellikle Nijer’de yetiştiren sodom elması (*Calotropis procera*), wagashi peyniri üretiminde sütü pıhtılaştırmak için kullanılan bitkinin yapraklarının bazı özellikleri incelenmiştir.

Fitokimyasal analizler sonucunda, sodom elmasının çalışma mikroorganizmaları üzerindeki Invitro antimikrobiyel ve antioksidan etkisinden sorumlu olabilen biyoaktif bileşiklerin, her birinin spesifik bir şekilde hareket eden alkaloidlerin, tanenlerin, saponinlerin, flavonoidlerin, terpenoidlerin varlığından kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Mikroorganizmalara karşı antibakteriyel veya antifungal aktivite tespit edildikten sonra bitkinin yapraklarının antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Antioksidan aktivite açısından sodom elması yapraklarının oldukça yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. % 43.62 olan antioksidan aktivitesinin % 10 oranında seyreltilmiş bir ekstraktan elde edildiği belirtilmelidir. Antioksidan etkisi bilinen fenolik bileşik varlığını belirlemek amacı ile kullanılan yaprakların metanol özütünün toplam fenolik, toplam flavonoid maddeleri tayin edilmiş ve miktarları sırasıyla 7.683 ± 0.362 mg galik asit/g ve 3.966 ± 0.573 mg kuersetin/g şeklinde bulunmuştur.

Sodom elmasının farklı ekstrelerinin antimikrobiyel aktivitesi, test edilen tüm mikroorganizmalara karşı farklı derecelerde antibakteriyel ve antifungal aktivite göstermiştir. Sodom elmasının etanolik ekstraktının inhibisyon bölgeleri, 0.00 ile 16.25 mm arasında değişim gösterirken, metanolik ekstraktının inhibisyon bölgeleri, 0.00 ile 29.50 mm arasında değişmiştir. Bununla birlikte, kullanılan çözücüye göre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Aspergillus niger* hariç tüm mikroorganizmalar için önemli bir fark olmadığını gösterirken inhibisyon bölgelerinin sınıflandırılmasına göre, çözücüler arasında bir farkın gözlenmesi mümkün olmuştur. Sonuç olarak, etanolik ekstraktın *Staphylococcus aureus* üzerine inhibisyon "iyi" iken metanolik ekstraktın "çok iyi" olduğu tespit

edilmiştir. *Listeria innocua*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida rugosa*'ya karşı "orta" bir inhibitör etkiye sahip etanolik ekstraktı ancak metanolik ekstraktın inhibe edici etkisi "iyi" olan için de aynıdır.

Minimum inhibisyon konsantrasyonunun sonuçları gözlemlendiğinde, metanolik ekstraktın etanolik olandan daha başarılı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Sodom elmasının metanolik ekstraktının çalışma mikroorganizmalarına karşı MİK analizi sonuçlarına göre, 16 ve 1.6 mg/mL konsantrasyonlarda hiçbir inhibisyon aktivitesi bulunmazken, bütün bakterilerde ve *Debaryomyces hansenii* 'de 160 mg/mL minimum inhibisyon konsantrasyon olarak kaydedilmiştir. Ayrıca 160 mg/mL konsantrasyonu *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* mikroorganizmalar için minimum letal konsantrasyon olduğunu saptanmıştır.

Bu çalışmadan, elde edilen analiz sonuçlardan anlaşıldığı üzere, sodom elmasının farklı alanlarda bazı geleneksel kullanımlarının antioksidan ve antimikrobiyel özellik sağladığı görülmektedir. Ayrıca, liyofilizasyon yöntemi sayesinde elde edilen sonuçlar, bitkinin aktif bileşenlerini daha iyi korumuş ve ortalamaya kıyasla daha yüksek sonuçların elde edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, bitkinin farklı biyoaktif elementlerinin ölçümü, bu elementlerin antibakteriyel veya antioksidan etkinliği üzerindeki herhangi bir sinerji veya antagonizmin vurgulanması için farklı kombinasyonları incelenirse farklı bilim dallarında değişik çalışmalara öncülük edebilir (örnek : eczacılık, gıda biyoteknolojisi, bitki koruma, kozmetik vs.). Genelde sodom elması ile ilgili fazla çalışma olmasına rağmen Batı Afrika'da yetiştiren sodom elması ve Batı Afrika peyniri ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Dolayısıyla sodom elmasını kullanarak yapılacak yeni formülasyon ise daha standart, sağlıklı ve aktif bir ürün elde edilmesine yol açabilecektir. Bununla birlikte, bu yerel tarımsal kaynağı en iyi şekilde kullanabilmek için, Afrika'daki birçok hastalıktan sorumlu olan patojen mikroorganizmalara yönelik araştırmalara yer verilmesi girişimleri yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Agrawal, A. A. 2004, Plant defense and density dependence in the population growth of herbivores, *The American Naturalist*, 164(1), 113-120.
- Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. 2002, Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism, *Nutrition*, 18(1), 75-81.
- Ahmad, N., Anwar, F., Hameed, S., & Boyce, M. C. 2011, Antioxidant and antimicrobial attributes of different solvent extracts from leaves and flowers of akk [*Calotropis procera* (Ait.) Ait. F.)], *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(19), 4879-4887.
- Aïssi, V. M., Soumanou, M. M., Bankolè, H., Toukourou, F., & de Souza, C. A. 2009, Evaluation of hygienic and mycological quality of local cheese marketed in Benin, *AJBAS*, 3(3), 2397-2404.
- Aïssou, R., Aïssi, V., Youssaou, I., & Soumanou, M. 2015, Caractéristiques physico-chimiques du fromage Peulh produit dans les conditions optimales de coagulation à partir du lait de deux races de vaches du Bénin, *Nature & Technology*, 14, 37 - 43.
- Akerele, J., Obasuyi, O., Ebomoyi, M., & Oboh, I. 2008, Antimicrobial activity of the ethanol extract and fractions of the seeds of *Garcinia kola* Heckel (Guttiferae), *African journal of biotechnology*, 7(2).
- Akinmoladun, A. C., Ibukun, E., Afor, E., Obuotor, E. M., & Farombi, E. 2007, Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*, *Scientific Research and Essays*, 2(5), 163-166.
- Akyıldız, A., Polat, S., & Ağcam, E. 2017, Effect of conventional and freeze drying methods on some quality properties of watermelon, *GIDA-Journal of Food*, 42(2), 169-176.

- Al-Qarawi, A. A., Mahmoud, O. M., Sobaih, M. A., Haroun, E. M., & Adam, S. E. I. 2001, A Preliminary Study on the Anthelmintic Activity of *Calotropis procera* Latex against *Haemonchus contortus* Infection in Najdi Sheep, *Veterinary Research Communications*, 25(1), 61-70.
- Ansari, S. H., & Ali, M. 2000, New oleanene triterpenes from root bark of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br., *Indian Journal of Chemistry*, 39B, 287-290.
- Ashafa, A., & Afolayan, A. 2009, Assessment of the antimicrobial activity of the root extracts from *Chrysocoma ciliata* L, *African Journal of Microbiology Research*, 3(11), 700-703.
- Athal, C., & Sethi, P. 1962, Proteolytic activity of some Indian plants. Part II, Isolation, properties and kinetic studies of Calotropin, *Planta Medica*, 10, 77-90.
- Basu, B. D., Kirtikar, K. R., & Basu, K., 1991. Indian Medicinal Plants: Plates, Bishen Singh Mahendra Pal Singh,
- Blois, M. S. 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181(4617), 1199.
- Bonadè, A., Murelli, F., Vescovo, M., & Scolari, G. 2001, Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*, *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 153-158.
- Butler, M. S. 2005, Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials, *Natural Product Reports*, 22(2), 162-195.
- Cavalcante, G. S., de Moraes, S. M., Andre, W. P. P., Ribeiro, W. L. C., Rodrigues, Bevilaqua, C. M. L. 2016, Chemical composition and in vitro activity of *Calotropis procera* (Ait.) latex on *Haemonchus contortus*, *Veterinary Parasitology*, 226, 22-25.
- Chang, H. W. 1995, Antibacterial effect of spices and vegetable, *Food Industries*, 27.

- Choi, D. Y., Lee, Y. J., Hong, J. T., & Lee, H. J. 2012, Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease, *Brain Res Bull*, 87(2-3), 144-153.
- Chundattu, S. J., Agrawal, V. K., & Ganesh, N. 2016, Phytochemical investigation of *Calotropis procera*, *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S230-S234.
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H., 2008. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet, John Wiley & Sons,
- Dal Bello, G., Mónaco, C., Rollan, M. C., Lampugnani, G., Arteta, N., Abramoff, C., . . . Stocco, M. 2008, Biocontrol of Postharvest Grey Mould on Tomato by Yeasts, *Journal of Phytopathology*, 156(5), 257-263.
- Derasari HR, & GF, S. 1965, Preliminary pharmacological investigations of the roots of *Calotropis procera*., *Ind J Pharmacy*, 27, 276–280.
- Dewan, S., Kumar, S., & Kumar, V. L. 2000, Antipyretic effect of latex of *Calotropis procera*, *Indian Journal of Pharmacology*, 32(3), 252-252.
- Dewan, S., Sangraula, H., & Kumar, V. 2000, Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*, *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 307-311.
- Dossou, J., Hounzangbe-Adote, S., Soulé, H., & Chabi, B. 2006, Production et transformation du lait frais en fromage Peulh au Bénin, *Guide de bonnes pratiques. Université d'Abomey-Calavi*.
- Doughari, J., & Manzara, S. 2008, In vitro antibacterial activity of crude leaf extracts of *Mangifera indica* Linn, *Afr J Microbiol Res*, 2(4), 67-72.
- Edeoga, H., Okwu, D., & Mbaebie, B. 2005, Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants, *African journal of biotechnology*, 4(7), 685-688.
- Egounléty, M., Edema, M., Yehouessi, B., & Ahouansou, E. 1994, Production et qualité du fromage Peulh (waragashi) en République du Bénin, Université Nationale du Bénin, DNSA, *Rapport de Recherche, Abomey-Calavi*, 30-33.

- Esimone, C., Adikwu, M., & Okonta, J. 1998, Preliminary antimicrobial screening of the ethanolic extract from the lichen *Usnea subfloridans* (L), *J. Pharm. Res. Dev*, 3(2), 99-101.
- Fashakin, J., & Unokiweri, C. 1993, Nutritional evaluation of 'warankasi' and 'waragusi' prepared from cow milk partially substituted with melon milk, *Nig Food J*, 11, 128-134.
- Fraga, C. G., 2009. Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology, John Wiley & Sons,
- Gaitan, e., Lindsay, r. h., Reichert, r. d., Ingbar, s. h., Cooksey, r. c., Legan, j., . . . Kubota, k. 1989, Antithyroid and goitrogenic effects of millet: role of C-glycosylflavones, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 68(4), 707-714.
- Geissman, T. A. 1963, Flavonoid Compounds, Tannins, Lignins and, Related Compounds, *Comprehensive Biochemistry*, 9, 213-250.
- Giordani, R., Siepaio, M., Moulin-Traffort, J., & Regli, P. 1991, Antifungal action of *Carica papaya* latex: isolation of fungal cell wall hydrolysing enzymes, *Mycoses*, 34(11-12), 469-477.
- Goldberg, G., 2008. Plants: diet and health, John Wiley & Sons,
- Gomez-Flores, R., Verastegui-Rodriguez, L., Quintanilla-Licea, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R., & Rodriguez-Padilla, C. 2008, In vitro rat lymphocyte proliferation induced by *Ocinum basilicum*, *Persea americana*, *Plantago virginica*, and *Rosa* spp. extracts, 2(1), 5-10.
- Gouri, K., Reddy, B. A., Chaitanya, B. S., Kumar, B. S., & Sivaiah, C. 2014, Antimicrobial investigation and phytochemical analysis on organic solvent leaf extract of *Calotropis gigantea*, *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, 5(4), 308-312.
- Gupta, A., Siddique, I. R., & Singh, J. 2000, New triterpenoid saponins from the stem of *Calotropis procera*, *Indian Journal of Chemistry*, 39B, 941-945.

- Gupta, A., Singh, R., Purwar, C., Chauhan, D., & Singh, J. 2003, Two pentacyclic triterpenes from the stem of *Calotropis procera*, *Indian Journal of Chemistry*, 42B, 2030-2033.
- Hagel, J. M., Yeung, E. C., & Facchini, P. J. 2008, Got milk? The secret life of laticifers, *Trends in plant science*, 13(12), 631-639.
- Havsteen, B. H. 2002, *Pharmacol Ther*, 96(null), 67.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Husain, S. Z., Malik, R. N., Javaid, M., & Bibi, S. 2008, ETHNOBOTANICAL PROPERTIES AND USES OF MEDICINAL PLANTS OF MORGAH BIODIVERSITY PARK, RAWALPINDI, *Pakistan Journal of Botany*, 40(5), 1897-1911.
- Iqbal, Z., Lateef, M., Jabbar, A., Muhammad, G., & Khan, M. N. 2005, Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep, *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), 256-261.
- Ishnava, K. B., Chauhan, J. B., Garg, A. A., & Thakkar, A. M. 2012, Antibacterial and phytochemical studies on *Calotropis gigantia* (L.) R. Br. latex against selected cariogenic bacteria, *Saudi journal of biological sciences*, 19(1), 87-91.
- Israili A, A. H., & Israr, R. K. 1978, *J. Res. Indian Med. Yoga Homeo.*, 120.
- Iwuoha, C. I., & Eke, O. S. 1996, Nigerian indigenous fermented foods: their traditional process operation, inherent problems, improvements and current status, *Food Research International*, 29(5), 527-540.
- Jans, C., Meile, L., Kaindi, D. W. M., Kogi-Makau, W., Lamuka, P., Renault, P., . . . Bonfoh, B. 2017, African fermented dairy products - Overview of predominant technologically important microorganisms focusing on African *Streptococcus infantarius* variants and potential future applications for enhanced food safety and security, *Int J Food Microbiol*, 250, 27-36.

- Johnson, A., & Johnson, S., 2006. Garden plants poisonous to people, NSW Department of Primary Industries,
- Joshi, R., Sharma, A., & Jat, B. L. 2009, Analysis of antioxidant activity in extracts of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br, *Journal of Applied Biosciences*, 17, 899-903.
- Kareem, S., Akpan, I., & Ojo, O. 2008, Antimicrobial activities of *Calotropis procera* on selected pathogenic microorganisms, *African journal of biomedical research*, 11(1).
- Keke, M., Yehouenou, B., Dahouenon, E., Dossou, J., & Sohounhloue, C. (2008). *Contribution à l'amélioration de la technologie de fabrication et de conservation du fromage peuhl Waragashi par injection de Lactobacillus plantarum*.
- Khan, A. Q., Ahmed, Z., Kazmi, S. N.-u.-H., & Malik, A. 1988, A new pentacyclic triterpene from *Calotropis procera*, *Journal of Natural Products*, 51(5), 925-928.
- Khan, A. Q., & Malik, A. 1989, A steroid from *Calotropis procera*, *Phytochemistry*, 28(10), 2859-2861.
- Klimczak, I., Małecka, M., Szlachta, M., & Gliszczyńska-Świgło, A. 2007, Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 313-322.
- Kori, P., & Alawa, P. 2014, Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Calotropis gigantea* root, latex extracts, *IOSR J. Pharm*, 4(6), 7-11.
- Krishnaiah, D., Devi, T., Bono, A., & Sarbatly, R. 2009, Studies on phytochemical constituents of six Malaysian medicinal plants, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(2), 67-72.
- Kumar, & Basu. 1994, Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*, *Journal of Ethnopharmacology*, 44(2), 123-125.

- Kumar, G., Karthik, L., & Rao, K. V. B. 2010, Antibacterial activity of aqueous extract of *Calotropis gigantea* leaves—an in vitro study, *International journal of pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4(2), 141-144.
- Kumar, S., Dewan, S., Sangraula, H., & Kumar, V. 2001, Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*, *Journal of Ethnopharmacology*, 76(1), 115-118.
- Kumar, S., Gupta, A., & Pandey, A. K. 2013, *Calotropis procera* root extract has the capability to combat free radical mediated damage, *ISRN pharmacology*, 2013.
- Lal, S., Kumar, P., & Pannu, D. 1985, Quercetin-3-rutinoside in *Calotropis procera*, *J. Sci. Res*, 7(1), 141-142.
- Larpant, J. P., 1997. *Microbiologie alimentaire : Techniques de laboratoire*, Lavoisier, Paris, 1073.
- Leitzmann, C. 2016, Characteristics and Health Benefits of Phytochemicals, *Complementary Medicine Research*, 23(2), 69-74.
- Lima, M. d. S., Silani, I. d. S. V., Toaldo, I. M., Corrêa, L. C., Biasoto, A. C. T., Pereira, G. E., . . . Ninow, J. L. 2014, Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced from new Brazilian varieties planted in the Northeast Region of Brazil, *Food Chemistry*, 161, 94-103.
- Little, I. M., & Mirrlees, J. A. 1974, Project appraisal and planning for developing countries, *New York*.
- Lobo, A. M., & Lourenço, A. M., 2007. *Biossíntese de produtos naturais: editado por Ana M Lobo e Ana M Lourenço*, Instituto Superior Técnico,
- Lopes, K. L. B., Thadeo, M., Azevedo, A. A., Soares, A. A., & Meira, R. M. S. A. 2009, Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atrovioleacea* (Apocynaceae, Apocynoideae), *Botany*, 87(2), 202-209.

- Mabel, T.-G. D., Javier, S.-A. E., Cynthia, G.-P. I., Jorge, W.-P., Romeo, R., & Guadal, M.-Á. G. C. 2017, Antioxidant profile of different types of herbal infusions and teas commercially available in Mexico, *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*, 31(1), 67-77.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Perez, C., Colella, M., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. 2004, Well diffusion for antifungal susceptibility testing, *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39-45.
- Mazid, M., Khan, T., & Mohammad, F. 2011, Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants, *Biology and medicine*, 3(2), 232-249.
- McCord, J. M. 2000, The evolution of free radicals and oxidative stress, *The American journal of medicine*, 108(8), 652-659.
- Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. d., Coube, C. S., & Leitão, S. G. 2001, Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, *Phytotherapy research*, 15(2), 127-130.
- Messessi, T. L. (2018). *Nutritional Quality and Safety of Processed Wagashi Cheese Using Calotropis procera Found in Benin and Kenya*. JKUAT.
- Mikail, H. 2010, Phytochemical screening, elemental analysis and acute toxicity of aqueous extract of *Allium sativum* L. bulbs in experimental rabbits, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(4), 322-326.
- Mishra, P., Yadav, K. S., & Gautam, G. 2018, Comparative qualitative and quantitative phytochemical analysis of *calotropis gigantea* and *calotropis procera* roots, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(4), 179-184.
- Molyneux, R. J., Lee, S. T., Gardner, D. R., Panter, K. E., & James, L. F. 2007, Phytochemicals: The good, the bad and the ugly?, *Phytochemistry*, 68(22), 2973-2985.

- Mungole, A., Day, S., Kamble, R., Kanfode, H., Chaturvedi, A., & Zanwar, P. 2010, Active phytochemical and antibacterial potentiality of in-vitro regenerated plantlets of *Canscora decurrens* (Dalzell), *Indian Journal of Science and Technology*, 3(6), 679-683.
- Murti, Y., Yogi, B., & Pathak, D. 2010, Pharmacognostic standardization of leaves of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Asclepiadaceae), *International journal of Ayurveda research*, 1(1), 14-17.
- Muzammal, M. (2014). *Study on antibacterial activity of Calotropis procera* (2167-9843). Retrieved from
- Nenaah, E. G., & Ahmed, M. E. 2011, Antimicrobial Activity of Extracts and Latex of *Calotropis procera* (Ait) and Synergistic Effect with Reference Antimicrobials, *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(6), 706-716.
- Nenaah, G. 2013, Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(7), 1255-1262.
- Odugbemi, T., & Akinsulire, O. 2006a, Medicinal plants according to family names, *Outlines and Pictures of Medicinal Plants from Nigeria*, Odugbemi, T.(Ed.). University of Lagos Press, Akoka, Yaba, Nigeria, 117-161.
- Odugbemi, T., & Akinsulire, O. 2006b, Medicinal plants by species names, *Outlines and Pictures of Medicinal plants from Nigeria*, 112.
- Ogundiwin. 1978, A study of the traditional manufacturing processes and chemical composition of warankasi, a Nigerian white soft cheese., *Nigerian Food Journal*(2), 72-78.
- Okwu, D. 2001, Evaluation of the chemical composition of medicinal plants belonging to Euphorbiaceae, *Pak Vet J*, 14, 160-162.
- Parrotta, J. A., 2001. Healing plants of peninsular India, CABI publishing,

- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., & Ryan, C. A. 1991, A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins, *Science*, 253(5022), 895-897.
- Philippe, S., Souaïbou, F., Paulin, A., Issaka, Y., & Dominique, S. 2012, In vitro Antifungal activities of Essential oils extracted from Fresh Leaves of *Cinnamomum zeylanicum* and *Ocimum gratissimum* against Foodborne pathogens for their use as Traditional Cheese Wagashi conservatives, *Research Journal of Recent Sciences ISSN*, 2277, 2502.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. 2000, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Quazi, S., Mathur, K., & Arora, S. 2013, *Calotropis procera*: An overview of its phytochemistry and pharmacology, *Indian J Drugs*, 1(2), 63-69.
- Quazi, S., Mathur, K., Arora, S., & Wing, P. 2013, *Calotropis procera*: An overview of its phytochemistry and pharmacology, *Indian J. Drugs*, 1(2), 63-69.
- Ramos, M. V., Freitas, C. D., Stanisçuaski, F., Macedo, L. L., Sales, M. P., Sousa, D. P., & Carlini, C. R. 2007, Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of laticifer proteins in plant defense, *Plant science*, 173(3), 349-357.
- Rayanatou, I. A., Mahamadou, E. G., Garric, G., Harel-Oger, M., Leduc, A., Jardin, J., . . . Gaucheron, F. 2017, Physico-chemical characterization of dairy gel obtained by a proteolytic extract from *Calotropis procera* – A comparison with chymosin, *Food Chemistry*, 232, 405-412.
- Roberts, M. F., 2013. Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications, Springer Science & Business Media,
- Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M., & Medina, M. 2000, Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk, *International Dairy Journal*, 10(1), 7-15.

- Senthil, S., Sivamani, P., Baskaran, C., & Jamal Mohamed, M. 2012, Evaluation of Antimicrobial activity and Phytochemical analysis of Organic Solvent extracts of *Calotropis gigantea*, *IOSR Journal of Pharmacy*, 2(3), 2012389-2012394.
- Sessou, P., Farougou, S., Azokpota, P., Youssao, I., Fanou, B., Kaneho, S., . . . Chabi-Egba, M. 2012, In-vitro antifungal activity of essential oil of *Pimenta racemosa* against fungal isolates from wagashi, a traditional cheese produced in Benin, *International Journal of Natural and Applied Sciences*, 8(1), 25-34.
- Shelef, L. A. 1984, Antimicrobial effects of spices, *journal of food safety*, 6(1), 29-44.
- Shobowale, O. O., Ogbulie, N. J., Itoandon, E. E., Oresegun, M. O., & Olatope, S. O. A. 2013, Phytochemical and Antimicrobial Evaluation of Aqueous and Organic Extracts of *Calotropis procera* Ait Leaf and Latex, *Nigerian Food Journal*, 31(1), 77-82.
- Sodipo, O., Akanji, M., Kolawole, F., & Odutuga, A. 1991, Saponin is the active antifungal principle in *Garcinia kola*, heckle seed, *Biosci. Res. Commun*, 3, 171.
- Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., & Perumalsamy, P. L. 2001, Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine, *Journal of Ethnopharmacology*, 74(3), 217-220.
- Subramanian, S. P., & Saratha, V. 2010, Evaluation of antibacterial activity of *Calotropis gigantea* latex extract on selected pathogenic bacteria, *J Pharm Res*, 3, 517-521.
- Suresh Babu, A., & Karki, S. 2012, Wound healing activity of *Calotropis gigantea* leaves in albino wistar rats, *International Journal of Pharmacy*, 2(1), 195-199.

- Teixeira de Freitas, C. D., Sousa Nogueira, F. C., Vasconcelos, I. M., Abreu Oliveira, J. T., Domont, G. B., & Ramos, M. V. 2011, Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense, *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(7), 738-743.
- Thakkar, R., Vaghela, B., & Buddhadev, S. 2014, A valuable plant *calotropis procera* linn in indian system of medicine: ayurveda, *Pharma Science Monitor*, 5(1).
- Uzogara, S. G., Agu, L. N., & Uzogara, E. O. 1990, A review of traditional fermented foods, condiments and beverages in Nigeria: Their benefits and possible problems, *Ecology of Food and Nutrition*, 24(4), 267-288.
- Valgas, C., Souza, S. M. d., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. 2007, Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.
- Wang, Z.-N., Wang, M.-Y., Mei, W.-L., Han, Z., & Dai, H.-F. 2008, A new cytotoxic pregnanone from *Calotropis gigantea*, *Molecules*, 13(12), 3033-3039.
- Yamagata, K., 2018. R. Atta ur, Chapter 10 - Endothelial Protective Effects of Dietary Phytochemicals: Focus on Polyphenols and Carotenoids, Elsevier,
- Yesmin, M. N., Uddin, S. N., Mubassara, S., & Akond, M. A. 2008, Antioxidant and antibacterial activities of *Calotropis procera* Linn, *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 4(5), 550-553.
- Yoganarasimhan, S. 2011, Medicinal plants of India. Regional research institute (Ay.) Bangalore, Tamil Ayurvedic uses and pharmacological activities of *Calotropis procera* Linn, *Asian Journal of Traditional Medicines*, 6(2), 97.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. 1999, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

ÖZGEÇMİŞ

1994 yılında Niamey (Nijer)'de doğdum. İlk ve orta öğrenimini N'djamena (Çad)'ta ve lise öğrenimini Cotonou (Benin)'de tamamladım. 2011 yılında Abomey-Calavi Üniversitesi (Benin) Ziraat Fakültesi'nde öğrenimine başladım ve 2015 yılında aynı üniversitede Beslenme ve Gıda Bilimleri'nden mezun oldum. 2015 yılında Çukurova Üniversitesi Türkçe Öğretimi Araştırma ve Uygulama Merkezinde bir akademik yıl Türkçe hazırlık sınıfından geçtikten sonra aynı üniversitede Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladım. 2017 yılında Erasmus+ Programı çerçevesinde Montpellier SupAgro (Fransa)'ya 7 ay boyunca öğrenime katıldım. Daha sonra 18.04.2018 - 17.04.2019 tarihleri arasında süren Çukurova Üniversitesi FYL-2018-10627 no'lu “ **SODOM ELMASI (*Calotropis procera*) YAPRAĞININ ANTİMİKROBİYEL VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ** projede araştırmacı olarak yüksek lisans öğrenimimi bitirdim.