

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CEVİZ VE KEREVİZ EKSTRAKTLARININ ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN
IN VITRO ORTAMDA İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Neriman ERDEM
(506141523)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER

HAZİRAN 2018

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506141523 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Neriman ERDEM, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "CEVİZ VE KEREVİZ EKSTRAKTLARININ ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN IN VITRO ORTAMDA İNCELENMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU GÜLER**.....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi İrem OMURTAG KORKMAZ.....
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi : 4 Mayıs 2018
Savunma Tarihi : 8 Haziran 2018



Aileme,



ÖNSÖZ

Öncelikle, lisans döneminde danışmanım, yüksek lisans döneminde ise tez danışmanım olarak, bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren; iyi niyet ve olumlu bakış açısıyla desteğini hep yanımda hissettiğim çok değerli hocam Doç. Dr. Funda KARBANCIOĞLU-GÜLER'e sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, çalışmam süresince ihtiyaç duyduğum her an yardımlarını esirgemeyen bölümümüz araştırma görevlisi ve asistanlarına,

Laboratuvarda birlikte çalıştığım; benzer zorlukları ve güzellikleri paylaştığım çalışma arkadaşlarıma,

Umutsuzluğumda, mutluluğumda, güneşli ve fırtınalı günlerde; ince bir dokunuşları, bir çayları, bir sarılışlarıyla; muhabbetleri, kahkahalarıyla beni tazeleyen dostlarıma, En başından beri her türlü ilgi ve desteği; şefkati ve sevgisiyle yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

Ve çalışmada kullanılan maya kültürlerinin teminini sağlayan Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ümran Soyoğul Gürer'e ve Eczacılık Tarihi Müzesi'nin kapılarını bize açarak; bitkilerin medikal kullanımının köklerini anlamama yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Afife Mat'a teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2018

Neriman Erdem
Gıda Mühendisi



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	vii
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1 Antimikrobiyal Ajanlar	3
2.2 Doğal Antimikrobiyaller	6
2.3 Doğal Antimikrobiyallerin Gıda Ürünlerinde Kullanımı	8
2.4 Bitkisel Antimikrobiyaller	11
2.5 Antimikrobiyal Maddelerin Eldesi	13
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1 Materyal	17
3.1.1 Mikroorganizmalar	17
3.1.2 Ekstrakt ve hidrosol elde etmek için kullanılan bitkiler	17
3.1.3 Besiyerleri ve çözeltiler	17
3.2 Metot	18
3.2.1 Bitki örneklerinin hazırlanması	18
3.2.2 Bitkisel antimikrobiyal madde eldesi	18
3.2.2.1 Solvent ekstraksiyonu	18
3.2.2.2 Hidrodistilasyon	19
3.2.3 Antimikrobiyal etkinin incelenmesi	19
3.2.3.1 Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması	19
3.2.3.2 Disk difüzyon yöntemi	20
3.2.3.3 Mikrodilüsyon yöntemi	20
3.2.4 İstatistiksel analiz	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1 Bitkisel Antimikrobiyal Maddelerin Eldesi	23
4.2 Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	23
4.3 Mikrodilüsyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	25
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	37
EKLER	43
ÖZGEÇMİŞ	47

KISALTMALAR

CH	: Ceviz hidrosolü
CM	: Ceviz metanol
CM	: Ceviz metanol su
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ECDC	: European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	: European Food Safety Authority
FDA	: Food and Drug Administration
FSIS	: Food Safety and Inspection Service
KH1	: Kerevizin sap ve yaprak hidrosolü
KH2	: Kerevizin sap hidrosolü
KM	: Kereviz metanol
KMS	: Kerevizmetanol su
LAB	: Laktik asit bakterileri
NaCl	: Sodyum klorür
OD	: Optik yoğunluk
PK	: Pozitif kontrol
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SDB	: Sabouraud Dextrose Broth
TSA	: Tryptic soy agar
TSA	: Tryptic soy broth
UCLA	: University of California-Los Angeles
USDA	: United States Department of Agriculture
WHO	: World Health Organization



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Gıda sektöründe kullanılan ve kullanılma potansiyeli araştırılan antimikrobiyal maddeler	7
Çizelge 2.2 : Gıda koruyucusu olarak kullanılma potansiyeli olan doğal antimikrobiyaller	10
Çizelge 2.3 : Bazı baharat, şifalı ot ve bitkilerin in vitro antimikrobiyal etkileri.....	16
Çizelge 4.1 : Ekstraktların ve hidrosollerin E. coli ve S. aureus üzerine etkisi.....	24
Çizelge 4.2 : Ekstraktların ve hidrosollerin Candida spp üzerine etkisi.....	25
Çizelge 4.3 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında Staphylococcus aureus bakterisine karşı gösterdiği etki.....	25
Çizelge 4.4 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında E.coli bakterisine karşı gösterdiği etki.....	27
Çizelge 4.5 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında C.albicans ATCC 10231 suşuna karşı gösterdiği etki.....	28
Çizelge 4.6 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında C.albicans ATCC 36802 suşuna karşı gösterdiği etki.....	29
Çizelge 4.7 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında C. krusei KUEN 1001 suşuna karşı gösterdiği etki.....	31
Çizelge 4.8 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında C.krusei suşuna karşı gösterdiği etki.....	32



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 2.1** : Esansiyel yağ ve ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri olduğu bilinen turunçgil familyasından mandalinalar.....26
- Şekil 4.1** : Ekstrakt ve hidrosollerin *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerine etkisi.....27
- Şekil 4.2** : Ekstrakt ve hidrosollerin *E. coli* ATCC 25922 suşu üzerine etkisi.....28
- Şekil 4.3** : Ekstrakt ve hidrosollerin *C. albicans* ATCC 10231 suşu üzerine etkisi...29
- Şekil 4.4** : Ekstrakt ve hidrosollerin *C. albicans* ATCC 36802 suşu üzerine etkisi...30
- Şekil 4.5** : Ekstrakt ve hidrosollerin *C. krusei* KUEN 1001 suşu üzerine etkisi.....31
- Şekil 4.6** : Ekstrakt ve hidrosollerin *C. krusei* ATCC 6258 suşu üzerine etkisi.....32



CEVİZ VE KEREVİZ EKSTRAKTLARININ ANTIMİKROBİYAL ETKİSİNİN IN VITRO ORTAMDA İNCELENMESİ

ÖZET

Gıda ürünlerindeki bozulmaların önemli bir kısmı mikrobiyal kaynaklıdır. Mikroorganizmaların kontrolü, hem işlenmiş son üründe hem de hasat öncesi ve sonrası hammaddede yol açabilecekleri sorunlar nedeniyle gıda sektöründe önem arz etmektedir. Gıda güvencesi ve güvenliği açısından bu mikroorganizmaların etkin bir şekilde inhibe edilmesi gerekmektedir.

Antimikrobiyal maddeler gıdalarda mikroorganizmaların kontrolü için uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Antimikrobiyal maddeler doğal veya sentetik kaynaklı olabilmektedir. Son yıllarda ise çevre ve sağlık alanlarında artan tüketici farkındalığıyla birlikte, sentetik katkı maddelerinin gıda ürünlerinde kullanımı ciddi bir tartışma konusudur. Tüketicinin sağlıklı, az işlem görmüş, besin değeri yüksek gıdaya yönelik talebi, gıda sektörünün de bu yönde ilerlemesine itici güç olmaktadır. Tüketicilerin sentetik katkılara karşı ön yargıları ve bazı katkı maddelerinin sağlık üstündeki istenmeyen etkilerinden dolayı doğal gıda katkı maddelerine olan ilgi artmaktadır. Aynı zamanda son yıllarda dünya çapında önemli bir sorun olarak nitelendirilen antimikrobiyal direnci de yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılmasına zemin oluşturmuştur. Bu katkı maddelerinden bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar ve bitki ekstraktları, doğal antimikrobiyaller arasında önemli yer tutmaktadır.

Doğal antimikrobiyaller, bitkilerin yaprak, çiçek, sap ve kabuk gibi dokuları ile çeşitli hayvansal dokulardan ve mikroorganizmalardan elde edilen; patojen mikroorganizmalar üzerinde öldürücü veya gelişimlerini inhibe edici (durdurucu) etkileri olan çeşitli kimyasal yapıdaki bileşiklerdir.

Bitkisel ve hayvansal dokularda doğal olarak bulunan pek çok antimikrobiyal ajan, bitki ve hayvanların binlerce yıllık evrimleşme süreçlerinde çevrelerindeki zararlılara karşı geliştirdikleri savunma mekanizmasının bir parçasıdır. Bitkiler esas olarak otçullara av olmaktan, böcek ve parazit istilalarından korunmak için çeşitli fiziksel ve kimyasal savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitkilerin kimyasal savunma mekanizması olarak ürettiği terpenoidler, fenolik bileşikler gibi metabolitler; bugün bitkisel doğal antimikrobiyal ajan olarak kullanılan esansiyel yağ ve bitki ekstraktlarının da yapısını oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasında kereviz ve cevizin antimikrobiyal etkisi in vitro ortamda incelenmiştir. Kerevizin sap ve yaprakları, cevizinse yeşil dış kabuğu ekstrakt eldesinde kullanılmıştır. Ekstraktlar, metanol ve metanol/su (50:50, v/v) solventleri kullanılarak ve ultrason destekli solvent ekstraksiyon yöntemiyle, hidrosoller ise hidrodilasyon yöntemiyle elde edilmiştir.

Antimikrobiyal etkinin belirlenmesinde, disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal etkinin incelendiği mikroorganizmalar ise *Escherichia coli* ATTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 bakterileri ile *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 36802, *Candida krusei* KUEN 1001 ve *Candida krusei* 6258 mayalarıdır.

Disk difüzyon yöntemi bulgularına göre çalışılan mikroorganizmalar arasında ekstrakt ve hidrosollere karşı en dirençsiz mikroorganizmanın *E. coli* 'nin olduğu tespit edilmiştir. Ekstraktlar arasında test edilen mikroorganizmalar üzerine en etkili olanı ise cevizin metanol ekstraktıdır. Mikrodilüsyon yönteminde ekstrakt ve hidrosol varlığında mikroorganizma gelişmesi belirli zaman aralıklarında 2 gün boyunca izlenmiştir.

Ceviz ekstraktları ve kerevizin metanol-su ekstraktının en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu ekstraktlar hem bakteri suşları hem de maya suşları üzerinde farklı seviyelerde etki göstermişlerdir. Mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen verilere göre *E.coli* ve *S.aureus* bakterileri üzerinde ceviz ekstraktlarının kereviz ekstraktlarına oranla daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Hidrosoller genel olarak önemli düzeyde bir etki göstermemekle birlikte ceviz hidrosolünün *S. aureus* bakterisi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Ceviz ekstraktları ve kerevizin metanol-su ekstraktlarının bakteriler üzerinde olduğu gibi mayalar üzerinde de yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bulunmuştur.

IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL EFFECT OF WALNUT AND CELERY EXTRACTS

SUMMARY

The greatest majority of deteriorations of food product originates from microorganisms. Microbial control has a vital importance for food industry, because of its possible effects on both processed foods and raw materials. Inhibition of microorganisms is essential for food safety and food security.

There is a multifaceted interaction among food and microorganisms and we can use this interaction in different fields such as fermentation, biopreservation, and functional food production. On the other hand, most of microorganisms pose a serious risk to food safety and may lead to the deterioration of food products.

According to the US Food and Drug Administration (FDA), it was estimated that 48 million foodborne illnesses occurred annually in the United States. Approximately 3,000 of these diseases result in death (FDA, 2016). In addition to pathogenic microorganisms leading to the disease; mold and bacteria may cause impairment, deterioration, and quality loss in food products during during preharvest, post harvest, processing and storage period. To control these problems, it is necessary to control pathogenic and spoilage microorganisms.

Lots of methods are used to inhibit and destroy microorganisms. It is possible to group these methods under two main titles: thermal and non-thermal methods. New food processing technologies and antimicrobials are among the non-thermal methods.

Ever since ancient times to nowadays, antimicrobial agents have been using to control of microorganisms. Antimicrobial agents might be obtained from natural sources or produced by synthetically. However, utilization of synthetic antimicrobial agents to preserve food products have been seriously debated of late years, by reason of increasing awareness to health and environmental matters. Consumer demand devoted to healthy, minimally processed, nutrient food products set food industry in motion to progress in this sense. At the same time, antimicrobial resistance which has been described as world-wide significant trouble has provided basis to search of novel, natural antimicrobial agents. Essential oils and plant extracts are important groups among natural antimicrobial agents.

Natural antimicrobials may have microbicidal or microbiostatic effects on microorganisms. They have been obtained from several parts of plants such as flower, stem, husk or root, and also animal tissues and microbial metabolites. Many antimicrobial agent which found in animal or plant tissues is part of defense mechanism against harmful organism that they had been improving throughout their evolution process.

Chemical and physical defense mechanisms, improved by plants are essentially in order to prevent parasitical invasion and hunting by herbivores. The plants produce

components which called seconder metabolites as the result of this mechanism. Seconder metabolites have not first hand function on plant growing.

Producing metabolites by plants such as terpenoids and phenolic compounds creates structure of essential oils and plant extracts which used as an antimicrobial agent nowadays. Major phytochemical groups which show antimicrobial activity are terpenoids and phenolic compounds, essential oils and alkaloides.

At present, there are great diversity of plant seconder metabolites such as; 12 000 of alkaloides, 8000 of phenolic compounds and 25 000 of terpenoides. These diversity of phytochemicals and experienced novel research efforts hold promises for discovery of plant based antimicrobial compounds.

Today, plant origin antimicrobial compounds have lots of several application field. Not just food sector and also many industrial sector which faces to microbial contamination problem, look for ways to benefit from natural antimicrobial compounds. Thus research centers and sciencists also have been searching about natural antimicrobials.

Natural antimicrobial agents are used in a wide variety of food groups such as lightly processed foods and vegetable juices, milk and dairy products, meat/ fish products and cereals. Also, other potential usages and different application methods are being investigated. Antimicrobial agents can be incorporated directly into the content, or the foodstuff can be coated with an antimicrobial agent. It is also possible to use them for the development of innovative (intelligent) packaging systems.

It is also possible to discuss the use of natural antimicrobials with different combinations. The creation of edible biofilms that acquire antimicrobial properties by the addition of antimicrobial agents is an example of this. Antimicrobial films can be used in packaging and coating; extend the shelf life of the product; help to protect the quality.

Multidrug antimicrobial resistance is a novel challenge of the milennial ages. The primary overuse and misuse consumption of antimicrobial drugs. Many classical antimicrobial agent is not effective to multidrug resistant pathogen microorganisms. So cooperating efforts to renew research exertions, and pursue steps to manage the crisis are needed. Novel natural antimicrobial researches also seem as a part of solution steps.

In this study, antimicrobial effects of celery leaves and stems and walnut husk extracts have been evaluated in vitro conditions. Celery stems and leaves, walnut green husks have been utilized as extraction materials. Plant extracts have obtained by using methanol and metahanol/water (50:50, v/v) solvents through method of ultrasound assisted solvent extraction. Plant samples have been mixed with extraction solvent in proportion as 1:20 g/ml. The blends of solvent and plants have been treated among 1 hour by ultrasonic cleaner equipment.

As for hydrosols; they have attained by applying hydrodistillation method by using Clevenger apparatus. Plant samples have been mixed with distilled water in proportion as 1:3 g/ml. The hydrodistillation process have been applied among 100-120°C throughout 3 hour.

Disk diffusion and micro dilution methods have been used for determination antimicrobial activity of plant extracts and hydrosols against *Escherichia coli* ATTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 bacteria and *Candida albicans* ATCC

10231, *Candida albicans* ATCC 36802, *Candida krusei* KUEN 1001 ve *Candida krusei* 6258. Optic values of microplates have been performed measurement at intervals throughout the 48 hours. The results obtained by measurements have been evaluated and shown as graphically for each microorganisms.

Disk diffusion and micro dilution antimicrobial test methods respectively have been applied to reach the antimicrobial effect results. In order to achieve more accurate and measurable results micro dilution antimicrobial test method has been also used under the consideration of the inhibition zone diameters may not exactly quantifiable at the disk diffusion method. In this manner, antimicrobial activity findings of both methods have been evaluated in tandem.

One way ANOVA method has been used to test antimicrobial activity of plant extracts and hydrosols. Averages of values have been tested by using Duncan test.

The highest antimicrobial activities have been seen at the extracts of the green walnut husk and the celery methanol-water extracts. These extracts showed impacts in different levels on all bacterial and yeast strains. In the facts of light by microdilution methods the green walnut husk extracts has higher antimicrobial activities on *E. coli* and *S. aureus* in comparison to the celery extracts.

Besides the hydrosol groups generally had no effects on microorganisms, the green walnut husk hydrosols showed impacts on the *S. aureus* ATCC 25923 strain.

As it be observed that the extracts of the green walnut shell and the celery methanol-water has high antimicrobial activities on the bacterias it also seen at the yeasts. In according to microdilution method results it is remarkable that the celery methanol-water extracts has great impact especially on *C. albicans* strains.

Phenolic compounds and nitrogene containing compounds which found in celery are water soluble. Because of these water soluble compounds, antimicrobial activity of methanol water extraction of celery might be increased.

In the light of all that outputs, solvent and applied methods to test antimicrobial activity directly effect results. So suitable parameters should be considered for each experimental design. Besides metabolites which found in extracts and had specific role on antimicrobial activity should be analysed by quantitative analysis. Novel methods should be improved such as super critic extraction and sub critic extraction. Green extraction methods should be given precedence due to severity of rapidly increasing population and consumption on natural resources. And also food wastes which caused by food sector or agricultural practices need to be reused for sustainable processes.

Eventually, natural antimicrobials are focus of interest both for science society and food industry. Studies are promising to use novel and natural antimicrobials in future. But natural antimicrobials need to be truly applicable on food products in terms of consumer demands, organoleptic features of food product and cost of production.



1. GİRİŞ

Gıda maddeleri, hammadde olarak üretim aşamasından başlayarak tüketiciye ulaşana kadar pek çok aşamada mikroorganizmalarla bulaşma riski taşımaktadır. Bununla birlikte tarih öncesi çağlardan beri insanlar gıdalarının üretiminde ve saklanmasında mikroorganizmalardan faydalanmışlardır. Fakat mikroorganizmaların hem gıdaların saklanmasında hem de gıdaların bozulması ve hastalığa sebep olmasındaki rolü yıllar sonra anlaşılmaya başlanmıştır. MÖ. 116 – 29 yılları arasında yaşayan Marcus Terentius Varro, Tarım Üzerine adlı eserinde gözle görülmeyen, ağız ve burun yoluyla vücuda giren ve ciddi hastalıklara yol açan yaratıkların varlığından bahsetmektedir (Varro, 1912).

Bu gizemli canlıların bilimsel olarak tanımlanmaları ise mikroskobun keşfiyle mümkün olmuştur. Gıdalardaki mikroorganizmalar, ilk olarak veba salgını için araştırmalar yaptığı sırada A. Kircher tarafından 1658 yılında fark edilmiştir (The Museum of Jurassic Technology, 2001). İlerleyen yıllarda Robert Hook tarafından hücrenin yapısı tanımlanmış; Antony van Leeuwenhoek tarafından yağmur suyu, sirke, tükürük gibi farklı ortamlardaki bakteriler gözlemlenmiştir. Mikroskopların teknik özellikleri geliştikçe bu keşif süreci daha da hızlı devam etmiştir (Ray & Bhunia, 2013). Louis Pasteur (1861) mikroorganizmaların havada var olduğunu ve havadan bulaşabileceğini göstermiş, Robert Koch (1876) ise mikroorganizmaların hastalığa yol açtığını kanıtlamıştır.

Günümüzde, gıda ile mikroorganizmalar arasında çok yönlü bir etkileşimin varlığı bilinmekte olup; fermantasyon, biyokoruma ve fonksiyonel gıda üretimi gibi birçok alanda mikroorganizmalardan faydalanılmaktadır. Öte yandan ise pek çok mikroorganizma gıda güvenliği için ciddi bir risk oluşturmakta ve gıda ürünlerinde bozulmalara yol açmaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresinin (FDA) verilerine göre Amerika’da yılda 48 milyon gıda kaynaklı hastalık olduğu tahmin edilmektedir. Bu hastalıkların yaklaşık 3000’i ölümlle sonuçlanmaktadır (FDA, 2016). Bu hastalıkların neden olduğu tedavi masrafları ve üretkenlik kaybının mali değeri ise 55,5 milyon \$ olarak bildirilmiştir (Scharff, 2015).

Günümüzde gıda sisteminin küreselleşmesi gıda kaynaklı hastalıkların da kıtalar ve sınırlar arası kolayca yayılmasına zemin oluşturmaktadır. Gıda kaynaklı hastalıklar mikrobiyal ve kimyasal bulaşmalardan kaynaklanabilir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya genelinde gıda kaynaklı hastalıkların yarısı mikrobiyal kökenlidir. Özellikle temiz su ve gıdaya erişim hakkından yoksun bölgelerde mikrobiyal kaynaklı hastalıklar ciddi bir halk sağlığı problemidir. Mikrobiyal hastalıklar dünyada her yıl 550 milyon kişinin hastalanmasına; 5 yaş altı 96 000 çocuğun ise ölümüne yol açmaktadır. (WHO, 2015).

Hastalığa yol açan patojen mikroorganizmaların yanı sıra, gıda ürünlerinde hasat öncesi ve sonrasında bozulmalara, çürümelere ve kalite kaybına yol açan küf ve bakteriler de gıda sektöründe önemli bir sorun teşkil etmektedir.

Mikroorganizmaların yol açtığı gıda kaybı, kalite ve emek kaybı, enfeksiyon ve intoksikasyon gibi sağlık problemleri bu canlıların kontrol edilmesini zorunlu kılmaktadır. Mikroorganizmaların inhibe edilmesi ve yok edilmesi için pek çok yöntem uygulanmaktadır. Bunlar ısı ve ısı olmayan yöntemler olmak üzere iki temel başlık altında toplanabilir. Yeni gıda işleme yöntemleri ve antimikrobiyal ajanlar ısı olmayan yöntemlerdendir. Antimikrobiyal ajanlar kimyasal koruyucular olarak FDA tarafından gıda katkı maddeleri arasında tanımlanmıştır (Branen, 1993).

Antimikrobiyal maddeler gıdalarda mikroorganizmaların kontrolü için uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Antimikrobiyal maddeler doğal veya sentetik kaynaklı olabilmektedir. Tüketicilerin sentetik katkılarına karşı ön yargıları ve bazı katkı maddelerinin istenmeyen etkilerinden dolayı doğal gıda katkı maddelerine olan ilgi artmaktadır. Aynı zamanda son yıllarda dünya çapında önemli bir sorun olarak nitelendirilen antimikrobiyal direnci de yeni antimikrobiyal maddelerin araştırılmasına zemin oluşturmuştur. Bu katkı maddelerinden bitkilerden elde edilen esansiyel yağlar ve bitki ekstraktları, doğal antimikrobiyaller arasında önemli yer tutmaktadır.

Bu çalışma kapsamında farklı bitki atıklarından elde edilen ekstraktların ve hidrosollerin patojen bakteri ve mayalara karşı antimikrobiyal etkisinin incelenmesi ve atıkların fonksiyonel bir şekilde değerlendirilmesine katkı sunulması hedeflenmektedir

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Antimikrobiyal Ajanlar

Antimikrobiyal kelimesi Latince’de karşı anlamındaki *anti*, küçük anlamındaki *mikros* ve hayat anlamına gelen *bios* kelimelerinin birleşiminden türemiştir ve mikroorganizmalara karşı etkili tüm maddelere işaret etmektedir (Michigan State University, 2011). Antimikrobiyal tanımı; antifungal, antibakteriyel, antibiyotik gibi tüm tanımları kapsar.

Antimikrobiyal ajanların keşfi literatürde tıbbi alandaki ihtiyaç ve kullanımlarıyla ön plana çıkmaktadır. Bu alanda en çok göze çarpan grupsa antibiyotiklerdir. Antibiyotikler bakteriyel kaynaklı enfeksiyon hastalıklarını tedavi etmekte kullanılan antimikrobiyal ajanlardır (WHO, 2018). Yapılan son araştırmalara göre antimikrobiyal ajanların uzun bir geçmişi vardır. Literatürde antibiyotik çağ olarak adlandırılan dönem genellikle 20. yüzyılda penisilinin keşfini başlangıç olarak kabul etmektedir. Penisilinin keşfi Alexander Fleming ve enfeksiyon hastalıklarında ilk kullanan Howard Florey 1945 yılında Nobel ödülü almışlardır. Ancak yaygın inanışın aksine M.S. 350 yıllarından kalan insan iskeletlerinde antibiyotik ajanlara (tetrasiklin) rastlanmıştır. Bu dönemdeki antimikrobiyallerin toprak kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Aminov, 2010).

Gıda maddelerinde kullanılan antimikrobiyaller ise, koruyucu olarak da bilinmektedir. Bu maddeler, mikrobiyal kaynaklı bozulmaları önleyerek, gıdanın raf ömrünü uzatırlar. Mikrobiyal kaynaklı bozulmalar; mikroorganizma faaliyeti sonucu gıdanın yapısındaki değişimler nedeniyle gıda güvenilirliğinin azalmasına neden olur. Gıdalarda bulunan besin öğeleri, genel olarak mikroorganizma olarak adlandırılan bakteri, maya ve küflerin gelişmesi için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Gıda güvenliği açısından, bozulmaya neden olan saprofit mikroorganizmalar ile gıda zehirlenmesi veya enfeksiyona yol açan patojen mikroorganizmaların kontrolü önem taşımaktadır. Gıdanın kalitesini olumsuz yönde etkileyen pek çok etken olmasına

rağmen, mikroorganizmaların yol açtığı bozulmalar, gıdalarda istenmeyen ve özellikle insan sağlığı açısından risk oluşturan en önemli bozulmalardandır (Ova, 2009).

Antimikrobiyal ajanların mikroorganizmalar üstünde çeşitli etki mekanizmaları vardır. Bu maddeler mikroorganizmaların genetik sistemini etkileyerek, hücre çeperi ve membranında hasara yol açarak ya da enzimlerini inhibe ederek etki gösterirler. Antimikrobiyaller mikroorganizma üzerinde gösterdikleri etkiye göre de biyostatik ve biyosidal olarak iki gruba ayrılırlar. Biyostatik maddeler mikroorganizmaların gelişme ve çoğalmasını durdururken, biyosidal maddeler ise mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etki gösterirler. Mikroorganizmanın cinsi, ortamın fizikokimyasal özellikleri, gıda maddesine uygulanan işlemler gibi birçok faktör antimikrobiyal maddelerin özelliğini etkilemektedir.

Günümüzde kullanımına izin verilen ve üstünde çalışılmaya devam edilen antimikrobiyal maddeler ve genel kullanım alanları Çizelge 2.1 de verilmiştir.

Ayrıca mikroorganizmalar, hızlı evrimleşebilme özellikleri sayesinde etkin bir şekilde ortama uyum sağlayıp antimikrobiyallere karşı direnç geliştirebilmektedir. Son yıllarda özellikle antibiyotiklerin hem sağlık, hem de tarım ve hayvancılık uygulamalarında yaygınlaşan kontrolsüz kullanımı bu sorunu da beraberinde getirmiştir (WHO, 2017). Birçok kurum ve kuruluş antibiyotik – antimikrobiyal kullanımıyla ilgili halkı ve ilgili kişi ve işletmeleri bilgilendirme çalışmaları düzenlemekte, konuyla ilgili rapor ve bildirimler yayınlamaktadır.

Antimikrobiyal direnç mikroorganizmaların maruz kaldıkları antimikrobiyal maddelere karşı gösterdikleri savunma mekanizmasıdır. Bunun sonucu, kullanılan antimikrobiyal maddeler mikroorganizmalar üstünde etkisiz kalmakta; mikrobiyal kaynaklı hastalıkların yayılması artış göstermektedir. Dünya sağlık örgütü (WHO), antimikrobiyal direncini insan sağlığını tehdit eden üç önemli etkenden biri olarak tanımlamaktadır (WHO, 2014).

Mikroorganizmalar zaman içerisinde doğal olarak antimikrobiyal direnç gösterebildikleri gibi; günümüzdeki problem özellikle antibiyotiklerin hatalı veya aşırı kullanımından dolayı bu sürecin oldukça hızlanmış olmasıdır. İnsan ve hayvan sağlığı için kullanılan antibiyotikler; antimikrobiyal direncin en önemli nedenleri arasında gösterilmektedir (Şahin, 2017).

Günümüzde pek çok ülkede yasaklanmasına rağmen hayvan yemlerinde hayvanın et miktarını arttırmak için kullanılan antibiyotikler de sorunun önemli bir ayağıdır. Tarım ve gıda sektörü antimikrobiyal direncin oluşması ve taşınmasında belirgin bir pay sahibidir.

Çizelge 2.1 : Gıda sektöründe kullanılan ve kullanıma potansiyeli araştırılan antimikrobiyal maddeler

Antimikrobiyal Madde	Çeşitleri	Etki (Kullanım alanı)
Asitler ve tuzları	Sorbik asit Potasyum sorbat Benzoik asit Sodyum benzoat	Mantar ve mayalara karşı etkileri daha fazladır. Ve pH değeri düşük asidik gıdalarda kullanımı etkilidir.
Kükürt dioksit ve sülfidler	Sülfür dioksit Sodyum sülfid Sodyum metabisülfid Potasyum sülfid	Mikroorganizmaların kontrolünde ve kararmaları önlemek için enzim inhibitörü olarak kullanımı yaygındır.
Nitrat ve nitritler	Potasyum nitrit Sodyum nitrit Sodyum nitrat Potasyum nitrat	İşlenmiş et ürünlerinde karakteristik kırmızı rengi korumak ve botulinum riskini önlemek amacıyla kullanımı yaygındır.
Antibiyotikler-Bakteriyosinler *	Nisin Natamisin	
Koruyucu gazlar	Karbondioksit Etilen Propilen oksit	
Diğer antimikrobiyalere	Dimetil karbonat Heksamin Bifenil	
Doğal kaynaklı antimikrobiyaller**	Mikrobiyal kaynaklı Hayvansal kaynaklı Bitkisel kaynaklı	In vitro ortamda ve gıdalar üstünde çalışmalar devam etmektedir**

* Bakteriyosinler, mikroorganizmaların ürettiği, bakteriler üstünde etkili olan doğal antibiyotik maddelerdir. Diğer antibiyotiklerin gıda maddelerinde kullanımı yasaklanmıştır (Lück & Martin, 1997). Ancak hayvan sağlığı ve besicilikte antibiyotik maddelerin kullanımı devam etmektedir.

** Doğal antimikrobiyaller, ilerleyen bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Yapılan pek çok araştırmada patojen mikroorganizmalar dahil olmak üzere birçok mikroorganizmada antimikrobiyal direnç geliştiği ortaya konulmaktadır. Gıda kaynaklı birçok patojen de antimikrobiyal direnç sergilemektedir.

Söz konusu patojenler arasında ilk akla gelen mikroorganizmalar olarak *Salmonella* spp. *Campylobacter* spp. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* sayılmaktadır (EFSA & ECDC, 2018).

2.2 Doğal Antimikrobiyaller

Doğal antimikrobiyaller bitkilerin yaprak, çiçek, sap ve kabuk gibi dokuları ile çeşitli hayvansal dokulardan ve mikroorganizmalardan elde edilen; patojen mikroorganizmalar üzerinde öldürücü veya gelişimlerini inhibe edici (durdurucu) etkileri olan çeşitli kimyasal yapıdaki bileşiklerdir.

Bitkisel ve hayvansal dokularda doğal olarak bulunan pek çok antimikrobiyal ajan, bitki ve hayvanların binlerce yıllık evrimleşme süreçlerinde çevrelerindeki zararlılara karşı geliştirdikleri savunma mekanizmasının bir parçasıdır. Bitkiler esas olarak otçullara av olmaktan, böcek ve parazit istilalarından korunmak için çeşitli fiziksel ve kimyasal savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Sánchez-Sánchez & Morquecho-Contreras, 2017). Bitkilerin kimyasal savunma mekanizması olarak ürettiği terpenoidler, fenolik bileşikler gibi metabolitler; bugün bitkisel doğal antimikrobiyal ajan olarak kullanılan esansiyel yağ ve bitki ekstraktlarının da yapısını oluşturmaktadır (CAST, 1998).

Mikroorganizmalar bir yandan gıda güvenliği için önemli bir sorun kaynağıyken, bir yandan da pek çok mikroorganizma gıda ürünlerinin korunmasında rol alır. Bitkilerde olduğu gibi mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri sonucu ürettiği metabolitlerin bir kısmı da antimikrobiyal özellik göstermektedir. Bunlardan en bilineni antik çağlardan beri uygulanan fermantasyon işlemi sonucu oluşan metabolitlerdir. Fermantasyon uygulamasında kullanılan laktik asit bakterileri (LAB), laktik asit gibi çeşitli organik asitler ile bakteriyosin, hidrojen peroksit ve reuterin gibi antimikrobiyal metabolitler üretirler. Bakteriyofaj adıyla anılan virüsler de son yıllarda özellikle antibiyotik direncine karşı araştırılan mikrobiyal antimikrobiyaller arasındadır (Acharya ve diğ., 2011).

Mikroorganizma ve bitkiler gibi bazı hayvansal doku ve gıdalarda da antimikrobiyal ajanlar bulunmaktadır. Laktoferrin, lizozim, laktoperoksidaz bileşikleri sütün yapısında doğal olarak bulunmakta ve antimikrobiyal özellik göstermektedir (Yılmaz & Tosun, 2012). Yine lizozim, kistatin, avidin gibi protein yapıdaki bazı bileşikler

yumurtanın yapısında doğal olarak bulunan doğal antimikrobiyal bileşiklerdir (Guyot, ve diğ., 2013). Bu doğal olarak üretilen antimikrobiyal bileşikler, bitkilerde olduğu gibi öncelikle kendini muhafaza etmeye yönelik evrimsel mekanizmalardır. Yumurta ve sütün yapısında bulunan peptid bileşikler ile kabuklu deniz hayvanlarından elde edilen kitosan en çok bilinen hayvansal kaynaklı antimikrobiyaller arasındadır. Çizelge 2.2’de gıda koruyucusu olarak kullanılma potansiyeli olan doğal antimikrobiyaller verilmiştir (Lawley, 2010)

Çizelge 2. 2 : Gıda koruyucusu olarak kullanılma potansiyeli olan doğal antimikrobiyaller

Antimikrobiyal özellik gösteren bitkiler	Mikrobiyal Kaynaklı Antimikrobiyaller	Hayvansal Kaynaklı Antimikrobiyaller
Fesleğen	Asidofilin	Kitosan
Kakule	Bulgarisin	Defensin
Tarçın	Kolisin	Laktoferrin
Karanfil	Helvetisin	Laktoperoksidaz sistemi
Kişniş	Laktasin	Lisozim
Kimyon	Natamisin	Pleurosidin
Rezene	Nisin	
Sarımsak	Pediosin	
Üzüm	Plantarisin	
Yeşilçay	Reuterin	
Mercanköşk		
Nane		
Hardal		
Muskat		
Soğan		
Keklikotu		
Biberiye		
Adaçayı		
Kekik		

Doğal antimikrobiyallerin tek başlarına olduğu gibi birlikte veya farklı yöntemlerle bir araya getirilerek kullanımı da söz konusudur. Antimikrobiyal ajanların eklenmesiyle antimikrobiyal özellik kazanan yenilebilir bio-filmlerin oluşturulması buna bir örnektir. Antimikrobiyal filmler paketleme ve kaplamada kullanılabilmekte; ürünün raf ömrünü uzatmakta; kalitenin korunmasına yardımcı olmaktadır. Çalışmalarda farklı kaynaktan gelen antimikrobiyallerin birlikte kullanımından doğan sinerjistik etkilerinin var olup olmadığı araştırılmaktadır (Rai & Chikindas, 2011).

2.3 Doğal Antimikrobiyallerin Gıda Ürünlerinde Kullanımı

Gıda ürünlerindeki bozulmaların büyük bir kısmı mikrobiyal kaynaklıdır. Mikroorganizmaların kontrolü, hem işlenmiş son üründe hem de hasat öncesi ve sonrası hammaddede yol açabilecekleri sorunlar nedeniyle gıda sektöründe büyük önem arz etmektedir. Gıda güvenesi ve güvenliği açısından bu mikroorganizmaların etkin bir şekilde inhibe edilmesi gerekmektedir.

Isıl işlem, fermantasyon, kurutma, tuzlama gibi işlemler geleneksel koruma ve saklama yöntemleri olarak çok eski yıllardan beri uygulanmaktadır. Ancak bu yöntemler değişen üretim ve tüketim alışkanlıklarıyla birlikte her zaman yeterli olmamış, yıllar içerisinde gıdayı işleme ve koruma yöntemleri gelişip çeşitlenmiştir. Temel bilimlerde yaşanan gelişmeler ve endüstriyelleşme gıdayla olan ilişkimize de yansımıştır. Kimya bilimindeki ilerlemelerle yeni sentetik antimikrobiyal maddeler keşfedilmiştir (Davidson ve diğ., 2001). Gıda katkı maddesi olarak pek çok paketli ürünün saklanması için kullanılmışlardır. Son yıllarda ise çevre ve sağlık alanlarında artan tüketici farkındalığıyla birlikte, sentetik katkı maddelerinin gıda ürünlerinde kullanımı ciddi bir tartışma konusu olmuştur. Tüketicinin sağlıklı, az işlem görmüş, besin değeri yüksek gıdaya yönelik talebi, gıda sektörünün de bu yönde ilerlemesine itici güç olmuştur. Colorado State Üniversitesi'nden Profesör John N. Sofos bu konuya daha 1998 yılında şöyle vurgu yapmaktadır: "Sentetik gıda katkı maddelerinin olası toksikolojik problemlere yol açacağı yönündeki tüketici algısı, gıda endüstrisinde de doğal bileşiklerin kullanımına yönelik bir alaka oluşturuyor. Ve doğal ürünlere artan talep, bu ürünlerde kullanılabilecek doğal antimikrobiyallerin geliştirilmesi ve kullanımına olan ilgiyi artırıyor"

Doğal ve az işlem görmüş olan gıda ürünlerine artan talep, hem bilimsel çalışmalarda artışa hem de sektörde dönüşüm adımlarının atılmasına neden olmuştur. Son dönemlerde, doğal ve yenilenebilir kaynaklara yönelik ilgi özellikle gıda ve biyomedikal alandaki uygulamalarda doğal antimikrobiyallerin kullanımını arttırmıştır (Nobile ve diğ., 2012).

Az işlem görmüş gıdalar ve sebze suları, süt ve süt ürünleri, et ürünleri, balık ürünleri ve tahıl ürünleri gibi çok çeşitli gıda gruplarında doğal antimikrobiyal ajanlar kullanılmakta veya kullanım potansiyelleri incelenmekte; uygulama yöntemleri araştırılmaktadır. Antimikrobiyal ajanlar doğrudan gıda ürününün içeriğine

katılabilmekte, gıda maddesi antimikrobiyal ajanla kaplanabilmekte veya inovatif (akıllı) paketleme sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Lucera ve diğ., 2012).

Taze meyve sebzeler; meyve ve sebze suları, yemeye hazır salata gibi; işlem görmemiş veya az işlem görmüş ürünler gıda sektöründe büyüyen bir paya sahiptir. Özellikle, az işlem görmüş bu ürünlerin korunması ve kalitelerinin geliştirilmesi gıda güvenliği ve tüketici memnuniyeti açısından önem arz etmektedir.

Yapılan bir çalışmada elma suyunda çoğalması istenmeyen, fermantasyona yol açan *Saccharomyces bayanus* mayasının doğal antimikrobiyal ajanlar ve yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği kullanılarak gelişiminin önlenmesi araştırılmıştır. Antimikrobiyal olarak, firmalardan alınan D-limonen ve turunçgil (greyfurt, portakal, mandalina) ekstraktı kullanılan bu çalışmada, homojenizasyon ve antimikrobiyal ajanların ayrı ayrı ve kombine halde etkileri incelenip, tüketici testi yapılmıştır. Homojenizasyon uygulamasının başlangıç kontaminasyonunu azalttığı, antimikrobiyal ajanların ise maya gelişmesini inhibe ettikleri görülmüştür. Tüketici testleri sonucunda ise turunçgil ekstraktının kullanımı uygulanabilir bulunmuştur (Bevilacqua ve diğ., 2012). Şekil 2.1'de esansiyel yağ ve ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri olduğu bilinen turunçgil familyasından mandalinalar gösterilmiştir.



Şekil 2.1 : Esansiyel yağ ve ekstraktlarının antimikrobiyal özellikleri olduğu bilinen turunçgil familyasından mandalinalar

Bir başka çalışmada ise taze fesleğen yapraklarından elde edilen pastörizasyon ve asidifikasyon işlemleri uygulanmayan pesto sosuna, nisin ve ksilotol ilavesinin mikrobiyolojik stabiliyeye katkısı araştırılmıştır. Ksilotol su aktivitesini azaltırken, nisin ilavesi bazı patojen mikroorganizmalar üzerinde bakterisidal etki göstermiştir.

Çalışmaya göre nisin düşük sıcaklık, ortalama NaCl konsantrasyonu gibi engel teknolojilerle birlikte uygulanması ürünün raf ömrünü geliştirme yönünde umut vaat etmektedir (Ulafig ve diğ., 2013).

Taze ve az işlem görmüş ürünlerde olduğu gibi et ve et ürünlerinde de mikrobiyal kaynaklı bozulmaları önlemek önem arz etmektedir. Et, su aktivitesi ve zengin protein içeriği sebebiyle mikrobiyal gelişmeye oldukça elverişli bir üründür. Bu nedenle etin üreticiden tüketiciye ulaşana kadar geçen sürede kalite ve güvenliğinin sağlanması için antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır. Gıda ve sağlık sektörü için doğal içerikler üreten Naturex firması, et ürünlerinde *Salmonella* ve *Listeria* türü bakterilerin gelişmesini engelleyen ve aynı zamanda tadı olumsuz etkilemeyen doğal antimikrobiyal ajanlar geliştirdiklerini açıklamışlardır (Rousseau, 2017).

Et ürünlerinde son dönemlerde kullanımı yaygınlaşmaya başlayan bir diğer doğal antimikrobiyal ürün de kereviz tozu ve kereviz suyudur (Bomgardner, 2017). Doğal olarak nitrit içeren kereviz ürünleri, et ürünlerinde nitrit yerine uygulanmakta ve antimikrobiyal özellik göstermektedir. FSIS (Food Safety and Inspection Service) yönergeleri de nitritin doğal kaynağı olan kombinasyonların et ürünlerinde antimikrobiyal ajan olarak kullanımını güvenli ve uygun olarak nitelendirmektedir (USDA, 2018).

Süt endüstrisine bakıldığında ise süt bazlı yeni ve fonksiyonel içecekler en fazla tüketilen fonksiyonel içecek grubu olarak dikkat çekmektedir. Bunlar; soya sütü içecekleri, sütlü meyve sebze suları, sıvı yumurta bazlı içecekler ile probiyotik içeceklerdir. Bu içeceklerin geliştirilmesinde kullanılan bazı bitkiler ve mikroorganizmalar hem içeceğin kalite ve duyu özelliklerinin geliştirilmesine katkıda bulunurken hem de antimikrobiyal özellik göstererek gıda güvenliğini sağlamaktadır (Pérez ve diğ., 2015).

Aynı grubun yayınladığı bir derlemede toz halindeki bebek mamalarında *Cronobacter sakazakii*'nin ısı olmayan işlemler yoluyla inaktivasyonu değerlendirilmiştir. *Cronobacter sakazakii*, erken doğan bebeklerde hayati risk oluşturan enfeksiyonlara yol açabilen fırsatçı bir patojendir. Bu yüzden bebek mamalarında varlığının engellenmesi önem arz etmektedir. Derlemede hem yüksek basınç uygulamaları, darbeli elektrik alan gibi yeni teknolojilere hem de nisin, laktik asit, laktoferrin, bakteriyofajlar gibi çeşitli antimikrobiyal ajanlara yer verilmiştir.

Bu uygulamaların etki ve sonuçları özetlenmiştir. Antimikrobiyaller arasından yüksek polifenol içeriğiyle kakao tozunun bakteriyostatik etkisinin olduğu ve darbeli elektrik alanla birlikte uygulanmasının gelecek potansiyel pastörizasyon uygulamaları arasında olabileceği vurgulanmıştır (Pérez ve diğ., 2016).

2.4 Bitkisel Antimikrobiyaller

İnsanoğlunun tarih boyunca hem gıda hem de ilaç kaynağı olarak faydalandığı bitkiler keşfedilmeyi bekleyen farklı etki ve özellikleriyle günümüz bilim dünyasının vazgeçilmez araştırma alanlarından biridir. 19. yüzyılda bitkisel sekonder metabolitlerin izole edilmesiyle bu konudaki bilimsel araştırmalar yeni bir boyut kazanmıştır. Sekonder metabolitler; protein, karbonhidrat ve yağ gibi temel metabolitler dışında kalan bitki büyümesinde doğrudan fonksiyonu bulunmayan metabolik bileşiklerdir. Sekonder metabolitlerin gerek bitki yaşamı gerekse insan yaşamı için pek çok önemli işlevi olduğu yıllardır yapılan araştırmalarla ortaya çıkmıştır (Crozier ve diğ., 2007).

Bu bileşikler bazen bitkiyi avlanmaktan (mikroorganizmalar, böcekler, otçullar) koruyan bir savunma mekanizmasıdır. Ya da bitkiye karakteristik rengini, kokusunu ve tadını veren kimyasallardır. Bitkilerin ürettiği bu kimyasal bileşikler bitkinin gelişme ve hayatta kalma evrelerinin yanı sıra üreme süreçlerine de katkıda bulunurlar. Üretilen fitokimyasal koku ve renk bileşikleri, bitkilerin tozlaşmasına ve tohumlarını yaymasına yardımcı olan böcek, kuş, kelebek gibi polinatör hayvanları bitkiye çeken cazibe unsurlarıdır (Wink, 2003).

Bitki ve polinatörü arasındaki ilişkilerin incelendiği son araştırmalarda ise fitokimyasalları içeren nektarın hem bitkinin kendisi hem tozlaştırıcı hayvan için faydalarının olduğu görülmüştür. Nektardaki fitokimyasallar belirli türdeki bir böcek için özelleşmekte; nektar diğer türlerin istila ve hırsızlığından korunmaktadır. Ayrıca bu fitokimyasal bileşiklerin polinatör canlılardaki hastalık oranını azalttığı belirtilmiştir (Stevenson ve diğ., 2017).

19. ve 20. yüzyıllarda bu konuda ivme kazanan bilimsel çalışmalar sayesinde, bitkilerin kendi yaşam döngüleri için bu denli önemli olan sekonder metabolitlerin (fitokimyasallar); doğadan bağımsız düşünemeyeceğimiz insanoğlu için de oldukça değerli olduğu anlaşılmıştır. Halk arasında yıllardır kullanılan veya daha önce zehirli

olarak bilinen bitkilerin pek çok farklı özelliği keşfedilmiştir (Mat, 2010). Özellikle farmasötik endüstrisi yeni ilaçların geliştirilmesi sürecinde bitki fitokimyasallarının tıbbi özelliklerini araştırmış ve ilaç üretiminde (antikanser, antibiyotik vb.) bu özelliklerden faydalanmıştır (Firn, 2010)

Bitkilere antimikrobiyal özelliklerini kazandıran da işte bu sekonder metabolit olarak adlandırılan çeşitli fitokimyasallardır. Bitkilerde antimikrobiyal işlev gösteren majör fitokimyasal gruplar; fenolik bileşikler, terpenoidler, esansiyel yağlar ve alkaloidlerdir (Cowan, 1999).

Günümüzde bitkilerden elde edilen antimikrobiyal bileşikler çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Sadece gıda sektörü değil mikrobiyal kontaminasyonun sorun teşkil ettiği pek çok sektör antimikrobiyal bileşiklerden faydalanma yolları aramakta; üniversiteler ve bilim insanları bu konularda çalışmalar yapmaktadır. Queensland üniversitesinden antibiyotik direnci üzerine çalışan bir grup araştırmacı çözümün bitkisel sekonder metabolitlerde bulunduğu işaret etmektedir. Hâlihazırda bilinen 12 000 alkaloid, 8000 fenolik bileşik ve 25 000 terpenoid olması; sekonder metabolitlerin bu muhteşem çeşitliliği ve denenen yeni yöntemler umut vaat etmektedir (Bazaka ve diğ., 2017).

Yapılan bir çalışmada ise Hibiskus bitkisinden elde edilen ekstraktların idrar yolu enfeksiyonları üzerindeki etkisi incelenmiştir. 40 kişi üzerinde yapılan incelemede hibiskus ekstraktının enfeksiyonu %89 oranında azalttığı gözlenmiştir. Tel Aviv üniversitesi tıp fakültesinden profesör Itzhak Ofek ise benzer şekilde yaban mersini meyvesinin idrar yolu enfeksiyonlarıyla savaştığına işaret etmektedir (Obu, 2017).

Tıbbi alandaki kullanımları uzun yıllardır kullanılan ve araştırılan bitkilerin antimikrobiyal özelliklerinin keşfedilmeye başlanmasıyla gıda üretimi alanında sadece hammadde olarak değil koruyucu olarak da uygulanabileceği anlaşılmıştır.

Çizelge 2.3 : Bazı baharat, şifalı ot ve bitkilerin in vitro antimikrobiyal etkileri

Genel İsim	Bilimsel isim	Kullanılan kısım	Sınıf	Aktivite	Referans
Ceviz	<i>Juglans regia</i>	Yeşil dış kabuğu	Kloroform ekstraktı	Antifungal	(Wianowska ve diğ., 2016)
Pancar	<i>Beta vulgaris</i>	Kökü	Etanol ekstraktı	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> 266, <i>Bacillus cereus</i>	(Velićanski ve diğ., 2011)
Zerdeçal	<i>Curcuma longa</i>	Saplarından elde edilen selüloz lifleri	Ekstrakt	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	(İlangovan ve diğ., 2018)
Kekik	<i>Thymus vulgaris</i>	Çiçek ve yaprakları	Sulu ekstraktları	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i>	(Martins ve diğ., 2015)
Yabani Kayısı	<i>Armeniaca sibirica</i>	Kayısı çekirdeği (acı badem)	Esansiyel yağ	Antifungal <i>Alternaria alternata</i> ; <i>Alternaria solani</i> ; <i>Botrytis cinerea</i>	(Geng ve diğ., 2016)
Anjelika	<i>Angelica sylvestris</i>	Kökü	Etanol ekstraktı	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	(Canlı ve diğ., 2016)
Menengiç	<i>Pistacia terebinthus</i>	Yaprak ve meyveleri	Esansiyel yağ	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Pulaj ve diğ., 2016)
Enginar	<i>Cynara scolymus</i>	Yaprakları	Etanol ekstraktı	<i>Listeria innocua</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i>	(Emanuel ve diğ., 2011)

2.5 Antimikrobiyal Maddelerin Eldesi

Bitkilerden antimikrobiyal maddelerin eldesinde ekstraksiyon, distilasyon, presleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler geçmişten bu yana kullanılmakla birlikte; zaman içinde geliştirilerek günümüzde modern tekniklerle harmanlanmıştır.

Ekstraksiyon; sıvı ya da katı bir karışımdaki istenilen bir ya da daha fazla bileşiğin çeşitli yöntemler kullanılarak ayrılması işlemidir. Fitokimyasalların bitkilerin yaprak, çiçek, sap ve kök gibi kısımlarından ayrılıp saf bir şekilde elde edilebilmesi için de ekstraksiyon işleminden faydalanılır. Bütün ekstraksiyon yöntemlerinin esas amacı çözülebilir bitki metabolitlerini uygun çözücü yardımıyla çözünemeyen posa kısmından ayırmaktır.

Maserasyon, infüzyon, dekoksasyon gibi yöntemler; bitkilerden fitokimyasalları ayırmanın bilinen en basit ve geleneksel uygulamalarıdır. Bitkisel çayların hazırlanma süreci bu uygulamalara birer örnektir (Baydar, 2005).

Antik çağlardan beri uygulanmakta olan bir diğer yöntem ise distilasyondur (Kubeczka, 2015). Distilasyon bir karışımda bulunan bileşiklerin sıcaklık yardımıyla buharlaştırılıp yoğunlaştırılarak ayrılması işlemidir. Distilasyondaki temel nokta buharlaşan sıvıyı hızlı bir şekilde soğutarak yoğunlaştırmaktır. Farklı şekilde tasarlanmış düzeneklerle kaynama noktası farklı olan sıvı-sıvı karışımları veya bir katının içindeki uçucu bileşikleri yoğunluk farkından yararlanarak ayırmak mümkündür (UCLA, 2017).

Distilasyon ısı yardımıyla buharlaştırılan sıvının havaya karışmadan tekrar yoğunlaştırılarak sıvı haline dönüştürülmektedir. (Baydar, 2005). Distilasyon yöntemi asırlardır bitkilerden uçucu (esansiyel yağları) ayırmak için de yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Esansiyel yağlar gibi; hidrosoller de distilasyon yöntemiyle elde edilir. Bulunan aparatlar ve yazılı eserler distilasyonun milat öncesi çağlardan beri Antik Yunan, Eski Mısır ve Roma uygarlıklarında bitkilerin şifa ve koku gibi özelliklerinden faydalanılmak için uygulandığını göstermektedir. Günümüz distilasyonunun kökleri ise, 11. yüzyılda İbn-i Sina' nın sarmal soğutma borusunu (coiled cooling pipe) bulması ve buhar distilasyonunu tanımlamasına kadar dayanmaktadır. 16. yüzyılın ünlü simyacısı ve hekimi sayılan Paracelsus ise bir kitabında distilasyonun bitkilerin içindeki en çok istenen özü (esans) açığa çıkardığını savunuyordu. Bugün de kullanılmakta olan esansiyel yağ kavramı bu kullanımdan kaynaklanmaktadır (Kubeczka, 2015).

Günümüzde uygulanmakta olan distilasyon yöntemleri 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar su distilasyonu, buhar distilasyonu ve buhar-su distilasyonudur. Su distilasyonu kaynamaya dayanıklı olan kurutulmuş bitkisel örneklerin distilasyonunda kullanılır. Esansiyel yağı veyahut hidrosolü elde edilmek istenen bitki materyalleri suyla birlikte kaynatılarak esansın buharlaşan suyla birlikte taşınması sağlanır. Geleneksel olarak distilasyon ekipmanı olarak kullanılan imbicler ve laboratuvar tipi Clevenger aparatı bu su distilasyonunun esaslarına göre çalışmaktadır. Buhar distilasyonu ise daha çok çok taze bitkisel materyalin damıtılmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemde bitki doğrudan su ile değil; sıcak su buharıyla temas halindedir. Su ve buhar distilasyonu ise bu iki

yöntemin kombine edilmiş halidir. İçerisinde su bulunan bitkisel materyale doğrudan buhar verilerek kaynama ve distilasyon süresi kısalmış olur. (Baydar, 2005)

Distilasyon yöntemleri çözücü olarak suyun kullanıldığı geleneksel yöntemlerdir. Su yerine metanol, etanol, hekzan gibi farklı organik çözücülerin kullanıldığı yöntem ise günümüzde de kullanılmakta olan solvent ekstraksiyon yöntemidir. Uygun çözücü maddelerin kullanılarak istenilen bileşiklerin ayrılması işlemi genel olarak solvent (çözücü) ekstraksiyon olarak adlandırılır. Bu yöntemde de temel amaç aynıdır: Bitki materyalinin içindeki çözünebilir fitokimyasal bileşiklerin çözücü içinde çözünerek, bitkinin posa kısmından ayrıştırılması. Elde edilmek istenen maddenin çözünürlük özelliğine göre çözücü seçilir. Geleneksel bir yöntem olarak kabul edilen solvent ekstraksiyonu günümüzde modern tekniklerle kombine edilerek, mikrodalga, ultrases, yüksek basınç destekli ekstraksiyon gibi modern ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir (Azmir ve diğ., 2013).

Sıkma (presleme), sıvılaştırılmış gaz ekstraksiyonu (süper kritik ekstraksiyon), hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu bitki ve gıdalardan istenilen bileşenlerin analiz ve izolasyonu için kullanılan diğer modern ekstraksiyon yöntemlerindedir. Kullanılan bu yeni teknolojiler arasındaki temel benzerlik ekstraksiyon hızını arttıran yüksek sıcaklık ve yüksek basınçlarla çalışma olanağı sunmalarıdır (Büyüktuncel, 2012)



3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Tez çalışmasında *Escherichia coli* ATTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 bakterileri ile *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 36802, *Candida krusei* KUEN 1001 ve *Candida krusei* 6258 mayaları kullanılmıştır. Candida suşları Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Ümran Soyoğul Gürer'den temin edilmiştir.

3.1.2 Ekstrakt ve hidrosol elde etmek için kullanılan bitkiler

Ekstrakt ve hidrosol elde etmek için kullanılan kereviz sap ve yaprakları Feriköy organik pazarından temin edilmiştir. Kereviz sapları pazarda satılmayıp kenara ayrılan bitki atıklarından toplanmıştır. Ceviz ekstraktları içinse Silivri, Gazitepe mahallesindeki ceviz bahçesinden hasat sırasında atık olarak çıkan yeşil dış ceviz kabukları toplanıp dondurularak saklanmıştır.

3.1.3 Besiyerleri ve çözeltiler

Çalışmada, bakterilerin geliştirilmesi ve analizler Tryptic Soy Agar (TSA, MERCK No: 1.05458) ve Tryptic Soy Broth (TSB, MERCK No: 1.05459) besiyerleri kullanılmıştır. Mayalar için kullanılan Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyeri ise,

- Pepton (MERCK No: 1.07214); 10,0 g/L
- D(+) glukoz monohidrat (MERCK No: 1.08342); 20,0 g/L
- Agar-agar (MERCK No: 1.01613); 17,0 g/L

ve saf su kullanılarak laboratuvarında hazırlanmıştır (Sigma- Aldrich). Besiyerleri, 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Kullanılacak ekstraktların hazırlanmasında ve konsantrasyonlarının ayarlanmasında %10'luk di-metil sülfoksit (DMSO) çözeltisi kullanılmıştır. Ekstraksiyon işleminde metanol (MERCK No: 1.06007) kullanılmıştır.

3.2 Metot

3.2.1 Bitki örneklerinin hazırlanması

Bitkiler önce kir ve toprağından temizlenmek amacıyla iyice yıkanmıştır. Yıkandıktan sonra filtre kâğıtların üstüne serilen bitkiler, suyu akana kadar bekletilip; taze halde buzdolabı poşetlerine koyularak -20°C'deki buzdolabında dondurularak saklanmıştır. Dondurulmuş bitkiler öğütücüde sıvı azotla birlikte öğütülerek petri kaplarına konulmuş ve dondurulmuş halde dondurarak kurutucu (CHRIST, 1-2 LDplus) da kurutulmuştur. Dondurarak kurutma üründe buz halinde bulunan suyun, basınç altında ve düşük sıcaklıklarda doğrudan buharlaştırılmasını sağlar. Bu yöntem, ısı uygulamalardan kaynaklı bileşen kayıplarını ve oksidatif bozulmayı önlemektedir (Adams ve diğ., 2015). Bu yüzden antioksidan, antimikrobiyal aktivite gibi bitki fitokimyasallarından kaynaklanan özelliklerin incelendiği çalışmalarda; kurutma yöntemi olarak uygulanabilecek etkili bir yöntemdir.

Öğütülüp kurutulmuş haldeki ceviz ve kerevizler cam kavanozlara doldurularak hava ve ışık almayacak şekilde buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2 Bitkisel antimikrobiyal madde eldesi

Ceviz ve kereviz örneklerinden antimikrobiyal madde eldesi amacıyla solvent ekstraksiyonu ve hidrodistilasyon yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.2.1 Solvent ekstraksiyonu

Solvent ekstraksiyon işlemi; ultrasound tekniğıyle birleştirilerek literatürdeki uygulamaların modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Toma ve diğ., 2001). Solvent ekstraksiyonu için metanol, metanol-su (50:50, v/v) çözücü olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon için kereviz ve ceviz 1:20 oranında ekstraksiyon solventi ile karıştırılmış ve ultrasonik banyoda (VWR Ultrasonic Cleaner; USC 900 TH) 1 saat ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda katı maddeleri çöktürmek için 3500 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich Universal 32R) işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonunda üst faz şırınga ucu filtreden (CHROMAFIL, 0.45 µm) geçirilmiştir. Elde edilen ekstrakt döner

buharlaştırıcıda (BUCHI Rotavapor R II) vakum altında 40-45°C’de çözücü buharlaşana kadar işleme tabi tutulur. Suyun uzaklaştırılması için metanol-su ekstraktları döner buharlaştırıcıdan sonra dondurarak kurutma işlemine tabii tutulmuştur.

Uygulanan ekstraksiyon işlemleri sonucunda; kereviz-metanol (K-M), kereviz-metanol/su (K-MS), ceviz-metanol (C-M) ve ceviz-metanol/su (C-MS) ekstraktları elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar -18 °C’de ışık almayan ortamda, analiz edilinceye kadar saklanmıştır.

3.2.2.2 Hidrodistilasyon

Hidrosolleri elde etmek için hidrodistilasyon yönteminden faydalanılmıştır. Önceden hazırlanmış ve saf su ile yıkanmış olan taze kereviz sap ve yaprakları küçük parçalara ayrılarak 100’er gr tartılmıştır. Tartılan kereviz sap ve yaprakları 300 ml su eklenerek Clevenger düzeneğinde hidrodistilasyona tabi tutulmuştur. Distilasyon 100-120°C’de 3 saat boyunca devam etmiştir.

Kereviz sap ve yaprakları (K-H1) ve sadece kereviz saplarının (K-H2) kullanıldığı iki farklı hidrosol hazırlanmıştır. Hidrosoller koyu renkli şişelerde toplanarak +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

Ceviz kabukları için de aynı işlem uygulanmıştır. Ceviz kabuklarından elde edilen hidrosol (C-H) de koyu renkli şişelerde toplanarak +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Antimikrobiyal etkinin incelenmesi

3.2.3.1 Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması

Bakteri kültürleri, TSA besiyeri kullanılarak hazırlanan yatık agarda çoğaltılmış ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda *E. coli*, *S. aureus*’un bakteri konsantrasyonları disk difüzyon yöntemi için (5×10^5 kob/mL), mikrodilüsyon yöntemi içinse 0,5 McFarland’a (10^8 kob/mL) ayarlanarak kullanılmıştır. Konsantrasyonların ayarlanmasın sterilize edilmiş TSB sıvı besiyerleri kullanılmıştır.

Maya kültürleri ise SDA besiyeri kullanılarak hazırlanan yatık agar tüplerinde çoğaltılmış ve 28°C'de 36-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kültürlerinde olduğu gibi mayaların konsantrasyonları da disk difüzyon yöntemi için 5×10^5 , mikrodilüsyon yöntemi içinse 0,5 McFarland'a (10^8 kob/mL) ayarlanmıştır. Mayaların konsantrasyonunu ayarlamak için sterilize SDB sıvı besiyerleri kullanılmıştır.

3.2.3.2 Disk difüzyon yöntemi

Ekstraktların ve hidrosollerin %10'luk DMSO'daki çözeltilerinin antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemiyle incelenmiştir. Elde edilen ceviz ve kereviz ekstraktlarının konsantrasyonu %10'luk DMSO'da çözülerek Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi ayarlanmıştır.

Çizelge 3.1 : Ceviz ve kereviz ekstraktlarının konsantrasyonları

	K-M	K-MS	C-M	C-MS
Konsantrasyon (mg/mL)	10 mg/mL	50 mg/mL	10 mg/mL	50mg/mL

Ekstrakt ve hidrosollerin bakteri ve maya suşları üzerine antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir (Bauer ve diğ., 1959).

Konsantrasyonu ayarlanmış olan bakteri kültürlerinden TSA besiyeri üzerine; maya kültürlerinden ise SDA besiyeri üzerine 100 µL eklenerek yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra 6 mm çapındaki sterilize edilmiş kağıt diskler besiyeri üzerine yerleştirilmiştir. Test edilecek ekstrakt ve hidrosollerden mikro pipet yardımıyla 15 µL alınarak besiyeri üzerine yerleştirilen kağıt disklere (6 mm çaplı) emdirilmiştir. 2 paralel ve 1 negatif kontrol grubuyla çalışılmıştır. Negatif kontrol grubu, sadece % 10'luk DMSO çözeltisi emdirilmiş disk gruplarıdır.

Bakteri içeren petripler 37 °C'de 24 saat; maya içeren petripler ise 28 C'de 36-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda etki zonu oluşup oluşmadığı gözlemlenmiş; oluşan zonların etki çapı ölçülmüştür.

3.2.3.3 Mikrodilüsyon yöntemi

Ekstrakt ve hidrosollerin antimikrobiyal etkileri ikinci bir yöntem olarak bakteri ve mayalara karşı broth mikrodilüsyon yöntemi ile de test edilmiştir. Mikrodilüsyon yönteminde 96 kuyucuklu plakların her birine 95 µL bakteriler için TSB besiyeri,

mayalar içinse SDB besiyeri konmuş, üzerlerine 5 µL 0,5 McFarland konsantrasyonunda *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri veya *Candida albicans* ve *Candida krusei* mayaları ilgili kuyucuklara ayrı ayrı ekilmiştir. Son olarak kuyucuklara 100 µL kereviz ve cevizin metanol, metanol: su ekstraktları ile kereviz sap ve yapraklarının hidrosolleri eklenmiştir. Toplam olarak her bir kuyucukta 200 µL karışım (sıvı besiyeri + bakteri/maya + ekstrakt/ hidrosol) bulunmaktadır. 96 kuyucuklu plaklar 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir.

Negatif kontrol grubu olarak 100 µL ekstrakt çözeltisi ve hidrosol ile 100 µL sıvı4 besiyeri karışımı kullanılırken; pozitif kontrol grubu olaraksa 195 µL sıvı besiyeri ve 5 µL inokülüm karışımı kullanılmıştır. Çalışma her mikroorganizma ve her ekstrakt ile hidrosoller için 3 paralel halinde gerçekleştirilmiştir.

Bakteri ve maya gelişimleri, ilgili kuyucuklardaki yoğunluğun optik olarak belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Bakteri ve mayaların optik yoğunluğu 630 nm de, mikro plak okuyucu (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., Vermont, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler 48 saat süresince belirli aralıklarla tekrarlanmıştır, bu süre boyunca mikroorganizmaların pozitif kontrollerinin ve ekstrakt çözeltisi ile hidrosol eklenmiş kuyucuklardaki mikroorganizma gelişimi optik yoğunluk değişimiyle gözlenmiştir. Test edilen ekstraktların etkisi örnek içeren kuyucuklardaki absorbansların negatif kontrolden farkı alınarak değerlendirilmiştir. Elde edilen fark <0,001 ise “gelişme yok” olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4 İstatistiksel analiz

Ekstrakt ve hidrosollerin mikroorganizma gelişmesi üzerine etkisi $\alpha=0,05$ önem düzeyinde tek yönlü ANOVA ile araştırılmıştır. Ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan çoklu aralık testi kullanılmıştır. İstatistiklerin oluşturulmasında SPSS (IBM SPSS STATICS 20) programı kullanılmıştır.



4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bitkisel Antimikrobiyal Maddelerin Eldesi

Çalışmada bitkisel antimikrobiyal madde eldesi amacıyla kereviz ve ceviz atıkları kullanılmıştır. Hammaddeler kurutulduktan sonra metanol ve metanol:su (50:50, v/v) ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda elde edilen ürün miktarları sırasıyla ceviz için 188 mg ekstrakt/ g kuru madde, kereviz içinse 178 mg ekstrakt/ g kuru madde olarak hesaplanmıştır. Kuru maddeden metanol solventi kullanılarak ekstraksiyon eldesinde verim yaklaşık %18 dir.

4.2 Disk Difüzyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Elde edilen ekstraktların ve hidrosollerin test edilen bakteri ve mayalara karşı antimikrobiyal etkisi disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. İnkübasyon sonunda ceviz ekstraktlarının *S. aureus*'a karşı düşük de olsa antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de elde edilen ekstraktların ve hidrosollerin *E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 36802, *Candida krusei* KUEN 1001 ve *Candida krusei* ATCC 6258 üzerine antimikrobiyal etkisi var (+), yok (-) olarak gösterilmiştir

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen antimikrobiyal testte, cevizin metanol ve metanol-su karışımı kullanılarak hazırlanan ekstraktlarının her ikisinin de *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir. Oluşan inhibisyon zonlarının genişliğinin 24 saat ve 48 saat inkübasyon süreleri sonunda farklılaştığı belirlenmiş; etkiler var yok şeklinde Çizelge 4.1' de verilmiştir. Kerevizin sadece metanol-su ekstraktının bakteriler üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Hidrosoller ise her iki bakteri üstünde etki göstermemiştir.

Fernández-Agulló ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da ceviz dış kabuğunun antimikrobiyal ve antioksidan etkileri olduğu ortaya konmuştur. Ancak bu çalışmada cevizin *S. aureus* gibi gr(+) bakterilere karşı etkili olduğu belirlenirken; *E. coli* gibi gr(-) bakterilere karşı ise etki göstermediği belirtilmiştir (Fernández ve diğ., 2013). Yapılan bir diğer çalışma ise cevizin etanol ekstraktlarının *E. coli* bakterisine karşı da

etkili olduğunu ve disk difüzyon yöntemi ile inhibisyon zonlarının oluşumunun gözlemlendiğini ortaya koymaktadır (Sharma ve diğ., 2013).

Çizelge 4.1 : Ekstraktların ve hidrosollerin *E. coli* ve *S. aureus* üzerine etkisi.

Ekstrakt kodu	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
K-M	-	-
K-MS	+	+
C-M	++	++
C-MS	+	++
K-H1	-	-
C-H	-	-

+: Antimikrobiyal etki var
-: Antimikrobiyal etki yok

Çizelge 4.2 : Ekstraktların ve hidrosollerin *Candida spp* üzerine etkisi.

Ekstrakt kodu	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>	
	ATCC 10231	ATCC 36802	KUEN 1001	ATCC 6258
K-M	-	-	-	+
K-MS	-	+	-	+
C-M	-	-	+	++
C-MS	+	-	+	+
K-H1	-	-	-	-
C-H	-	-	-	-

+: Antimikrobiyal etki var
-: Antimikrobiyal etki yok.

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak uygulanan antimikrobiyal testin sonuçları Çizelge 4.2’ de verildiği gibidir. Buna göre ceviz ve kereviz ekstraktlarının en yoğun etki gösterdiği mikroorganizma *Candida krusei* ATCC 6258 olmuştur. Kerevizin sadece

su-metanol karışımı ile hazırlanmış ekstraktının etkili olduğu gözlenmiştir. Hidrosol örneklerine bakıldığında ise *C. albicans* ve *C. krusei* mayaları üzerinde herhangi bir antifungal etkisi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmemiştir.

C. albicans özellikle kandidiyazis hastalığındaki rolü ile bilinmesine rağmen *C. krusei* mayasının hastalık etkeni olarak önemi son dönemlerde yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır. *C. krusei* bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ya da kanser hastalarındaki enfeksiyon vakalarında önem taşımaktadır (Yadav, Bezawada, Yan, & Tyagi, 2012).

4.3 Mikrodilüsyon Yöntemiyle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

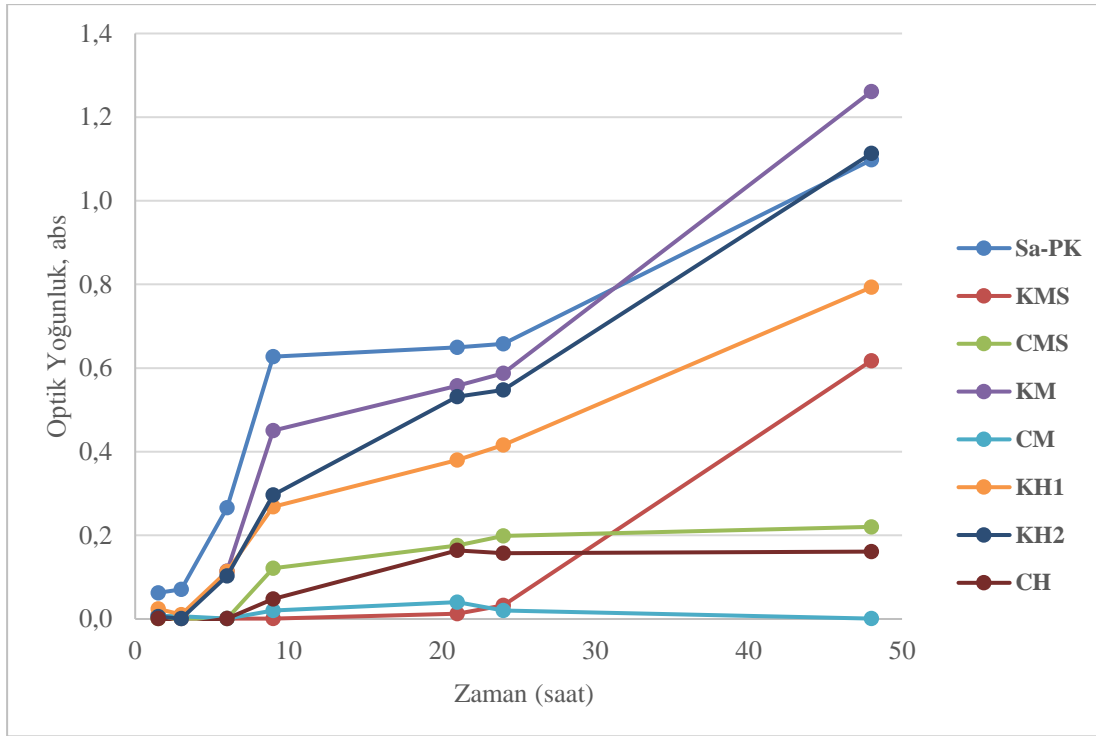
Disk difüzyon yöntemiyle katı besiyerinde gerçekleştirilen çalışmalarda mikroorganizmalara karşı düşük seviyede antimikrobiyal etki belirlendiğinden çalışmanın devamı sıvı besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Literatürde de broth dilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivitenin daha etkili ve doğru bir şekilde belirlendiği ifade edilmektedir (Balouiri ve diğ, 2016; Yaakoubi ve diğ, 2009)

Çizelge 4.3 Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı gösterdiği etki.

Ekstrakt ve hidrosol kodu	Zaman						
	1,5 sa	3 sa	6 sa	9 sa	21 sa	24 sa	48 sa
PK^a	0,063	0,071	0,266	0,627	0,650	0,658	1,098
KMS^c	- ¹	-	-	-	0,013	0,032	0,618
CMS^{bc}	-	-	-	0,122	0,176	0,199	0,220
KM^a	-	-	0,115	0,450	0,558	0,588	1,261
CM^c	-	0,006	0,007	0,020	0,040	0,020	0,001
KH1^{ab}	0,024	0,011	0,114	0,268	0,380	0,416	0,793
KH2^a	0,006	0,006	0,103	0,297	0,532	0,548	1,113
CH^c	-	-	-	0,048	0,164	0,157	0,161

a, b, c: Aynı harfe sahip örnekler arasında 24.saatteki inkübasyon bulgularına göre istatistiksel olarak bir fark yoktur ($p > 0,05$)

¹: Gelişme yok.



Şekil 4.1 : Ekstrakt ve hidrosollerin *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerine etkisi

Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı gösterdiği etki Çizelge 4.3 ve Şekil 4.1’ de verilmiştir. Çizelgede ayrıca sonuçların istatistiksel analiz sonuçları da gösterilmiştir.

Mikrodilüsyon yönteminde de disk difüzyona benzer olarak, *S. aureus* bakterisi üzerinde yüksek antimikrobiyal etkiye sahip örneklerin ceviz ekstraktları ve ceviz hidrosolü olduğu belirlenmiştir. Cevizin metanol ekstraktının *S. aureus* gelişimini durdurduğu görülmüştür. Kereviz ekstraktları arasında ise, kerevizin metanol-su ekstraktı ilk 24 saat süresince etkili olurken, sonrasında bu etki gözlenmemiş; mikrobiyal gelişim devam etmiştir. Kerevizin metanollü ekstraktı ve hidrosolleri mikroorganizma gelişimi üzerine antimikrobiyal bir etkisi belirlenmemiştir.

Portekizli araştırmacıların yaptığı bir çalışmada okaliptüs, ceviz ve rezene ekstraktlarının, süt endüstrisinde mastitise yol açan önemli bir patojen olan *S. aureus* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Bitkisel örneklerin metanol – su ekstraktlarının kullanıldığı bu çalışmada da ceviz ekstraktlarının antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Gomes ve diğ., 2018)

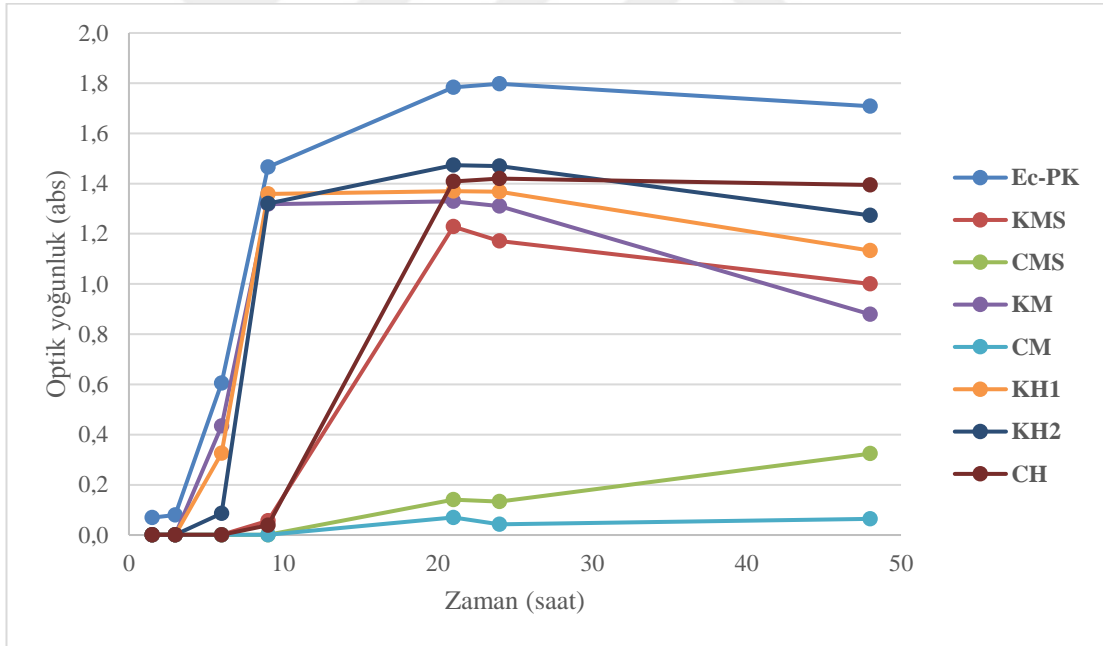
Çizelge 4.4 ve Şekil 4.2’de ise ekstrakt ve hidrosollerin *E.coli* bakterisi üzerindeki etkisi gösterilmiş.

Çizelge 4.4 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında ise *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterisine karşı gösterdiği etki.

Ekstrakt ve hidrosol kodu	Zaman						
	1,5 sa	3 sa	6 sa	9 sa	21 sa	24 sa	48 sa
PK ^a	0,069	0,080	0,605	1,466	1,784	1,798	1,708
KMS ^d	- ¹	-	-	0,056	1,228	1,171	1,001
CMS ^e	-	-	-	0,001	0,141	0,133	0,324
KM ^c	-	-	0,434	1,317	1,329	1,311	0,879
CM ^e	-	-	-	-	0,070	0,042	0,064
KH1 ^{bc}	-	-	0,326	1,359	1,370	1,368	1,133
KH2 ^b	-	-	0,086	1,321	1,473	1,470	1,274
CH ^{bc}	-	-	0,001	0,038	1,408	1,420	1,395

a, b, c, d, e: Aynı harf/harf grubuna sahip örnekler arasında 24.saatteki inkübasyon bulgularına göre istatistiksel olarak bir fark yoktur ($p > 0,05$)

¹: Gelişme yok.



Şekil 4.2 : Ekstrakt ve hidrosollerin *E.coli* ATCC 25922 suşu üzerine etkisi

Ceviz ekstraktlarının *S.aureus* üzerinde olduğu gibi *E.coli* nin gelişiminin durdurulması-yavaşlatılması üzerinde de oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte ceviz ekstraktları ve hidrosolü ile kerevizin metanol-su ekstraktının mikroorganizmanın lag fazını uzattığı optik yoğunluk grafiğinden görülmektedir.

24 saatten sonra pozitif kontrol de dahil olmak üzere optik yoğunlukta genel bir azalma eğilimi gözlenmiştir. *E. coli* 24 saat sonunda durağan fazına geçtiği düşünülmektedir. Ayrıca ortamın asitliğinin artması da bu eğilimin oluşmasında etkili olabileceği düşünülen etkenlerden birisidir.

Aşağıda Çizelge 4.5'te hidrosol ve ekstraktların *Candida albicans* ATCC 10231 suşuna karşı etkisi verilmektedir. Verilen sayısal değerler belirli saat sonunda okunan optik değerlerdir. Mikrobiyal gelişme devam ettikçe optik değerler de artış göstermektedir.

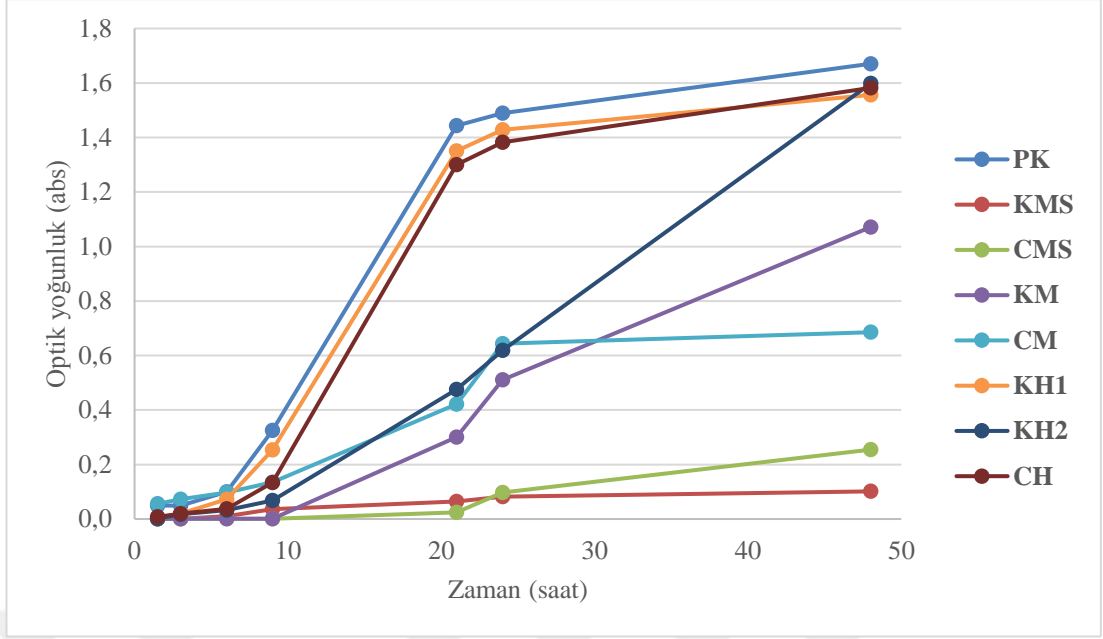
Çizelge 4.5 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında ise *Candida albicans* ATCC 10231 mayasına karşı gösterdiği etki.

Ekstrakt ve hidrosol kodu	Zaman						
	1,5 sa	3 sa	6 sa	9 sa	21 sa	24 sa	48 sa
PK^a	0,049	0,049	0,099	0,326	1,443	1,490	1,671
KMS^c	- ¹	-	0,011	0,037	0,065	0,082	0,102
CMS^c	-	-	-	-	0,025	0,097	0,255
KM^b	-	-	-	-	0,300	0,511	1,071
CM^b	0,056	0,073	0,098	0,135	0,421	0,644	0,685
KH1^a	-	0,019	0,073	0,254	1,351	1,429	1,556
KH2^b	-	0,018	0,033	0,068	0,475	0,619	1,598
CH^c	0,008	0,020	0,038	0,134	1,300	1,383	1,582

a, b, c: Aynı harf/harf grubuna sahip örnekler arasında 24.saatteki inkübasyon bulgularına göre istatistiksel olarak bir fark yoktur ($p > 0,05$)

¹: Gelişme yok.

Ekstrakt ve hidrosollerin *Candida albicans* ATCC 10231 mayasına karşı gösterdiği antimikrobiyal etki sonuçlarına bakıldığında istatistiksel olarak cevizin metanol-su ile keravizin metanol-su ekstraktlarının etkisi arasında bir fark bulunmadığı görülmüştür. Aynı şekilde kereviz ve cevizin metanol ekstraktları da istatistiksel analiz sonucunda aynı harf değerini alarak, benzer etki göstermişlerdir. Şekil 4.3'te ise her bir ekstrakt ve hidrosolün etkisi grafiksel olarak verilmiştir.



Şekil 4.3 : Ekstrakt ve hidrosollerin *C. albicans* ATCC 10231 suşu üzerine etkisi

Candida albicans ATCC 10231 suşu üzerinde en fazla antimikrobiyal etki gösteren kereviz ve cevizin metanol-su ekstraktları olmuştur. Bu iki ekstrakt çözeltisi lag fazını 20. saate kadar uzatmış; log fazında ise fungal gelişimi oldukça yavaşlatmıştır. Kereviz ve cevizin metanollü ekstraktlarının etkisi ise sulu ekstraktlarının çözeltilerine oranla daha düşük seviyededir.

Yapılan bir çalışmada nitrojen içeren metabolik grupların antimikrobiyal etkisinden yola çıkarak yeni antibakteriyel ve antifungal bileşiklerin sentezi araştırılmıştır. Elde edilen sentetik, nitrojen içeren bileşiklerin özellikle *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Patel & Patel, 2010). Nitrojen içeren bileşiklerin yanısıra kerevizde bulunan kalkon ve neofitadin bileşiklerinin de antimikrobiyal aktiviteye katkı sağlamış olabileceği değerlendirilmiştir.

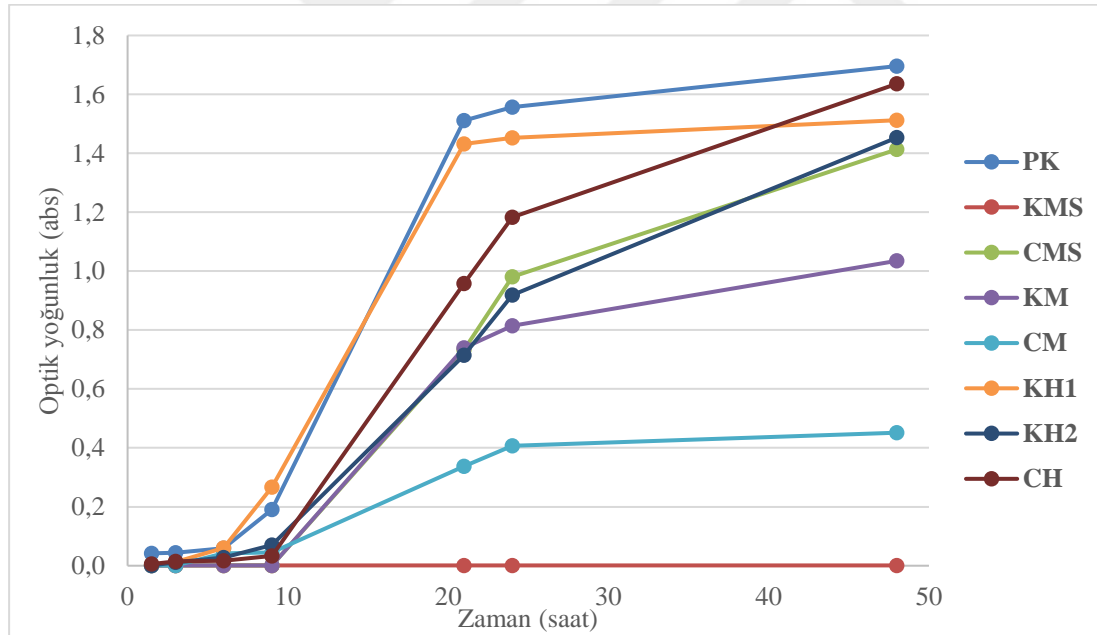
Ceviz ve kerevizin metanol çözeltileri ise mikrobiyal gelişim üzerinde orta düzeyde etkili olmuştur. *C. albicans* ATCC 10231 suşunda olduğu gibi *C. albicans* ATCC 36802 suşu üzerinde de hidrosollerin etkisi belirlenememiştir. Çizelge 4.6' da verilen istatistiksel analiz sonuçlarına göre özellikle kereviz sap ve yapraklı hidrosolünün pozitif kontrolden farklı olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.6 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında ise *Candida albicans* ATCC 36802 mayasına karşı gösterdiği etki.

Ekstrakt ve hidrosol kodu	Zaman						
	1,5 sa	3 sa	6 sa	9 sa	21 sa	24 sa	48 sa
PK ^a	0,042	0,044	0,060	0,191	1,511	1,556	1,696
KMS ^f	- ¹	-	-	-	0,001	0,001	0,001
CMS ^c	-	-	-	-	0,733	0,981	1,413
KM ^d	-	-	-	-	0,740	0,815	1,035
CM ^e	-	-	0,042	0,045	0,338	0,407	0,452
KH1 ^a	0,003	0,013	0,060	0,267	1,432	1,452	1,512
KH2 ^{cd}	-	0,011	0,028	0,071	0,714	0,919	1,453
CH ^b	0,006	0,014	0,017	0,034	0,958	1,183	1,636

a, b, c, d, e, f: Aynı harfe sahip örnekler arasında 24.saatteki inkübasyon bulgularına göre istatistiksel olarak bir fark yoktur ($p > 0,05$)

¹: Gelişme yok.



Şekil 4.4 : Ekstrakt ve hidrosollerin *C. albicans* ATCC 36802 suşu üzerine etkisi

Şekil 4.4'te ve Çizelge 4.6'de belirtilen mikrodilüsyon bulgularına göre kerevizin metanol-su ekstraktı fungal gelişimi tamamen durdurmuş olmasıyla dikkat çekmektedir. Bunun bitki yapısındaki suda çözünürlüğü artan antimikrobiyal sekonder metabolitlerin varlığıyla ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir.

Kerevizin yapısında yer alan fenolik ve nitrojen içeren bileşikler suda çözünür bileşiklerdir. Bu bileşikler antimikrobiyal aktivitenin artmasında etki göstermiş olabilir.

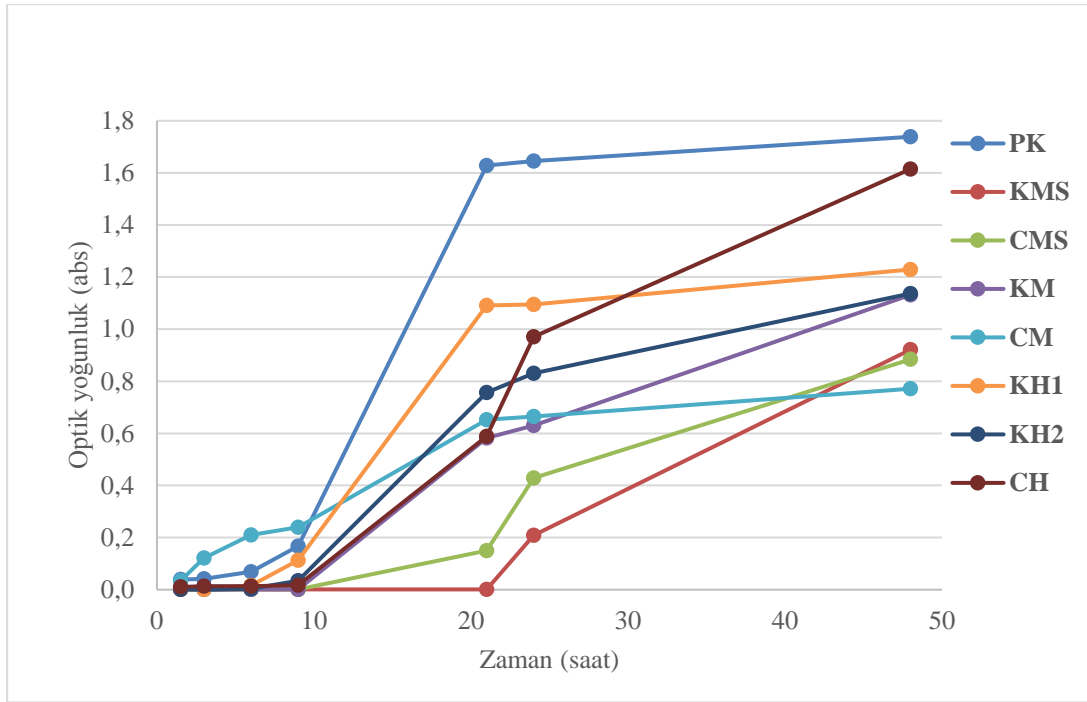
Çizelge 4.7 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında ise *Candida krusei* KUEN 1001 mayasına karşı gösterdiği etki.

Ekstrakt ve hidrosol kodu	Zaman						
	1,5 sa	3 sa	6 sa	9 sa	21 sa	24 sa	48 sa
PK^a	0,039	0,042	0,069	0,167	1,628	1,645	1,739
KMS^g	- ¹	-	-	-	-	0,209	0,922
CMS^f	-	-	-	-	0,150	0,429	0,884
KM^e	-	-	-	-	0,583	0,630	1,132
CM^{de}	0,034	0,121	0,211	0,239	0,653	0,665	0,772
KH1^b	-	0,002	0,015	0,113	1,091	1,094	1,229
KH2^{cd}	-	0,000	0,004	0,034	0,757	0,831	1,137
CH^b	0,010	0,014	0,013	0,018	0,589	0,970	1,615

a, b, c, d, e, f, g: Aynı harfe sahip örnekler arasında 24.saatteki inkübasyon bulgularına göre istatistiksel olarak bir fark yoktur ($p > 0,05$)

¹: Gelişme yok.

Çizelge 4.7’de belirtilmiş olan antimikrobiyal test bulgularına göre *Candida krusei* KUEN 1001 suşu üzerinde en etkili görünen örnekler sırasıyla kereviz ve cevizin metanol-su ekstrakt çözeltileri olmuştur. Şekil 4.5 verilen sonuçlara göre özellikle kerevizin metanol-su ekstrakt çözeltileri mayanın lag fazını oldukça uzatmıştır. Kereviz ve cevizin metanol ekstraktları da benzer düzeyde daha düşük etki göstermişlerdir. Hidrosoller ise *C. albicans* suşlarında olduğu gibi *C. krusei* KUEN 1001 suşu üzerinde de anlamlı bir antimikrobiyal etkiye sahip değildir.



Şekil 4.5 : Ekstrakt ve hidrosollerin *C. krusei* KUEN 1001 suşu üzerine etkisi

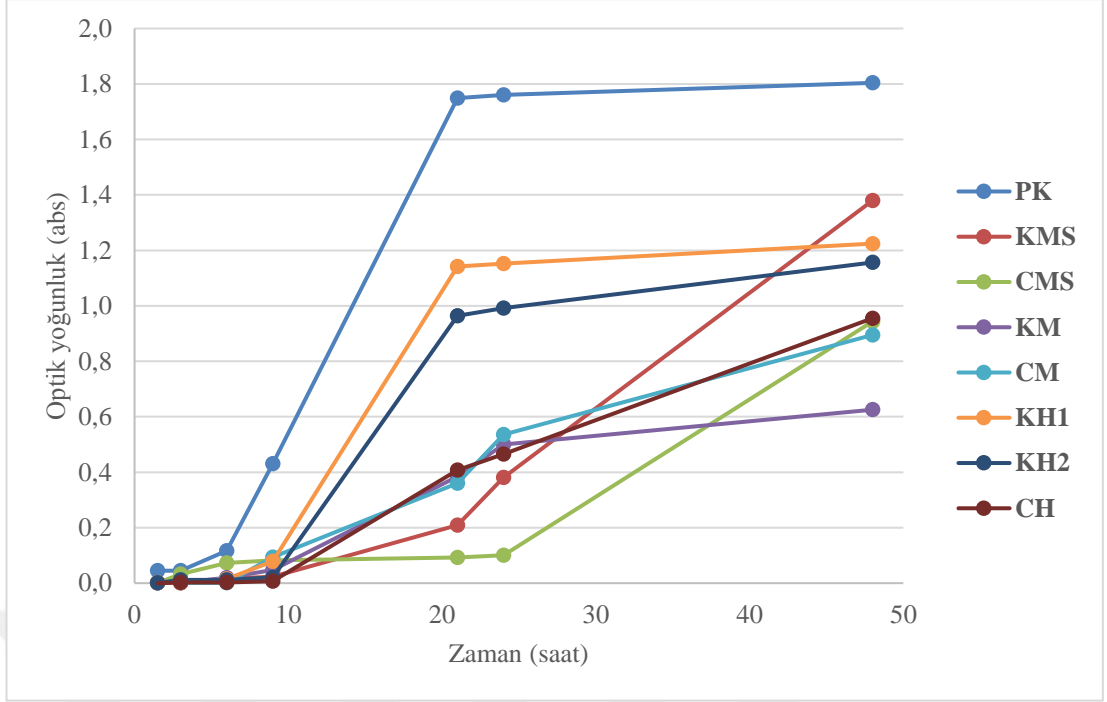
Çizelge 4.8’de ve Şekil4.6’da gösterilen mikrodilüsyon testi bulgularına göre örneklerin *Candida krusei* 6258 suşu üzerindeki antimikrobiyal etki eğilimleri *Candida krusei* KUEN 1001 suşunun sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4.8 : Hidrosol ve ekstraktların farklı zaman aralıklarında ise *Candida krusei* ATCC 6258 mayasına karşı gösterdiği etki.

Ekstrakt ve hidrosol kodu	Zaman						
	1,5 sa	3 sa	6 sa	9 sa	21 sa	24 sa	48 sa
PK ^a	0,045	0,045	0,117	0,431	1,749	1,761	1,804
KMS ^d	- ¹	-	0,017	0,023	0,209	0,381	1,380
CMS ^d	-	0,033	0,073	0,082	0,093	0,101	0,944
KM ^{cd}	-	-	0,020	0,048	0,385	0,500	0,626
CM ^{cd}	-	-	-	0,094	0,360	0,535	0,895
KH1 ^b	-	0,002	0,015	0,079	1,142	1,152	1,224
KH2 ^{bc}	-	0,012	0,012	0,021	0,964	0,992	1,156
CH ^{cd}	-	0,002	0,002	0,007	0,408	0,466	0,955

a, b, c, d: Aynı harfe sahip örnekler arasında 24.saatteki inkübasyon bulgularına göre istatistiksel olarak bir fark yoktur ($p > 0,05$)

¹: Gelişme yok.



Şekil 4.6 : Ekstrakt ve hidrosollerin *C. krusei* ATCC 6258 suşu üzerine etkisi

Kereviz ve cevizin metanol su ekstraktları benzer olarak en fazla antimikrobiyal etkiyi gösterirken, bunları sırasıyla kereviz ve cevizin metanol ile elde edilen ekstrakt çözeltileri takip etmiştir. *Candida krusei* KUEN 1001 suşundan farklı olarak burada ceviz hidrosolü ile kereviz ve cevizin metanol ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi arasında istatistiksel analiz bulgularına göre bir fark belirlenmemiştir. Sonuçlara göre ceviz hidrosolünün de benzer antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada kerevizin sap ve yaprakları ile cevizin dış yeşil kabuğunun ekstrakt ve hidrosollerinin gram-negatif *E. coli* ve gram-pozitif *S. aureus* bakterileri ile *C. albicans* ve *C. krusei* mayalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Antimikrobiyal etkinin araştırılmasında disk difüzyon ve mikrodilüsyon antimikrobiyal test yöntemleri uygulanmıştır. Disk difüzyon yöntemi kullanılarak elde edilen bulgularda antimikrobiyal etki düşük oranda tespit edilmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak zamanla antimikrobiyal etkinin nasıl değiştiği incelenmiş ve disk difüzyon yöntemine göre antimikrobiyal etki daha etkili olarak araştırılmıştır. Çalışmada iki yöntemden elde edilen bulgular birlikte değerlendirilmiştir.

Ceviz ekstraktları ve kerevizin metanol-su ekstraktının en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu ekstraktlar hem bakteri suşları hem de maya suşları üzerinde farklı seviyelerde etki göstermişlerdir. Mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen verilere göre *E.coli* ve *S.aureus* bakterileri üzerinde ceviz ekstraktlarının kereviz ekstraktlarına oranla daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Hidrosoller genel olarak önemli düzeyde bir etki göstermemekle birlikte ceviz hidrosolünün *S.aureus* bakterisi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Ceviz ekstraktları ve kerevizin metanol-su ekstraktlarının bakteriler üzerinde olduğu gibi mayalar üzerinde de yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdikleri bulunmuştur. Mikrodilüsyon testi bulgularına göre kerevizin metanol-su ekstraktının özellikle *C. albicans* suşları üzerindeki etkisi ise dikkat çekici düzeydedir. Kerevizin yapısında yer alan fenolik ve nitrojen içeren bileşikler suda çözünür bileşiklerdir. Bu bileşiklerin antimikrobiyal aktivitenin artmasında etki göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

Tüm bu veriler ışığında bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin araştırılmasında, kullanılan çözücünün ve bitkinin içerdiği spesifik sekonder metabolitlerin varlığının önemi anlaşılmıştır. Antimikrobiyal aktivitenin hangi etken bileşikten kaynaklandığı kantitatif yöntemlerle araştırılmalı, bu etken bileşiğin çözünürlük profiline uygun çözücü seçilerek antimikrobiyal testler yapılmalıdır. Ayrıca süper kritik ekstraksiyon gibi yeni yöntemler araştırıp geliştirilmelidir.

Günümüzde hızla artış gösteren tüketim ve nüfusun sınırlı doğal kaynaklar üzerinde oluşturduğu baskı ve artan tüketici farkındalığı da göz önünde bulundurularak yeşil ekstraksiyon teknikleri olarak adlandırılan sürdürülebilir yöntemlerin uygulanmasına öncelik verilmelidir. Kaynakların verimli kullanılmasından yola çıkarak gıda sektöründe ve tarımsal uygulamalarda atık olarak çıkan bitkisel materyalin değerlendirilmesi de oldukça önemli başka bir noktadır. Bu anlamda pazarda tüketicinin tercih etmediği kereviz sap ve yaprakları ile ceviz üretiminde atık olarak ayrılan ceviz dış kabuğunun antimikrobiyal aktivitesi araştırılarak, atıkların yeniden değer kazanması umut edilmektedir.

Doğal antimikrobiyaller son yıllarda hem bilim dünyası hem de sektörün ilgi odağı durumundadır. Yapılan çalışmalarda umut vaat eden sonuçlar elde edilmekle birlikte, bu çalışmaların uygulanabilirlik kazanması önemlidir. Tüketici açısından kabul edilebilir, ekonomik açıdan sürdürülebilir ve gıdanın duyusal profiline uygun etkili standart antimikrobiyallerin keşfi çığır açıcı nitelikte olacaktır.

KAYNAKLAR

- Acharya, D., Rios, J. L., & Rai, M.** (2011). Naturally Occuring Biocides in the Food Industry. M. Rai, & M. Chikindas içinde, *Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality* (s. 1-9). Oxfordshire: CAB International.
- Adams, G. D., Cook, I., & Ward, K. R.** (2015). The Principles of Freeze-Drying. W. F. Wolkers, & H. Oldenhof (Dü) içinde, *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (s. 121-143). New York: Springer.
- Aminov, R. I.** (2010). A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front Microbiol.*
- Azmir, J., Zaidul, M., Rahman, M., Sharif, K. M., Mohamed, A., & Sahena, F.** (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.
- Baydar, H.** (2005). Damıtma, Ekstraksiyon ve Sıkma. *Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi* (s. 77-83). içinde Isparta: SDÜ Basımevi.
- Baydar, H.** (2005). Geleneksel Drog Hazırlama ve Kullanma Şekilleri. *Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi* (s. 57-63). içinde Isparta: SDÜ Basımevi.
- Bazaka, a., Bazaka, O., & Levchenko, I.** (2017). Plasma-potentiated small molecules—possible alternative to antibiotics? *Nano Futures*.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M.** (2012). Use of Natural Antimicrobials and High Pressure Homogenization to Control the Growth of *Saccharomyces bayanus* in Apple Juice. *Food Control*, 109-115.
- Bomgardner, M. M.** (2017, Temmuz). *The Long Road to All-Natural Preservatives*. Chemical & Engineering News: <https://cen.acs.org/articles/95/i31/The-long-road-to-all-natural-preservatives.html> adresinden alındı
- Branen, A. L.** (1993). Intriduction to Use of Antimicrobials. *Antimisrobials in Foods* (s. 2-3). içinde Moscow: Marcel Dekker, Inc.
- Büyükuncel, E.** (2012). Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(2), 209-242.

- Canlı, K., Yetgin, A., Akata, I., & Altner, E. M.** (2016). In vitro Antimicrobial Activity of *Angelica sylvestris* Roots. *International Journal of Biological Sciences*, 1-7.
- Council for Agricultural Science and Technology.** (1998). *Naturally Occurring Substances Exhibit Antimicrobial Activity in Food*. Ekim 2017 tarihinde http://www.cast-science.org/news/index.cfm/naturally_occurring_substances_exhibit_antimicrobial_activity_in_food?show=news&newsID=9854 adresinden alındı
- Cowan, M. M.** (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 564-582.
- Crozier, A., Clifford, M. N., & Ashihara, H.** (2007). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing.
- Davidson, M., Juneja, V. J., & Branen, J. K.** (2001). Antimicrobial Agents. *Food Additives* (s. 596-660). içinde Newyork: CRC Press.
- EFSA & ECDC.** (2018). *The European Union summary report on antimicrobialresistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016*. 2018 tarihinde <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182> adresinden alındı
- Emanuel, V., Adrian, V., Sultana, N., & Svetlana, C.** (2011). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethanol Extracts of *Cynara Scolymus* (*Cynarae folium*, Asteraceae Family) . *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 777-783.
- FDA.** (2016). *Foodborne Illnesses: What You Need to Know*. 2017 tarihinde U.S. Food and Drug Administration: <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM187482.pdf> adresinden alındı
- Fernández-Agulló, A., Pereira, E., M.S. Freire, P. V., Andrade, P., & González-Álvarez, J.** (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products* , 126-132.
- Firn, R.** (2010). *Nature's Chemicals*. New York: Oxford University Press.
- Geng, H., Yu, X., Lu, A., H. C., Zhou, B., & Zhou, L.** (2016). Extraction, Chemical Composition, and Antifungal Activity of Essential Oil of Bitter Almond. *International Journal of Molecular Sciences* .
- Guyot, N., Baron, F., & Godbert, R.** (2013). EggMeat Symposia 2013. *Antibacterial activity of egg white: influence of physico-chemical conditions*. Bergamo.

- Ilangovan, M., Guna, V., Hu, C., Nagananda, G., & Reddy, N.** (2018). Curcuma longa L. Plant residue as a source for natural cellulose fibers with Antimicrobial Activity. *Industrial Crops & Products*, 556-560.
- Kubeczka, K.-H.** (2015). History and Sources of Essential Oil Research. H. C. Baser, & G. Buchbauer (Dü) içinde, *Handbook of Essential Oils*. Boca Raton: CRC Press.
- Lawley, R.** (2010). *Food Safety Watch*. <http://www.foodsafetywatch.org/features/the-natural-alternative-antimicrobial-compounds-derived-from-nature-as-an-alternative-to-synthetic-preserved-in-food/> adresinden alındı
- Lucera, A., Costa, C., & Conte, A.** (2012). Food Applications of Natural Antimicrobial Compounds. *Frontiers in Microbiology*.
- Lück, E., & Martin, J.** (1997). *Antimicrobial Food Additives Characteristics - Uses - Effects*. New York: Springer.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Silva, S., & Henriques, M.** (2015). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. *Food Chemistry*, 131-137.
- Mat, A.** (2010). *Bitkiden İlaça Hepsinin Bir Öyküsü Var*. İstanbul: Pharma Vision.
- Michigan State University.** (2011). *Antimicrobials: An Introduction*. Antimicrobial Resistance Learning Site: <https://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/antimicrobials/antimicrobials-an-introduction> adresinden alındı
- Nobile, M. A., Lucera, A., Costa, C., & Conte, A.** (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*.
- Obu, R. N.** (2017, Ekim). Cranberry and Hibiscus: An Effective Innovative UTI Intervention....Novel Next-Generation Antimicrobial Defense. *Modern Ghana*.
- Ova, G.** (2009). Koruyucular. T. Altuğ içinde, *Gıda Katkı Maddeleri* (s. 105-134). İzmir: Sidas.
- Patel, N. B., & Patel, H. R.** (2010). Synthesis and Antibacterial and Antifungal Studies of Novel Nitrogen Containing Heterocycles from 5-Ethylpyridin-2-ethanol. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 613-620.
- Perez, P., Rodrigo, D., & Martinez, A.** (2015). Using Natural Antimicrobials to Enhance The Safety and Quality of Milk. T. T.M. içinde, *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Elsevier.

- Pina-Pérez, M. C., Rodrigo, D., & Martínez, A.** (2016). Nonthermal Inactivation of *Cronobacter sakazakii* in Infant Formula Milk: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Pulaj, B., Mustafa, B., Nelson, K., Quave, C. L., & Hajdari, A.** (2016). Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Pistacia terebinthus* essential oils derived from wild populations in Kosovo. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.
- Rai, M., & Chikindas, M.** (2011). *Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality*. Oxfordshire: CAB International.
- Ray, B., & Bhunia, A.** (2013). History and Development of Food Microbiology. B. Ray, & A. Bhunia içinde, *Fundamental Food Microbiology*. Boca Raton: CRC Press.
- Rousseau, O.** (2017, Haziran). "Groundbreaking" Natural Antimicrobial Agents Developed for Meat. Global Meat News Web Sitesi: <https://www.globalmeatnews.com/Article/2017/06/09/Natural-antimicrobial-compounds-made-for-meat> adresinden alındı
- Sánchez-Sánchez, H., & Morquecho-Contreras, A.** (2017). Chemical Plant Defense Against Herbivores. V. D. C. Shields içinde, *Herbivores*. InTech.
- Scharff, R.** (2015). State Estimates for the Annual Cost of Foodborne Illness. *Journal of Food Production*.
- Sharma, P., G.Ravikumar, M.Kalaiselvi, D.Gomathi, & C.Uma.** (2013). In vitro antibacterial and free radical scavenging activity of green hull of *Juglans regia*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 298-302.
- Sigma- Aldrich.** (tarih yok). *84086 Sabouraud 2% Glucose Agar*. 2018 tarihinde <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/84086dat.pdf> adresinden alındı
- Stevenson, P. C., Nicolson, S. W., & Wright, G. A.** (2017). Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions. *Functional Ecology*, 67-75.
- Şahin, K.** (2017). *İnsan ve Hayvan Sağlığında Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Antibiyotik Dirençlilik Raporu*. Ankara: Tüba.
- The Museum of Jurassic Technology.** (2001). *Collections and Exhibitions: Athanaseus Kircher*. 2017 tarihinde Contributions From The Museum of Jurassic Technology: <http://www.mjt.org/exhibits/kircher.html> adresinden alındı

- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J.** (2001). Investigation of the Effects of Ultrasound on Vegetal Tissues During Solvent Extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 137-142.
- UCLA.** (2017). *Illustrated Glossary of Organic Chemistry*. 2018 tarihinde UCLA Chemistry & Biochemistry: <http://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/D/distillation.html> adresinden alındı
- Ulafic, D. S., Pavlovic, M., & Ostojic, S.** (2013). Antimicrobial Effect of Natural Food Preservatives in Fresh Basil-Based Pesto Spreads. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1298-1306.
- USDA.** (2018, Nisan). *Use of Celery Powder and Other Natural Sources of Nitrite as Curing Agents, Antimicrobials or Flavorings*. United States Department of Agriculture: https://askfsis.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/2029/~/part-1-of-3%3A-use-of-celery-powder-and-other-natural-sources-of-nitrite-as adresinden alındı
- Varro, M. T.** (1912). *Varro on Farming*. London: G. Bell and Sons.
- Velicanski, A. S., Cvetković, D. D., & Markov, S. L.** (2011). Antibacterial Activity of Beta vulgaris L. Pomace Extract. *Acta Periodica Technologica*, 263-269.
- WHO.** (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*. Geneva: World Health Organization.
- WHO.** (2015). *Global Burden of Foodborne Diseases*. 2018 tarihinde http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferginfographics.pdf?ua=1 adresinden alındı
- WHO.** (2017). *Antibiotic Resistance*. World Health Organization Web Sitesi: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/> adresinden alındı
- WHO.** (2018). *What is the difference between antibiotic and antimicrobial resistance?* World Health Organization Web sitesi: <http://www.emro.who.int/health-topics/drug-resistance/what-is-the-difference-between-antibiotic-and-antimicrobial-resistance.html> adresinden alındı
- Wianowska, D., Cieniecka-Roslonkiewicz, A., & Dawidowicz, A.** (2016). Comparison of antifungal activity of extracts from different Juglans regia cultivars and juglone. *Microbial Pathogenesis*.
- Wink, M.** (2003). Evolution of secondary Metabolites from an Ecological and Molecular Phylogenetic Perspective. *Phytochemistry*, 3-19.

Yadav, J. S., Bezawada, J., Yan, S., & Tyagi, R. (2012). *Candida krusei*: biotechnological potentials and concerns about its safety. *Canadian Journal of Microbiology*, 937- 952.

Yılmaz, B., & Tosun, H. (2012). Sütte Bulunan Doğal Antimikrobiyal Sistemler ve Bunların Gıda Sanayiinde Kullanımı. *CBU Journal of Science*, 11-20.



EKLER

EK A: Mikrodilüsyon testinin 24.saatteki bulgularının tek yönlü varyans analizi (ANOVA)



EK A**Çizelge A.1** : Ekstrakt ve hidrosollerin *S. aureus* ATCC 25923 üzerine etkisi

Varyans kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Hata kareler ortalaması	F değeri	P değeri
İşlem	1,305	7	0,186	10,157	0,000
Hata	0,294	16	0,018		
Toplam	1,599	23			

Çizelge A.2 : Ekstrakt ve hidrosollerin *E. coli* ATCC 25922 üzerine etkisi

Varyans kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Hata kareler ortalaması	F değeri	P değeri
İşlem	8,698	7	1,243	226,360	0,000
Hata	0,088	16	0,005		
Toplam	8,786	23			

Çizelge A.3 : Ekstrakt ve hidrosollerin *C. albicans* ATCC 10231 üzerine etkisi

Varyans kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Hata kareler ortalaması	F değeri	P değeri
İşlem	7,076	7	1,011	87,609	0,000
Hata	0,185	16	0,012		
Toplam	7,261	23			

Çizelge A.4 : Ekstrakt ve hidrosollerin *C. albicans* ATCC 36802 üzerine etkisi

Varyans kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Hata kareler ortalaması	F değeri	P değeri
İşlem	5,773	7	0,825	117,130	0,000
Hata	0,113	16	0,007		
Toplam	5,885	23			

Çizelge A.5 : Ekstrakt ve hidrosollerin *C.krusei* KUEN 1001 üzerine etkisi

Varyans kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Hata kareler ortalaması	F değeri	P değeri
İşlem	4,097	7	0,585	57,464	0,000
Hata	0,163	16	0,010		
Toplam	4,260	23			

Çizelge A.6 : Ekstrakt ve mayaların *C. krusei* ATCC 6258 üzerine etkisi

Varyans kaynağı	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Hata kareler ortalaması	F değeri	P değeri
İşlem	5,959	7	0,851	9,893	0,000
Hata	1,377	16	0,086		
Toplam	7,335	23			



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Neriman Erdem
Doğum Yeri ve Tarihi : Kırcaali, 16.08.1990
Telefon : +90 554 6077933
E-Mail : erdemne@itu.edu.tr
nererdem@gmail.com

Eğitim

- İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2018)
Gıda Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans
- İstanbul Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Lisans (2014)
- Plovdiv Food Technology University, Erasmus (2013)
- Bursa Fen Lisesi (2009)

Çalışma Deneyimi

- Gekoo Gıda (Gıda Mühendisi, 2016-2017)
- Buğday Derneği (Proje Asistanı, 2015-2016)
- Doluca Bağcılık (Stajyer, 2014)
- Kafkas Pasta Şekerleme Sanayi A.Ş. (Stajyer, 2012)

Yetkinlikler

- **Bilgisayar:** Microsoft Office (Word/Excel/Power Point), Past
- **Yabancı Dil:** İngilizce (İleri/Orta), Bulgarca (Başlangıç)

Eğitim ve Seminerler

- Beden Dili Eğitimi (Giriřimcilik Kulübü, İTÜ 2010)
- Diksiyon ve Nefes Eğitimi (Aktif Felsefe Derneği, 2011)
- Kompost Atölyesi (Yeryüzü Derneği, İTÜ)
- Kovandan Sofraya İzlenebilir Arı Ürünleri Kongresi (İTÜ, 2014)
- Permakültüre Giriş Kursu (Türkiye Permakültür Araştırma Enstitüsü, 2015)
- Organik Tarım Eğitimi (Buğday Ekolojik Yaşamı Destekleme Derneği, 2015)
- Biyolojik Çeřitlilik Envanter Hesaplama Eğitimi (TÜBİTAK, 2017)
- Yemek Tasarım Atölyesi (Muđla Belediyesi, 2017)

Organizasyon ve Kulüpler

- Slow Food - Fikir Sahibi Damaklar
- Zumbara
- İtü Permakültür Kulübü (2014-2015)
- İtü Müzikal Topluluđu (2013-2014)
- İtü Dağcılık Kulübü (2012-2013)
- İtü Fotoğrafçılık (2011-2012)
- İtü Giriřimcilik Kulübü (2010-2011)

İlgi Alanları - Hobiler

- Fermente Gıdalar
- İklim Deđiřikliđi, Tarım, Toplum ve Gıda Sistemleri İlişkisi
- Etnobotanik, Yabani Besin Bitkileri
- Gıda Antropolojisi
- Yoga
- Dođa Sporları (Trekking, Dođa gözlem)
- Müzik Aktiviteleri (Bendir, Beden perküsyonu)
- Bitki çizimi