

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FENOLİK ASİTLERİN VE KOMBİNASYONLARININ ANTİMİKROBİYAL
VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Belis Ayça SAKARYA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı

Haziran, 2019

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FENOLİK ASİTLERİN VE KOMBİNASYONLARININ ANTİMİKROBİYAL
VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Belis Ayça SAKARYA
(Y1713.040001)

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Doktor Öğretim Üyesi Hatice ZENGİN

Haziran, 2019

ONAY FORMU



T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Yüksek Lisans Tez Onay Belgesi

Enstitümüz Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Gıda Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı Y1713.040001 numaralı öğrencisi **Belis Ayça SAKARYA** 'nın "FENOLİK ASİTLER VE KOMBİNASYONLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİ" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 12.06.2019 tarih ve 2019/12 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından **Öğr. Üyesi...** ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarak **Onaylanmıştır.**

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi : 26/06/2019

1) Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Hatice ZENGİN

2) Jüri Üyesi : Prof. Dr. Candan VARLIK

3) Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Banu METİN

[Handwritten signatures in blue ink over dotted lines]

Not: Öğrencinin Tez savunmasında **Başarılı** olması halinde bu form **imzalanacaktır**. Aksi halde geçersizdir.



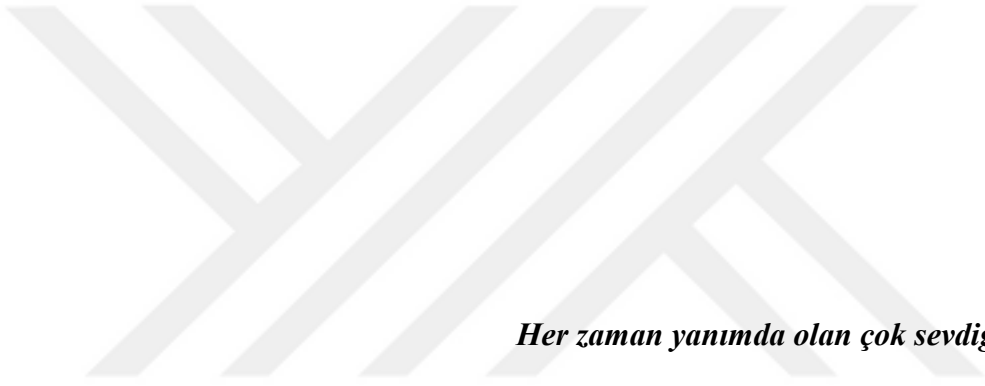
YEMİN METNİ

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Fenolik Asitlerin ve Kombinasyonlarının Antimikrobiyal ve Antioksidan Etkileri” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadarki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin Bibliyografya’da gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. (30.05.2019)

Belis Ayça SAKARYA







Her zaman yanımda olan çok sevdiğim aileme,



ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleriyle yardımlarını esirgemeyen tez danışman hocam İstanbul Aydın Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Öğretim üyesi sayın Dr. Öğr. Üyesi Hatice ZENGİN'e en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım. Analizlerim sırasında bana yardımcı olan sevgili Tuğçe MUTLU'ya teşekkür ederim.

Tez yazım aşamamın her anında ve hayattaki en büyük yardımcım annem Serpil SAKARYA'ya, manevi ve maddi desteklerinden ötürü babam İbrahim Halil SAKARYA'ya, ablam Gökçe Ceren SAKARYA'ya ve bu süreçte beni yalnız bırakmayan biricik dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2019

Belis Ayça SAKARYA



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
ABSTRACT	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1 Fenolik Asitler	3
2.1.1 Antioksidan özelliği	5
2.1.2 Antimikrobiyal özelliği	6
2.1.3 Gıdalarda bulunması ve sağlık açısından önemi.....	7
2.2 Çalışmada Kullanılan Fenolik Asitler	9
2.2.1 Gallik asit	9
2.2.2 Vanillik asit	12
2.2.3 o-kumarik asit	13
2.3 Benzer Çalışmalar	13
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1 Materyal	17
3.2 Metot	18
3.2.1 Antimikrobiyal aktivite belirlenmesi	18
3.2.1.1 Sinerjistik antimikrobiyal aktivite belirlenmesi.....	19
3.2.2 Antioksidan aktivite belirlenmesi	19
3.2.2.1 Sinerjistik antioksidan aktivite belirlenmesi	20
3.2.3 Fenolik asitlerin elma suyunda antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinin belirlenmesi	21
3.2.3.1 Fenolik asitlerin elma suyundaki esmerleşme reaksiyonuna etkisinin belirlenmesi	22
3.2.3.2 Fenolik asitlerin elma suyundaki antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi	23
3.2.4 İstatistiksel çalışma	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	25
4.1 Antimikrobiyal Aktivite Belirlenmesi.....	25
4.1.1 Sinerjistik antimikrobiyal aktivite belirlenmesi.....	26
4.2 Antioksidan Aktivite Belirlenmesi	27
4.2.1 Sinerjistik antioksidan aktivite belirlenmesi	28
4.3 Fenolik Asitlerin Elma Suyunda Antimikrobiyal ve Antioksidan Etkilerinin Belirlenmesi	29
4.3.1 Fenolik asitlerin elma suyunda esmerleşme reaksiyonuna etkisinin belirlenmesi	30

4.3.2 Fenolik asitlerin elma suyunda antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi.....	33
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKÇA	41
ÖZGEÇMİŞ.....	47



ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1: Fenolik asitlerin bakterilere karşı MIC değerleri (%)	25
Çizelge 4.2: Fenolik asitlerin bakterilere karşı MBC değerleri (%).....	26
Çizelge 4.3: Fenolik asitlerin kombinasyonlarının FIC değerleri	27
Çizelge 4.4: Fenolik asitlerin ve kombinasyonlarının %inhibisyon değerleri (ortalama±standart sapma).....	28
Çizelge 4.5: Fenolik asitlerin kombinasyonlarının SE değerleri	29
Çizelge 4.6: Gallik-vanillik asit kombinasyonunun elma suyundaki esmerleşme indeksi	31



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Fenolik asitlerin kimyasal yapısı a)hidroksibenzoikler, b)hidrosisinamikler	4
Şekil 2.2: Gallik asit	9
Şekil 2.3: Ferulik asit.....	11
Şekil 2.4: Vanillik asit	12
Şekil 2.5: o-kumarik asit.....	13
Şekil 4.6: Gallik-vanillik asit kombinasyonun ve kontrol grubunun ısı işlem uygulanmış elma suyundaki esmerleşme indeksi değerleri.....	32
Şekil 4.7: Gallik-vanillik asit kombinasyonun ve kontrol grubunun ısı işlem uygulanmamış elma suyundaki esmerleşme indeksi değerleri.....	32
Şekil 4.8: <i>E.coli</i> 'nin, gallik-vanillik asit kombinasyonlu(fenolik) ve kontrol grubu pastörize elma suyundaki büyüme eğrileri	34
Şekil 4.9: <i>S. Typhimurium</i> 'un, gallik-vanillik asit kombinasyonlu(fenolik) ve kontrol grubu pastörize elma suyundaki büyüme eğrileri.....	35
Şekil 4.10: <i>S. aureus</i> 'un, gallik-vanillik asit kombinasyonlu(fenolik) ve kontrol grubu pastörize elma suyundaki büyüme eğrileri.....	35



FENOLİK ASİTLERİN VE KOMBİNASYONLARININ ANTİMİKROBİYAL VE ANTIOKSİDAN ETKİLERİ

ÖZET

Fenolik asitler yaygın olarak bitkilerde bulunmakta ve ikincil metabolit olarak sentezlenmektedirler. Besinlerin stabilitesi, rengi, kalitesi gibi birçok özelliğinin korunması bakımından fenolik asitler önemlidir. Fenolik asitlerin insan sağlığına faydalarının olduğu da bilinmektedir. Özellikle antioksidan etkileri hücreler için oldukça önemlidir. Bu çalışmada, gallik asit (GA), ferulik asit (FA), vanillik asit (VA), o-kumarik asit (KA) ve bunların karışımlarının patojenik bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesi ve antioksidan etkisi belirlenmiştir. Buna göre, minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC), GA için, Escherichia coli (ATCC 25922)'de % 0.3 (w/v), Staphylococcus aureus (ATCC 25923) ve Salmonella Typhimurium (ATCC 14028)'da % 0.4 (w/v); FA için, Escherichia coli, Staphylococcus aureus ve Salmonella Typhimurium'da % 0,4 (w/v); VA için, Escherichia coli, Staphylococcus aureus ve Salmonella Typhimurium'da % 0,3(w/v); aynı şekilde CA için, Escherichia coli, Staphylococcus aureus ve Salmonella Typhimurium'da % 0,3 (w/v)'tür. Fenolik asitlerin karışımlarının antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde, fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FIC) değerlerinin 0.5 ila 4 arasında olduğu ve dolayısıyla fenolik asitlerin patojenik bakteriler üzerinde eşit bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Fenolik asitlerin antioksidan ve sinerjik antioksidan etkileri DPPH yöntemiyle belirlenmiştir. Buna göre, Sinerjistik Etkiler değeri (SE) 1'den büyük olduğu için sinerjistik etkileşimler gösterdikleri gözlemlenmiştir. Fenolik asitlerde gallik asit-vanillik asit kombinasyonunun pastörize elma suyundaki antioksidan ve antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Elmada bir kalite faktörü olan esmerleşme reaksiyonuna etkisi belirenmiş, renk değerlerinde neden olduğu değişimler gözlemlenmiştir. Bununla birlikte bu kombinasyonun patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi de incelenmiştir. Buna göre gallik asit-vanillik asit kombinasyonunun elma suyunda esmerleşme reaksiyonuna ısı işlem kadar etki edemediği belirlenmiştir. Renk değişim değerlerine bakıldığında ise, ısı işlem görmüş veya görmemiş fenolik asitli elma suyu gruplarının, fenolik asit içermeyen kontrol gruplarına kıyasla daha aşağıda değerler olduğu görülmektedir. En çok renk değişiminin ise ısı işlem görmemiş ve fenolik asit içermeyen elma suyunda olduğu gözlemlenmiştir. Aynı kombinasyonun pastörize elma suyunda 24 saatlik inkübasyonu sonucunda Escherichia coli bakterisini neredeyse tamamen yok ettiği, Salmonella Typhimurium bakterisini tamamen yok ettiği ve Staphylococcus aureus bakterisinin büyümesini yavaşlattığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Fenolik asitler, Sinerjistik etki, Minimum inhibisyon konsantrasyonu, Antioksidan, Antimikrobiyal, Elma suyu



ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF INDIVIDUAL AND COMBINATIONS OF PHENOLIC ACIDS

ABSTRACT

Phenolic acids are commonly found in plants and are synthesized as secondary metabolites. Phenolic acids are important for the preservation of many properties such as stability, color and quality of food. Phenolic acids are also known to have benefits for human health. Especially the antioxidant effects are very important for the cells. In this study, the antibacterial activity and antioxidant effect of the gallic acid (GA), ferulic acid (FA), vanillic acid (VA), o-coumaric acid (CA) and mixtures thereof, against pathogenic bacteria were determined. Accordingly, the minimum inhibition concentrations (MIC); of GA, 0.3% (w / v) for *Escherichia coli* (ATCC 25922), 0.4% (w/v) for *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Salmonella Typhimurium*; of FA, 0,4% (w/v) for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhimurium*; of VA, 0,3% (w/v) for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhimurium*, on the same way of CA, 0,3% (w/v) for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhimurium*. When the antimicrobial activity of the combinations of phenolic acids was examined, it was determined that the fractional inhibitory concentration (FIC) values were in the range of 0.5 to 4, and thus all the combinations had additive effect on the pathogenic bacteria. Antioxidant and synergistic antioxidant effects of phenolic acids were determined by DPPH method. Accordingly, synergistic interactions were observed because Experimental Scavenging Capacity (ESC)/ Theoretical Scavenging Capacity (TSC) value was greater than 1. The antioxidant and antimicrobial effects of gallic acid-vanillary acid deposition in the pasteurized apple juice were investigated in phenolic acids. The effect on the browning reaction, which is a quality factor in apple, has been observed and the changes caused by the color values have been observed. However, the antimicrobial effect of this combination against pathogenic bacteria was also investigated. According to this, it was determined that the combination of gallic acid-vallik acid did not affect the browning reaction in the hazel water as much as the heat treatment. When the color change values are considered, it is seen that the apple juice groups with or without heat treated phenolic acid have lower values than the control groups without phenolic acid. It was observed that the most color change was in non-heat treated apple juice which did not contain phenolic acid. It was concluded that the same combination completely destroyed the bacterium of *Escherichia coli* as a result of 24-hour incubation in pasteurized apple juice, completely destroyed the bacteria of *Salmonella Typhimurium* and slowed the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria.

Keywords: *Phenolic acids, Synergistic Effect, Minimum Inhibition Concentration, Antioxidant, Antimicrobial, Apple juice*



1. GİRİŞ

Besinlerin stabilitesi, rengi, kalitesi gibi birçok özelliğinin korunması bakımından fenolik asitler önemlidir. Fenolik asitler yaygın olarak bitkilerde bulunmakta ve ikincil metabolit olarak sentezlenmektedirler. Fenolik asitlerin insan sağlığına faydalarının olduğu da bilinmektedir. Fenolik asitler, gıdalarda doğal olarak bulunan ve antikarsinogenik, antioksidan, antifungal olması gibi birçok faydası araştırmalarda belirtilmiş bileşenlerdir. Doğada serbest yapıda olmaları onları antioksidan yapan etkidir. Aynı zamanda antimikrobiyal etkileri de antioksidan etkileri kadar önemlidir.

Yapılan çalışmada, gallik asit, ferulik asit, vanillik asit ve o-kumarik asit fenolik asitleri kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, fenolik asitlerin ve kombinasyonlarının antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinin belirlenmesi ve elma suyunda fenolik asitlerin bu etkilerinin incelenmesidir.

Elmalarda esmerleşmeye neden olan polifenoloksidaz enzimi sıcaklık ile inhibe olabilmektedir. Yapılan çalışmada antioksidan ve antimikrobiyal etkisi olduğu bilinen gallik asit-vanillik asit kombinasyonunun bu enzimin inhibisyonunda aktif rol oynayıp oynamadığı incelenmiştir.

Literatürde benzer çalışmalar bulunmaktadır ancak tez çalışmasında yapılan gallik asit-vanillik asit kombinasyonunun elma suyunda antioksidan ve antimikrobiyal etkisi birlikte incelenmemiştir. Bu tez çalışması doğrultusunda ileride yapılacak olan çalışmalarda, bu fenolik asit kombinasyonunun farklı gıdalar üzerindeki antimikrobiyal ve antioksidan etkisi veya farklı fenolik asitlerin kombinasyonlarının elma suyunda ve/veya farklı gıdalardaki antimikrobiyal ve/veya antioksidan etkisi incelenebilir.



2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 Fenolik Asitler

Fenolik asitler, doğal olarak hemen hemen bütün bitkilerde bulunan, bitkisel sekonder metabolitler grubudur. Fenolik terimi, fenol ile benzer bir yapıya sahip herhangi bir bileşiği belirtmektedir (Vaquero ve diğ., 2007). Sebze ve meyvelerde bol miktarda bulunmaktadır (Alakomi ve diğ., 2007; Andjelkovic ve diğ., 2006). Bu bileşiklerin bitkilerde birtakım temel işlevleri vardır (Einhellig, 2004). Bunlardan en önemlileri; bitkiye lezzet ve aroma vermeleri, mikroorganizmalar ve böcekler gibi istilacı patojenlere ve strese karşı bitkide savunma mekanizması olarak işlev görmeleridir (Shetty ve Lin, 2006; Wells ve Berry, 2005). Ayrıca bitkileri UV ışınlarından ve oksijensiz radikallerden korumaktadırlar (Lacombe ve diğ., 2010).

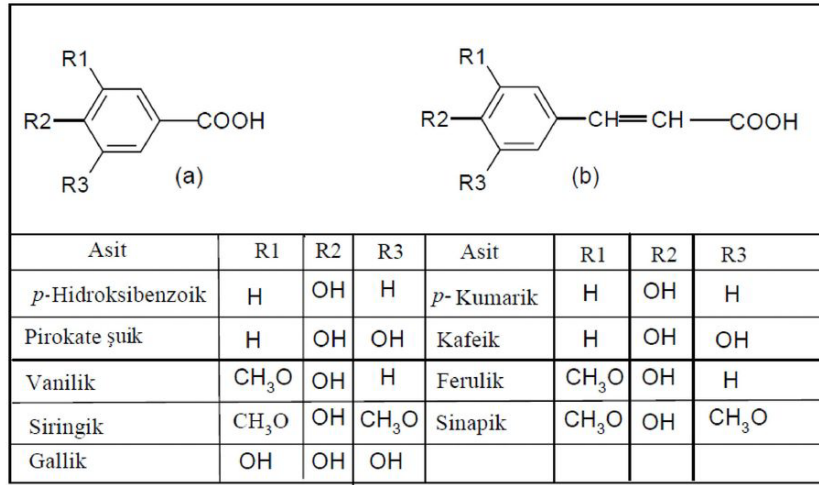
Sekonder metabolitler, bitki ile çevre arasındaki etkileşimin ürünleridir ve sınırlı bir şekilde meydana gelirler (Goleniowski ve diğ., 2013). Fenolik asitlerin büyük çoğunluğu, glikozitlerin veya organik asitlerin esterleri halinde bulunmaktadır. Bununla birlikte bitkilerde proteine ya da hücre duvarı polimerlerine bağlı halde de olabilmektedirler. Doğada serbest halde bulunan fenolik asitlerin miktarı ise oldukça azdır.

Genel olarak “fenolik asitler” ismi bir karboksilik asit işlevselliğine sahip fenollerini ifade eder. Fenolik asitlerin yapılarında bulunan karboksil grupları, tepkimeye girdikleri maddelere göre çeşitli bileşenleri oluştururlar. Karbonhidratlarla birlikte glikozitleri oluştururken, aminoasitler veya proteinlerle yaptıkları bileşiklerde amidleri oluşturabilmektedirler. Bununla birlikte, karboksil grupları, alkollerle reaksiyona girerek bir su kaybı meydana getirmesi ile fenol esterleri oluştururlar. Fenol halkasına bağlı bulunan hidroksil grupları çok aktif olan fenolik asitler, şekerlerle birleşmesi sonucunda da glikozitleri meydana getirmektedirler (Anonim 1, 2016).

Doğal olarak oluşan bu fenolik asitler, karbon yapılarına göre sınıflandırılabilir:

- Hidroksisünamik yapıdaki fenolik asitler
- Hidroksibenzoik yapıdaki fenolik asitler

Temel iskelet aynı olmasına rağmen aromatik halka üzerindeki hidroksil gruplarının sayıları ve konumları bu iki grup arasındaki çeşitliliği yaratmaktadır. Hidroksisünamik asitler, bir etilen grubunun mevcudiyeti ile hidroksibenzoik asitlerden ayrılır (Keman, 2012). Hidroksisünamik asitlerde karboksilik grubu, bir etilen grubu vasıtasıyla benzen halkasına bağlanmaktadır. Bununla birlikte, hidroksibenzoik asitlerde karboksilik grubu doğrudan aromatik halkaya bağlanmaktadır (Şekil 1) (Andjelkovic ve diğ., 2006). Fenolik asitlerden; kafeik, p-kumarik, vanillik, ferulik ve protokatejik neredeyse tüm bitkilerde bulunan asitlerdir (Robbins, 2003). Diğer asitler ise seçilen yiyeceklere veya bitkilere özgüdür (örneğin, gentisik, siringik).



Şekil 2.1: Fenolik asitlerin kimyasal yapısı a)hidroksibenzoikler, b)hidrosisünamikler (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010)

➤ Hidroksisünamik asitler

Bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunan ve C₆-C₃ fenilpropan yapısında olan hidroksisünamik asitler, hidroksil grubunun bulunduğu konuma ve bu grupların sayısına göre farklı özellikler göstermektedirler. Bunlar arasında kafeik asit, ferulik asit, o-kumarik asit ve p-kumarik asit önem taşımaktadır (Anonim 1, 2016).

Hidroksisünamik asitlerin çok az bir miktarı serbest halde bulunmaktadır. Bu yapıdaki asitler çoğunlukla tartarik asit, kuinik asit ve şikimik asitin şeker türevleri halindedirler. Bununla birlikte gıdalarda, bu asitlerin esterleri de yaygın olarak bulunmaktadır (Naczki ve Shahidi 2004; Balasundram ve diğ., 2006; Fischer ve diğ., 2007; Ignat ve diğ., 2011).

➤ **Hidroksibenzoik asitler**

Hidroksisünamik asitlerin oksidasyonu sonucu oluşan hidroksibenzoik asitler, C6-C1 fenilmetan yapısındadır. Bu yapılar, hidroksi ve metoksi gruplarının konumu ve sayılarına göre çeşitlilik göstermektedirler. Bitkisel gıdaların yapısında hiç bulunmayabildikleri gibi, oldukça az miktarlarda da bulunabilmektedirler. Bu gruptaki fenolik asitlerden; salisilik, vanillik, p-hidroksibenzoik, gallik ve siringik asite gıdalarda yaygın olarak rastlanmaktadır (Özçelik ve Özeydin, 2013).

Renksiz bir yapısı olan hidroksibenzoik asitler, gıdalarda genellikle suda çözülmüş şekilde veya esterleşmiş halde bulunmaktadırlar. Şekerler, organik asitler ayrıca ligninler gibi maddeler bu etkileşimde önemli rol oynamaktadırlar (Atak ve Uslu, 2018).

2.1.1 Antioksidan özelliği

Fenolik asitler gıdaların renkleri, duyuşal nitelikleri, besleyici ve antioksidan özellikleri ile ilişkilendirilmektedir. Bunlara ek olarak, gıda endüstrisi, fenolik asitlerin; içeriği ve profilini, meyve olgunlaşmasına etkilerini, enzimatik esmerleşmenin önlenmesindeki görevlerini ve gıda koruyucu madde olarak rollerini araştırmıştır (Shahidi ve Naczki, 1995; Toma's-Barbera'n, 2001; Fernándeş-Zurbano ve diğ., 1998).

Fenolik asitler, fenol kısmının reaktivitesine bağılı olarak antioksidanlar gibi davranmaktadır. Aromatik halka üzerindeki hidroksil grubunun konumu ve sayısı fenolik asitlerin antioksidan aktivitelerini etkilemektedir (Marinova ve Yanishlieva, 2003). Birkaç mekanizma olmasına rağmen, fenolik asitlerin baskın antioksidan aktivite çeşidinin, hidrojen atomu vermeleriyle radikalleri süpürücü etki oluşturmaları olduğı düşünölmektedir (Javanmardi ve diğ., 2003). Fenolik asitlerin bir diğeri antioksidan etki çeşidi ise geçiş metalleriyle şelat

oluşturmalarıdır (Cadenas ve Packer, 2002; Lodovici ve diğ., 2001; Sroka ve Cisowski, 2003).

Yapılan çalışmalarda, fenolik asitlerin lipid oksidasyonunda da etkili olduğu gözlemlenmiştir. Burada etkili olan antioksidan aktivitenin de radikal süpürme yoluyla olduğu ve bu şekilde lipid peroksidasyonunun da önlendiği belirlenmiştir (Cadenas ve Packer, 2002).

Fenolik asitlerin antioksidan aktiviteleri üzerine yapılan farklı çalışmalarda, yapılarında bulunan hidroksil grubu sayısının artması ile antioksidan aktivitelerinin de arttığı gözlemlenmiştir (Fukumoto ve Mazza, 2000). Benzer şekilde yapılan bir diğer çalışmada ise metoksil grubu bulunduran fenolik asitlerdeki antioksidan aktivitenin, taşımayanlara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Hidroksi gruplarının orto-pozisyonu ile bağlı olması da fenolik asitlerin antioksidan aktivitelerinde bir avantaj oluşturmaktadır (Marinova ve Yanishlieva, 2003).

Fenolik asitlerin hidroksisinamik asit yapısında olanlarının, hidroksibenzoik asit yapısında olanlara göre daha etkili antioksidan aktivite gösterdiği de araştırmalar arasındadır (Peyrat-Maillard ve diğ., 2000).

2.1.2 Antimikrobiyal özelliği

Fenolik asitler, membran ve sitoplazma ile etkileşerek mikrobiyal hücreleri etkilemektedirler. Hücre zarındaki protein-lipid oranlarını etkileyerek zarın uygun işlev mekanizmasını bozmaktadırlar. İkincil mekanizmanın ise hücre içi pH'ı düşürdüğü ve protoplazmik zehirler gibi davrandığı düşünülür.

Fenolik asitler zayıf organik asitlerdir ($pK_a \sim 4.2$) ve ayrışmamış asidin konsantrasyonu fenolik asidin antimikrobiyal aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. Kısmen lipofilik olduklarından, hücre zarı boyunca muhtemel geçişleri pasif difüzyonla meydana gelmektedir. Bu şekilde hücredeki zar yapısını bozmakta, sitoplazmayı asitleştirmekte ve protein denatürasyonuna neden olmaktadır (Campos ve diğ., 2009).

Hidroksil gruplarından hidrojen vererek, lipidlerin ve diğer biyolojik moleküllerin serbest radikal oksidasyonunu sonlandırırılar. Fenoliklerin bu yeteneği onları etkili antioksidanlar yapmaktadır. Bu tür zincir reaksiyonunun

önlenmesi, hücresel membranın işlevini bozmakta ve prokaryotlarda antimikrobiyal aktiviteye yol açmaktadır (Shetty ve Lin, 2006). Ayrıca antimutagenik, antikarsinojenik, kardiyoprotektif ve antiinflamatuvar özellikler sergilemektedirler (Andjelkovic ve diğ., 2006).

Fenolik asitlerin antibakteriyel etkileri de araştırmalarda incelenmiştir. Farklı bitki kaynaklarından izole edilen ferulik, izovanilik, p-hidroksisinamik, p-hidroksibenzoik, siringik, kafeik, gentisik, protokatejik, p-kumarik, vanillik ve p-hidroksibenzoik asitler, güçlü antibakteriyel aktiviteler sergiledikleri belirtilmiştir (Goleniowski ve diğ., 2013). Bu bileşikler aynı zamanda, fungal büyümeyi inhibe etmeden *Aspergillus flavusun* aflatoksin üretimini de inhibe etmekte ve *Pseudomonas aeruginos'a* ve *Staphylococcus aureus'a* karşı bakterisidal aktivite göstermektedir (Goleniowski ve diğ., 2013).

Yüzey yapışmaları, hücre duvarı polipeptitleri ve zara bağlı enzimlerin, sülfiril grupları ile reaksiyona girerek veya proteinlerle spesifik olmayan etkileşimler yoluyla inhibe edilmesi, bakteriyel hücrelerde inhibisyon için potansiyel hedefler olmaktadır (Shetty ve Lin, 2006; Cowan, 1999).

Fenolik asitlerin bulunduğu sınıf, antimikrobiyal aktivitelerinde etkili olmaktadır. Hidroksisinamik asit yapısındaki fenolik asitler, hidroksibenzoik asit yapısındakilere göre daha az polardır. Hidroksisinamik asitlerin polaritesinin azalması, propenoik yan zincirlerinden kaynaklanmaktadır. Bu yan zincire sahip olmak, hidroksisinamik asitlerin hücre zarı boyunca taşınmasını kolaylaştırabilmekte ve inhibe edici etki için önemli bir rol oynayabilmektedir (Vaquero ve diğ., 2007).

Fenolik asit üzerindeki hidroksil gruplarının konumu ve sayısı da, mikroorganizmaların toksisitesini etkilemektedir. Artan hidroksil grupları, inhibe edici etkiyi artırmaktadır (Tripoli ve diğ., 2005; Sher, 2009).

2.1.3 Gıdalarda bulunması ve sağlık açısından önemi

Fenolik asitler, diyet fenollerinin neredeyse üçte birini oluşturur ve gıdaların organoleptik, beslenme ve antioksidan özellikleri ile ilişkilidir (Clifford, 1999; Tan, 2000). Fenolik asitler, yeterli miktarda meyve, sebze ve kepekli tahıllar içeren dengeli bir diyetle bol miktarda bulunur. Kaynaklar arasında mango,

çilek, elma, narenciye, erik, kiraz, kivi, soğan, çay, kahve, kırmızı şarap ve buğday, pirinç, mısır ve yulaf unu bulunur. Bitki bazlı gıdalarda yaygın oldukları için insanlar günlük olarak fenolik asit tüketirler. Basitlikleri nedeniyle kolayca emilirler. Tahmini tüketim aralığı diyete bağlı olarak günde 25 mg ila 1 g'dır (Shahidi ve Naczki, 2004). Meyveler arasında en yüksek içerik üzüm meyvesindedir (28 mg / 100 g). Kahve (97 mg / 100 g) yanı sıra yeşil ve siyah çaylar (30-36 mg / 100 g), içecekler arasında en iyi kaynaklardır.

Literatürde, ağırlıklı olarak meyve ve sebzelerle yapılan beslenmenin, sağlıklı olmakla ve hastalıkların önlenmesiyle ilişkilendirildiği bildirilmiştir. Mevcut düşünceye göre, meyve ve sebzelerin yüksek antioksidan içeriği; koroner kalp hastalığı, felç ve kanser gibi oksidatif hasar hastalıklarının inhibisyonu ile ilişkilendirmektedir (Robinsr, 2003). Bazı gıdalar, sağlığa zararlı koruyucu etkileri nedeniyle fonksiyonel gıdalar olarak bile sınıflandırılmaktadır (Stacewicz-Sapuntzakis ve diğ., 2001; Oomah, 2001).

Genel olarak, bitkisel besinlerde fenolikler tartışılırken, flavonoidler, diyet fenollerinin yaklaşık üçte ikisini oluşturarak baskın sınıf olmaktadır. Bununla birlikte, fenolik asitler kalan üçte birinin neredeyse tümünü oluşturmaktadır. Fenolik asitlerle ilişkili antioksidan davranış ve potansiyel sağlık yararları konusunda artan bir farkındalık ve ilgi vardır (Scalbert ve Williamson, 2000).

Fenolik asitlerin önemli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip olduğu ve insan sağlığı için yararları olabileceği de literatürde bildirilmiştir. Bu bileşikler, potansiyel antioksidan aktiviteleri, kronik hastalıklardan kaynaklanan oksidatif stres kaynaklı doku hasarını azaltma kapasiteleri ve potansiyel olarak önemli antikanser aktivitelerini azaltmaları nedeniyle de insan diyetinin önemli bir parçasıdır (De la Rosa ve diğ., 2010; Harris ve diğ., 2007).

İnsan immün yetmezlik virüsü (genellikle HIV olarak kısaltılan ve bağışıklık sistemini tahrip ederek immün yetmezlik sendromuna (AIDS) neden olan bir virüs), vücudun hücrelerinin içinde barındığı ve sürekli olarak yeni soylara aktarıldığı için bu virüsün tedavisi son derece zordur. Kafeik asit türevlerinin (örneğin, dikaffeoilkinik ve dikaffeoil tartarik asitler) insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) integralinin güçlü ve seçici inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. Bu enzim, viral DNA'nın konakçı kromatine entegrasyonunu

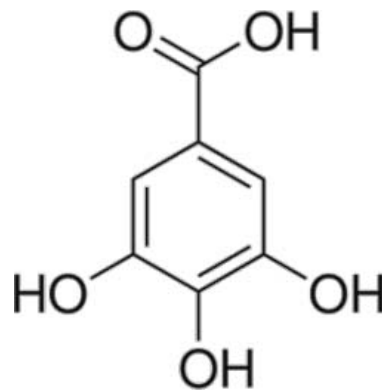
katalize eder. Bu nedenle, bu hidrokşisinat türevleri potansiyel antiviral tedavileri için araştırılmaktadır (Falsaperlaa ve diğ., 2005). Kafeik asit ve bazı esterleri kolon kanserine karşı antitümör aktivitesine sahip olabilir (Olthof ve diğ., 2001). Kanser, hücrelerdeki deoksiribonükleik asit (DNA) hasar gördüğünde gelişerek hızlı ve kontrol edilemeyen hücre büyümesine neden olarak sonuçta bir tümör oluşumuna yol açmaktadır. Bazı fenolik asitlerin doğrudan bir antiproliferatif etki gösterdiği bilinmektedir (Falsaperlaa ve diğ., 2005).

şarap ve “Akdeniz diyeti” gibi fenolik asit yönünden zengin ürünlerin tüketimi, kardiyovasküler hastalık riskinin azalmasıyla ilişkilidir. Fenolik bileşikler hem insan hem de hayvan diyetlerinin önemli bir parçasıdır (Andjelkovic ve diğ., 2006). Tekli oksijeni ve serbest radikalleri sprrler ve bu şekilde antioksidan özellik gösterirler. Oksidasyonun neden olduğu hastalıklara karşı terapötik uygulamalar için potansiyele sahiptirler.

Yapılan çalışmalarda, birçok meyvenin ve meşrubatın orta ya da iyi fenolik asit kaynakları olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, daha yeni veriler sınırlıdır ve fenolik asit içerikleri hakkındaki veriler halen araştırılmaktadır (Keman, 2012).

2.2 Çalışmada Kullanılan Fenolik Asitler

2.2.1 Gallik asit



şekil 2.2: Gallik asit

Ana fenolik asitlerden biri olarak kabul edilen gallik asit (veya gallat) (3,4,5-trihidroksibenzoik asit), bir şeker birimi ve değişken sayıda fenol asit molekülü tarafından oluşturulan bir benzoik asittir (Şekil 2). Dağılımı, Anacardiaceae, Fabaceae ve Myrtaceae (Battestin ve diğ., 2004; Santos ve Mello, 2010) gibi sebze krallığının farklı ailelerini ve *Termitomyces* cinsinin mantarlarını kapsamaktadır (Puttaraju ve diğ., 2006).

1786'da bilim insanı Carl Wilhelm Scheele, bitkilerde gallik asidi tanımlayan ilk kişidir (Fischer, 1914). Bununla birlikte, bu molekül, araştırmacıların temel olarak antioksidan kapasitelerine olan ilgisini çekmektedir (Kim ve diğ., 2007). Literatürde tarif edilen diğer farmakolojik aktiviteler antikanser (Chia ve diğ., 2010; Liang ve diğ., 2012), anti-HIV (Kratz ve diğerleri, 2008), anti-alerjenik (Jung ve diğerleri, 2013), anti-enflamatuar (Couto ve diğ., 2013), antimikrobiyal (Kubo ve diğ., 2003) ve antifungal (Kubo ve diğ., 2001) etkiler olarak bilinmektedir. Son zamanlarda, Alzheimer hastalığında ilk adım olduğu düşünölen amiloid plakların oluşması aşamasında, gallik asidin etkin rol oynadığı ile ilgili bazı çalışmalar yayınlanmıştır (Jayamani ve Shanmugam, 2014; Liu ve diğ., 2014).

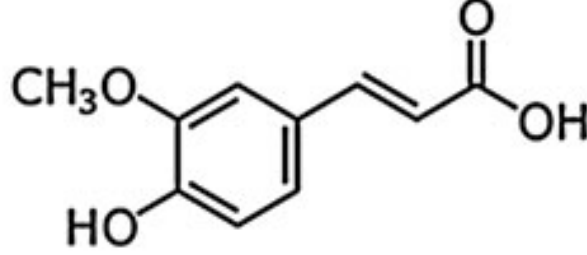
Gallik asit, insan prostat kanseri hücrelerinde antikanser aktivitesi sergilemekte ve antimelanojenik özelliklere sahip olmaktadır (Wu ve diğ., 2009). %55 gallik asit içeren akşam çuha çiçeğinin (*Oenothera biennis*) fenolik fraksiyonunun, antitümör aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (King ve diğ., 1999). İnsan glioma hücrelerinde beyin tümörlerinin tedavisi için bir aday olarak önerilmiştir. Gallik asit, HeLa rahim ağzı kanseri hücrelerinin ölümüne de neden olmaktadır (Goleniowski ve diğ., 2013).

Tıbbi yönlelere ek olarak, diğer alanlarda gallik asit uygulanır. İlk uygulaması deri ve deri endüstrisinde şelat ajanı olarak yapılmıştır (Costa ve diğ. 2013). Gallik asit, bir antimikrobiyal madde olan trimetopim'in sentezi için ve ayrıca yiyecek ve içeceklerde, özellikle serbest radikalleri süpürme gücü nedeniyle koruyucu olarak kullanılmaktadır (Bajpai ve Patil, 2008).

Çilek, üzüm, mazı, soya fasulyesi, yeşil çay, kestane ağaç kabuğu gibi bitkiler ve ağaçlar önemli miktarda gallik asit içermektedirler (Cadenas ve Packer,

2002; Ephraim ve diğ., 2005). Hayvanlarda tümör öldürücü etkiye sahip olduğu da bilinmektedir (Lodovici ve diğ., 2003).

2.2.2 Ferulik Asit



Şekil 2.3: Ferulik asit

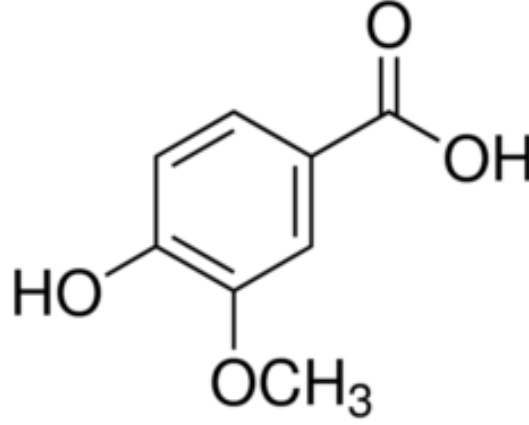
Ferulik asit (Şekil 3), fenilalanin ve tirozin metabolizmasından ortaya çıkan birçok yerde bulunan bir asittir. Çoğunlukla tohumlarda bulunur ve serbest halde bulunduğu gibi, lignin ve diğer biyopolimerlere kovalent olarak bağlanır. Fenolik asitlerin hidroksisiamik asit grubundandır (Bektaş ve Öztürk, 2005).

Ferulik asit, esas olarak mono ve oligosakaritler, poliaminler, lipitler ve polisakaritler ile konjüge edilir ve nadiren bitkilerde serbest halde meydana gelmektedir. Düşük toksisiteli bir fenolik asittir. İnsan vücudunda absorbe edilebilmekte ve kolayca metabolize edilebilmektedir. Ferulik asitin; antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar, anti-tromboz ve antikanser aktiviteleri gibi birçok fizyolojik fonksiyona sahip olduğu araştırmalar ile belirlenmiştir (Fujisawa ve diğ., 2002; Hosoda ve diğ., 2002). Aynı zamanda koroner hastalığa karşı korumakta, kolesterolü düşürmekte ve sperm canlılığını artırmaktadır. Bunlara ek olarak, mevcut araştırmalar ferulik asitin, insan vücudunda sağlık açısından daha etkili olabileceğini, ancak doğrulama için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Bu potansiyel sağlık yararları arasında; menopozal kadınlarda kemik dejenerasyonu, kanser, sıcak basması semptomları, cildin ultraviyole (UV) hasarından korunması, LDL kolesterolün kan seviyelerinin azaltılması (arterlerde tıkanmalara neden olabilecek ve riski artıran bir tür kolesterol), kalp hastalığı ve kan glukoz seviyelerini azaltarak diyabet tedavisinde etkisi bulunmaktadır (Lee ve diğ., 1998).

Özellikleri ve düşük toksisitesi nedeniyle ferulik asit, artık gıda ve kozmetik endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Vanilin ve koruyucuların üretimi için ham madde, gıda jelleri ve yenilebilir filmlerin hazırlanmasında çapraz bağlayıcı bir madde olarak ve spor gıdalarında ve cilt koruma maddelerinde bir bileşen olarak görev yapmaktadır (Bektaş ve Öztürk, 2005).

Greyfurt ve portakal bol miktarda ferulik asit içermektedir. Bununla birlikte elma, erik, üzüm yulaf gibi çeşitli gıdalarda da mevcuttur. Karbonhidratlarla hücre duvarının yapısında ester halinde bulunmaktadır (Bektaş ve Öztürk, 2005).

2.2.2 Vanillik asit

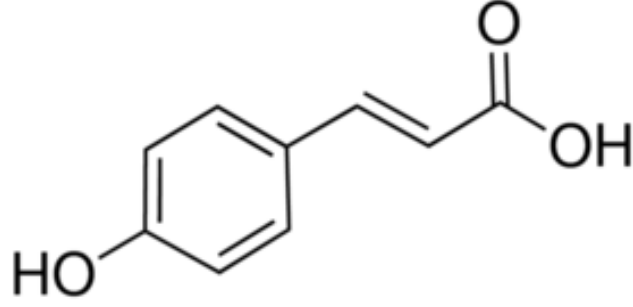


Şekil 2.4: Vanillik asit

Vanillik asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit) (Şekil 4), çözüldürülmüş lignin biyokütlesinin bir bileşenidir (Chow ve diğ., 1999). Karboksil grubunun aromatik halkaya doğrudan bağlanması ile bir hidroksibenzoik asittir. Yapı olarak, bir hidroksil grubuna ve bir metoksi grubuna sahiptir. Vanillik asit, kronik karaciğer hasarında karaciğer fibrozisini baskılayabilmektedir (Itoh ve diğ., 2009). Ayrıca, yılan zehrinin bir inhibitörü olduğu araştırmalarda belirlenmiştir (Dhananjaya ve diğ., 2009).

Vanillik asit; buğday kepeği, şarap ve ökaliptusta bulunmaktadır (Yu ve Zhou, 2005; Gonzales ve diğ., 2004).

2.2.3 o-kumarik asit



Şekil 2.5: o-kumarik asit

Genel formülü $C_9H_8O_3$ 'tür (Şekil 5). Fenolik asitlerin hidroksisinamik asit grubundadır (Robbinsr, 2003). Kiraz, kahve, portakal, çikolata ve şarapta bulunmaktadır. p-kumarik asitin, antibiyotik-antikanser etkisi olduğu ve oksidatif strese karşı bir koruma sağladığı araştırmalarda belirtilmiştir (Sousa ve diğ., 2004; Abdel ve diğ., 2003).

2.3 Benzer Çalışmalar

Borges ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, ferulik asit ve gallik asitin, dört patojenik bakteriye karşı (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, ve *Listeria monocytogenes*) antimikrobiyal aktiviteye sahip oldukları bulmuşlardır. Bu moleküller, hücre yüzeyi hidrofobikliği, yükü, indüklenmiş PI (propidyum iyodür) alımı ve K^+ sızıntısında önemli bir değişikliğe neden olmuştur. Gallik asit ve ferulik asit, hidrofobiklik değişimleri, negatif yüzey yükünün azalması ve hücre zarlarında lokal yırtılma veya gözenek oluşumunun meydana gelmesi ve bunun sonucunda hücre zarında temel hücre içi sızıntısının meydana gelmesiyle membran özelliklerinde (enerji, hücre içi ve hücre içi geçirgenlik ve fizikokimyasal özellikler) geri dönüşümsüz değişikliklere yol açtığı araştırmada belirtilmiştir (Borges ve diğ., 2013).

Vaquero ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, saf fenolik bileşiklerin (gallik asit, vanillik asit, protokateşuik asit, kafeik asit) ve farklı şaraplardaki polifenollerin patojenlere karşı antimikrobiyal özelliklerini incelemiştir. Bakteriyel türlerin, fenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonlarına karşı farklı hassasiyetler gösterdiği araştırmalarında gözlemlenmiştir. *Escherichia coli* en

hassas bakteri ve *Flavobacterium sp.* test edilen tüm fenolik bileşiklere karşı dirençli olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Yapılan çalışmada, tüm şarap numuneleri antimikrobiyal özellikler göstermiştir ve polifenollerin şaraptaki konsantrasyonu arttıkça inhibisyon oranının da arttığı belirlenmiştir. Aynı zamanda kırmızı şaraplarda bulunan polifenolik bileşiklerin, gözlemlenen antimikrobiyal etkilerden sorumlu olduğu da araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Vaquero ve diğ., 2007).

Wen ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, fenolik asitlerin (sinamik asit, kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit) *Listeria monositogenes*'lerin çeşitli suşlarına karşı aktivitelerini incelemişlerdir. Buna göre, test edilen tüm fenolik asitlerin, *L. monositogenes*'lerin çeşitli suşlarına karşı aktivite gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır. Fenolik asitlerin bakterilere karşı etkili oldukları konsantrasyonları belirleyip, ayrı ayrı asitler ve karışımlar ile çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Fenolik asitlerin karışımlarının bakteriler üzerinde ilave etkili türden olduğunu belirlemişlerdir. Hem bakteriyosidal hem de bakteriyostatik aktiviteler gözlemiş, etkinin pH'a bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle bu parametrenin ayarlanması fenolik asitlerden türetilen antimikrobiyal etkilerin ölçümü veya karakterizasyonu için gerekli olduğunu vurgulamışlardır (Wen ve diğ., 2003).

Mao ve arkadaşları, *Osmanthus fragrans* çiçeklerinin, yeşil çay ile sinerjistik antioksidan etkilerini incelemiş ve toplam sinerji miktarına katkıda bulunan ana antioksidan bileşikleri belirlemişlerdir. Buna göre, *O. fragrans* çiçeklerinde ana antioksidan bileşikler, akteozit ve saliderosit iken, yeşil çaydaki ana antioksidan bileşikler, kafein, gallik asit ve L-epicatechin olarak bulunmuştur. *O. fragrans* çiçekleri ve yeşil çay arasında anlamlı bir sinerjistik etki gözlenmiş ve bunların neredeyse hepsinde antioksidan bileşiklerinin kombinasyonları gözlenmiştir. Kombinasyonlar arasında, akteosit ve gallik asit, *O. fragrans* çiçekleri ve yeşil çay arasındaki antioksidan sinerjiye en çok katkıda bulunan kombinasyon olarak belirlenmiştir (Mao ve diğ., 2017).

Başka bir çalışmada, kafeik asit, rosmarinik asit ve karnosik asit gibi bazı fenolik asitler, farklı konsantrasyonlarda *Listeria monocytogenes*'e karşı test edilmiştir. Bakteriler, asitlere 9 saat maruz bırakıldığında, test edilen tüm

bileşiklerin inhibitör etki sergilediği ve en etkili olanın karnosik asit olduğu bulunmuştur. 72 saatlik maruz kalma durumunda ise kafeik, rosmarinik ve karnosik asitlerin hala engelleyici etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Del Campo, 2003).

Wang ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, gıdalar arasındaki etkileşimleri araştırmış ve sinerjik kombinasyonları tanımlamışlardır. Meyveler (ahududu, böğürtlen ve elma), sebzeler (brokoli, domates, mantar ve mor karnabahar) ve baklagiller (soya fasulyesi, adzuki fasulyesi, kırmızı barbunya fasulyesi ve kara fasulye) dahil olmak üzere üç kategoriden 11 yiyeceğin tek tek ve kombinasyonlarının sinerjistik antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Buna göre, belirli yiyeceklerin kategorileri arasında (örneğin meyve ve baklagiller) birleştirilmesi, bir yiyecek grubundaki kombinasyonlardan (örneğin sadece meyve) daha sinerjik antioksidan kapasiteye sahip olma olasılığının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, ahududu ve adzuki fasulyesi ekstraktlarının birleştirilmesi, sinerjik etkileşimler göstermiştir. Bununla birlikte gıda gruplarının sinerjistik, eş katkılı ve antagonistik antioksidan aktivite gösterdikleri de araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Wang ve diğ., 2011).

Bir başka çalışmada Luis ve arkadaşları, en çok tüketilen meyvelerden seçilmiş 19 majör polifenolün antioksidan aktivitesini ve bu polifenollerin kombinasyonlarının antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Buna göre, gallik asit, kersetin, ellagik asit ve siyanidin, serbest radikalleri süpürmekte ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmede olağanüstü antioksidan aktiviteye sahip bileşikler olduğu sonucuna varmışlardır. Ek olarak, karışımlardaki sinerjik etkilerin varlığına önemli ölçüde katkıda bulunan faktörün, toplam aromatik halka sayısının olduğu sonucuna varmanın mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, meyvelerin polifenollerinin aralarında etkileşime girebildiği, antioksidan özelliklerini geliştirdiği ve insanlara sayısız sağlık yararları sağladığı da bu çalışma ile gösterilmiştir (Luis ve diğ., 2018).

Colon ve Nerín yapmış oldukları çalışmada, hangi çay bileşenlerinin sinerjik etkileşimleri sağladığını ve sonuç olarak yeşil çayın antioksidan kapasitesinden hangi çay bileşenlerinin sorumlu olduğunu bilmeyi amaçlamışlardır. Buna göre, yeşil çay polifenolleri, yeşil çay ekstraktının toplam antioksidan kapasitesini

etkilediği, aralarında sinerjik, antagonistik ve eş katkılı antioksidan aktiviteler gösterdiğini belirlemişlerdir (Colon ve Nerin, 2015).



3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Bu tez çalışmasında fenolik asit olarak, gallik asit (Sigma 8.42649), ferulik asit (Sigma 128708), vanillik asit (Sigma H36001) ve o-kumarik asit (Sigma H22809) kullanılmıştır. Fenolik asitlerin stok çözeltilerini hazırlamak için etil alkol, metanol ve dimetil sulfoxit (DMSO) (Merck 8.02912) kullanılmıştır.

Raf ömrü çalışmalarında ise kırmızı elma (*Malus communis*) meyvesi deney materyali olarak kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite tayini için, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ve *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) bakterileri, Triptik Soy Agar (TSA) (Merck 1.05458) ve Triptik Soy Broth (TSB) (Merck 1.05459) besiyerleri kullanılmıştır.

Antioksidan aktivite tayini için ise DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve metanol kullanılmıştır.

Antimikrobiyal ve antioksidan tayinlerinde ve raf ömrü çalışmalarında İstanbul Aydın Üniversitesi Teknocenter Gıda Mühendisliği Laboratuvarlarında kullanılan cihazlar;

- Spektrofotometre,
- Spektrofotometre (Microplate reader),
- Renk tayini Hunter Lab Color Flex model renk tayin cihazı,
- Mikrobiyolojik analizler için etüv,
- Santrifüj,
- Katı meyve sıkacağı kullanılmıştır.

3.2 Metot

Bu tez çalışmasında fenolik asitlerin (gallik asit, ferulik asit, vanillik asit, o-kumarik asit) ve bunların kombinasyonlarının patojenik bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesi ve antioksidan etkisi incelenmiştir. Bu incelemeler doğrultusunda her bir patojen bakteriye karşı, fenolik asitlerin ve kombinasyonlarının, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) ve minimum bakteriyosidal konsantrasyonu (MBC) belirlenmiştir. Bu aktivitelerin gıdalarda raf ömrü süresinceki etkilerine bakılması için ise gallik asit-vanillik asit kombinasyonunun elma suyundaki antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi incelenmiştir.

3.2.1 Antimikrobiyal aktivite belirlenmesi

Fenolik asitlerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için ilk olarak fenolik asit stok çözeltileri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

- Gallik asit ve Ferulik asit için, etil alkol oranı maksimum %1 (v/v) olacak şekilde,
- Vanillik asit ve o-kumarik asit için, DMSO miktarı maksimum %2 (v/v) olacak şekilde hazırlanmıştır.

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella* Typhimurium bakterileri deneyden bir gün önce TSB'de canlandırılmıştır. Deney için önceden hazırlanan fizyolojik tuzlu su (FTS) ile bakterilerin McFarland'ı 1'e ayarlanmıştır. Ardından antimikrobiyal aktivite tayini için her bir fenolik asit stok çözeltisinden, %0,3 (w/v), %0,4 (w/v) ve %0,5 (w/v) konsantrasyonlarda olacak şekilde aşağıdaki oranlarda besi ortamı hazırlanmıştır, 37°C'deki etüvde (Binder marka 53 model etüv) 24 saat inkübe edilmiştir:

%0,3/4/5 Fenolik asit stok çözeltisi + %1 Patojen bakteri + %98,7/98,6/98,5 TSB

Kontrol için ise,

- Gallik asit ve ferulik asit için, fenolik asit içermeyen yalnızca aynı miktarlarda patojen bakterilerden ve etil alkol içeren besi ortamı,

- Vanillik ve o-kumarik asit için ise, benzer şekilde fenolik asit içermeyen yalnızca aynı miktarlarda patojen bakterilerden ve DMSO içeren besi ortamı hazırlanmıştır.

Buna göre, deney gruplarının 0. ve 24. saatlerde 620 nm’de absorbands ölçümleri yapılmış (Multiskan 357 Microplate Reader Spectrophotometer) ve 24. saatteki aktivitelerine TSA besiyerine ekim yapılarak bakılmıştır. Absorbans değerleri ve ekim sonuçları göz önüne alınarak fenolik asitlerin bakterilere karşı MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir. Deneyler her bir deney grubu için minimum 2 paraleli olacak şekilde çalışılmıştır.

3.2.1.1 Sinerjistik antimikrobiyal aktivite belirlenmesi

- MIC değerleri belirlenen fenolik asitlerin birbirleri ile $1/2MIC+1/2MIC$; $1/2MIC+1/4MIC$; $1/4MIC+1/2MIC$; $1/4MIC+1/4MIC$ olacak şekildeki kombinasyonlarının antimikrobiyal aktiviteleri (FIC) incelenmiştir. Sinerjistik antimikrobiyal aktivite (FIC) çeşidinin belirlenmesi için gerekli formüller şu şekildedir (Zengin ve Baysal, 2014);

$$FICA = \frac{\text{"A bileşenin kombinasyondaki MIC miktarı"}}{\text{"A bileşenin kendi MIC miktarı"}} \quad (\text{Denklem 1})$$

$$FICB = \frac{\text{"B bileşenin kombinasyondaki MIC miktarı"}}{\text{"B bileşenin kendi MIC miktarı"}} \quad (\text{Denklem 2})$$

$$FIC = FICA + FICB \quad (\text{Denklem 3})$$

Benzer şekilde hazırlanan besi ortamındaki patojen bakteri konsantrasyonu 10^5 kob/ml’dir. Besi ortamı olarak ise TSB kullanılmıştır.

Buna göre, deney gruplarının 0. ve 24. saatlerde 620 nm’de absorbands ölçümleri yapılmış ve 24. saatteki aktivitelerine TSA besiyerine ekim yapılarak bakılmıştır. Absorbans değerleri ve ekim sonuçları göz önüne alınarak fenolik asitlerin bakterilere karşı sinerjistik antimikrobiyal etki çeşitleri belirlenmiştir.

3.2.2 Antioksidan aktivite belirlenmesi

Fenolik asitlerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde fenolik asitlerin stok çözeltileri 1mM olacak şekilde metanolde

çözündürülerek hazırlanmıştır. Antioksidan aktivite DPPH metodu ile belirlenmiştir.

Bu metod kullanılarak yapılan deneyin %inhibisyon hesaplamalarında kullanılan formüller aşağıdaki gibidir (Sanchez-Moreno, 1998);

A_0 =DPPH çözeltisinin 0. dakikadaki absorbens değeri

A_{30} =Fenolik asit çözeltisinin 30. dakikadaki absorbens değeri

%İnhibisyon= $((A_0-A_{30})/A_0)*100$ **(Denklem 4)**

Buna göre, DPPH'ten 20mg/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözelti dayanıksız olduğundan günlük hazırlanmıştır. Buna göre;

- Hazırlanan stok fenolik asit çözeltileri distile su ile 0,5mM'a seyreltilmiştir.
- Antioksidan aktivite tayini için deney tüplerine 0,1 mL fenolik asit çözeltilerinden, üzerlerine 3,9 mL DPPH çözeltisinden ilave edilmiştir. Kontrol ise 0,1 mL metanolün üzerine 3,9 mL DPPH çözeltisi ilave edilerek hazırlanmıştır.
- Cam tüpler karanlık ortamda 30 dk bekletilmiş ve spektrofotometrede (Jenway 6315 Spectrophotometer) 517 nm'de absorbensleri ölçülmüştür.

3.2.2.1 Sinerjistik antioksidan aktivite belirlenmesi

Fenolik asitlerinin birbirleri ile sinerjistik antioksidan etkilerinin belirlenmesi amacıyla, 1mM olarak hazırlanan stok fenolik asit çözeltilerinin 1:1 olacak şekilde birbirleri ile farklı kombinasyonları hazırlanmıştır. Buna göre;

- Hazırlanan fenolik asitlerden 100'er µL cam tüplere konulmuş, üzerlerine 3,9 mL DPPH çözeltisinden ilave edilmiş ve 30 dk karanlıkta bekletilmiştir.
- 30 dakika sonunda tüplerin 517 nm'de absorbanları ölçülmüştür.

Bu yöntemle göre yapılan okumalar sonucunda ilk olarak, fenolik asit kombinasyonlarının deneysel süpürme kapasiteleri (ESC) aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Ardından teorik süpürme kapasiteleri (TSC) de aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır. Bu iki değer formüldeki

görüldüğü üzere, birbiri ile oranları da sinerjistik antioksidan etki değerlerini (SE) vermektedir.

- Sinerjistik antioksidan aktivite (SE) çeşidinin belirlenmesi için gerekli formüller şu şekildedir;

A_S = Örneğin absorbans değeri

A_B = Blank absorbans değeri

A_C = Kontrolün absorbans değeri

$$ESC = 100 \frac{(A_S - A_B) \times 100}{A_C} \quad (\text{Denklem 5})$$

$$TSC_{\text{mix}} = (ESCA + ESCB) - \frac{(ESCA - ESCB)}{100} \quad (\text{Denklem 6})$$

$$SE = \frac{ESC}{TSC} \quad (\text{Denklem 7})$$

3.2.3 Fenolik asitlerin elma suyunda antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinin belirlenmesi

Fenolik asitlerin elma suyunda antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde, gallik asit-vanillik asit kombinasyonunun, hazırlanan pastörize kırmızı elma suyunda antimikrobiyal ve antioksidan etkisi incelenmiştir. Antioksidan aktivite ve kalite özelliklerinin incelenmesinde kontrol olarak, fenolik asit içermeyen elma suyu kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite ise *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium* bakterilerine karşı incelenmiştir, kontrol olarak ise fenolik asit içermeyen, yalnızca aynı oranda bakterilerden içeren elma suyu kullanılmıştır.

Kırmızı elmaların ilk olarak kabukları soyulmuştur. Ardından elmalar dilimlenmiş ve katı meyve sıkacağında (Arzum, mela plus serisi) suyu ve posası ayrılmıştır. Elma suyu 4500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş (Hettich Rotofix 1206 santrifüj) ve süpernatantları toplanarak antimikrobiyal aktivite için pastörizasyon işlemi uygulanmış, 85°C'de 20 dk bekletilmiştir. Fenolik

asitlerin, elma suyunda esmerleşme reaksiyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla bir gün (24 saat) boyunca; renk ve esmerleşme indeksi analizleri yapılmıştır. Antimikrobiyal aktivitesine bakılması amacıyla da 0., 6. ve 24. saatlerde toplam bakteri sayımı yapılmıştır.

3.2.3.1 Fenolik asitlerin elma suyundaki esmerleşme reaksiyonuna etkisinin belirlenmesi

Fenolik asitlerin elma suyundaki esmerleşme reaksiyonuna etkisini incelemek için yapılan çalışmada, elma sularında ısıl işlemin de etkisini görmek amacıyla, ısıl işlem uygulanmadan ve ısıl işlem uygulanarak olmak üzere 2 grupta çalışılmıştır. Deney gruplarında kontrol olarak fenolik asit içermeyen elma suları kullanılmıştır. Her bir deney grubuna aşağıdaki analizler yapılmıştır.

➤ Renk analizi

Hunter Lab Color Flex (A60-1010-615 model renk ölçer, HunterLab, Reston VA) model renk cihazı ile yapılmıştır, L, a, b değerleri ölçülmüştür.

Renk analizi için elma sularınının 0., 6. ve 24. saatlerde L, a, b değerleri ölçülmüştür. L* aydınlığı, a* kırmızı/yeşil değerini ve b* sarı/mavi değerini ifade etmektedir. Bu değerlere göre renk değişim miktarı (ΔE) aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır (Özcan, 2008).

$L_0 = 0$. Saatte ölçülen L değeri

$L = t$ süre sonra ölçülen L değeri

$a_0 = 0$. Saatte ölçülen a değeri

$a = t$ süre sonra ölçülen a değeri

$b_0 = 0$. Saatte ölçülen b değeri

$b = t$ süre sonra ölçülen b değeri

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2}$$

(Denklem 8)

➤ Esmerleşme indeksi

Elma suyu örneklerinin spektrofotometre (Jenway 6315 Spectrophotometer), ile 420 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır.

3.2.3.2 Fenolik asitlerin elma suyundaki antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi

Fenolik asitlerin elma suyundaki antimikrobiyal etkisini incelemek için yapılan çalışmada *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium* bakterileri ile çalışılmıştır. Bakterilerin, gallik asit-vanillik asit kombinasyonu için daha önceden belirlenen FIC değerine göre besi ortamı hazırlanmış ve bir gün (24 saat) boyunca etkileri gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında ise yalnızca bakteri ve ısıt işlem görmüş elma suyu bulunmaktadır. Bütün besi ortamlarında bakteriler 10^5 kob/ml'dir.

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları için ilk olarak bakterilerin McFarland'ı FTS ile 1'e ayarlanmıştır. Deney gruplarının 0. ve 6. saatlerde, 1., 2., 3. ve 4. dilisyonları; 24. saatte ise 0. ve 1. dilisyonları TSA besiyerine ekim yapılarak incelenmiştir.

3.2.4 İstatistiksel çalışma

Tez çalışması kapsamındaki deneylerin sonuçlarının değerlendirilmesi için yapılan istatistiksel analiz çalışması için MİNİTAB 16 programında, ANOVA-ONEWAY kullanılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Antimikrobiyal Aktivite Belirlenmesi

Fenolik asitlerin (gallik asit, ferulik asit, vanillik asit, o-kumarik asit), patojen bakterilere (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium*) karşı antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi amacıyla, ilk olarak fenolik asitlerin bakterilere karşı minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC) ve minimum bakteriyosidal konsantrasyonları (MBC) belirlenmiştir. Bakterilerin besi ortamlarındaki konsantrasyonları sabit olup, fenolik asitler %0,5; %0,4 ve %0,3 (w/v) konsantrasyonlarda ilave edilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. MIC ve MBC değerlerinin belirlenmesinde, deney sonucunda yapılan ekimler ve absorbans ölçümleri göz önüne alınmıştır.

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) belirlenirken, deney sonucunda yapılan absorbans ölçümünün sabit kaldığı konsantrasyon göz önüne alınırken, minimum bakteriyosidal konsantrasyonunu (MBC) belirlemek amacıyla ise absorbans değerlerinin yanında petrilere hiç üreme olmayan minimum konsantrasyon göz önüne alınmıştır.

Buna göre deney sonucunda fenolik asitlerin patojen bakterilere karşı MIC ve MBC değerleri aşağıdaki tablolardaki gibidir (Çizelge 1, Çizelge 2).

Çizelge 4.1: Fenolik asitlerin bakterilere karşı MIC değerleri (%)

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Gallik asit	0,3	0,4	0,4
Ferulik asit	0,4	0,4	0,4
Vanillik asit	0,3	0,3	0,3
o-kumarik asit	0,3	0,3	0,3

Çizelge 4.2: Fenolik asitlerin bakterilere karşı MBC değerleri (%)

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Gallik asit	0,3	0,5	0,4
Ferulik asit	>0,5	>0,5	>0,5
Vanillik asit	0,5	>0,5	>0,5
o-kumarik asit	0,4	0,3	0,4

4.1.1 Sinerjistik antimikrobiyal aktivite belirlenmesi

MIC ve MBC değerleri belirlenen fenolik asitlerin, patojen bakterilere karşı kombinasyonlarının antimikrobiyal aktivite çeşitlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, fenolik asitlerin ikili kombinasyonları **1/2MIC+1/2MIC**; **1/2MIC+1/4MIC**; **1/4MIC+1/2MIC**; **1/4MIC+1/4MIC** olacak şekilde besi ortamına ilave edilerek incelenmiştir. Besi ortamındaki bakteriler 10^5 kob/ml'dir.

Deney sonucunda yapılan absorbans ölçümleri ve ekim sonuçları göz önüne alınarak etkili MIC kombinasyonları belirlenmiş ve formüller ile gerekli hesaplamalar yapılarak fenolik asitlerin antimikrobiyal aktivitelerinde, patojenlere karşı, birbirleri ile gösterdikleri sinerjistik antimikrobiyal aktivite çeşitleri (FIC) belirlenmiştir.

Buna göre hesaplanan FIC değeri; 0.5'e eşit veya bu değerden küçük olduğunda **sinerjistik**, 0.5 ila 4 aralığında olduğunda **eş katkılı** ve 4'ten büyük olması durumunda ise bu iki bileşen arasında **antagonistik** etki olduğu kabul edilmektedir (De Azeredo ve diğ., 2011; De Oliveira ve diğ., 2010; Mackay ve diğ., 2000).

Bu doğrultuda fenolik asitlerin kombinasyonlarının, patojen bakteriler için hesaplanan FIC değerleri aşağıdaki tablodaki gibidir (Çizelge 3).

Çizelge 4.3: Fenolik asitlerin kombinasyonlarının FIC değerleri

	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Gallik-Ferulik	1	0,75	0,75
Gallik-Vanillik	1	0,75	1
Gallik-o-kumarik	1	0,75	0,75
Ferulik-Vanillik	1	1	1
Ferulik-o-kumarik	1	1	1
Vanillik-o-kumarik	1	0,75	1

FIC değerlerine bakıldığında bütün değerlerin 0,5 ila 4 arasında olduğu görülmektedir. Buna göre bütün fenolik asitlerin, patojenlere karşı, birbirleri ile sinerjistik antimikrobiyal aktivite çeşidinin, **eş katkılı** etki şeklinde olduğu belirlenmiştir.

4.2 Antioksidan Aktivite Belirlenmesi

Fenolik asitlerin (gallik asit, ferulik asit, vanillik asit, o-kumarik asit) ve kombinasyonlarının antioksidan aktivitelerinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada, ilk olarak fenolik asitlerin %inhibisyon değerleri belirlenmiştir. Bu değerlerin hesaplanması için DPPH radikali giderme aktivitesi tayini metodu kullanılmıştır. DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil), 515 nm’de maksimum absorbansa sahip olan ve ticari olarak da elde edilebilen, stabil organik nitrojen radikalidir. Bu metodun prensibi, DPPH radikalinin, analizi yapılacak antioksidan tarafından bir redoks tepkimesi ile süpürülmesi esasına dayanır. Fenolik asitlerin antioksidan aktivite mekanizmasının, radikal süpürücü etki ile olması bu metodun tercih edilme sebebidir. 517 nm’de absorbans okuması yapıldığında ise, DPPH, bu tepkime ile absorbansın azalmasına neden olmaktadır. Spektrofotometre ile absorbansın sabitlendiği noktaya kadar görünür alanda bu süreç takip edilmektedir (Büyüktuncel, 2013).

Buna göre hesaplanan sonuçlar ise aşağıdaki tablodaki gibidir (Çizelge 4);

Çizelge 4.4: Fenolik asitlerin ve kombinasyonlarının %inhibisyon değerleri (ortalama±standart sapma)

	%İnhibisyon
Gallik	78,77±1,09
Ferulik	27,40±0,12
Vanillik	10,80±0,10
o-kumarik	3,96±0,52
Gallik-Ferulik	79,69±1,17
Gallik-Vanillik	80,44±0,34
Gallik-o-kumarik	81,46±0,47
Ferulik-Vanillik	31,61±0,71
Ferulik-o-kumarik	27,39±0,72
Vanillik-o-kumarik	15,89±0,66

4.2.1 Sinerjistik antioksidan aktivite belirlenmesi

%İnhibisyon oranları belirlenen fenolik asitlerin ikili kombinasyonlarının sinerjistik antioksidan aktivite çeşitlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada, fenolik asitler metanolde çözündürülerek hazırlanmıştır. Her iki fenolik asitten de aynı miktarda olacak şekilde karıştırılmış ve DPPH radikali giderme aktivitesi tayini metodu kullanılmıştır.

Bu yöntemle göre yapılan okumalar sonucunda ilk olarak, fenolik asit kombinasyonlarının deneysel süpürme kapasiteleri (ESC) ve teorik süpürme kapasiteleri (TSC) formüller kullanılarak hesaplanmıştır. Bu iki değerin birbiri ile oranları da sinerjistik antioksidan etki değerlerini (SE) vermektedir.

Buna göre hesaplanan SE değeri; 1'den büyük olduğunda **sinerjistik**, yaklaşık 1 olduğunda **eş katkılı** ve 1'den küçük olması durumunda ise bu iki bileşen arasında **antagonistik** etki olduğu kabul edilmektedir (Colon ve Nerin, 2016; Fuhrman ve diğ., 2000).

Buna göre fenolik asitlerin kombinasyonları için hesaplanan ESC, TSC ve SE değerleri aşağıdaki tablodaki gibidir (Çizelge 5);

Çizelge 4.5: Fenolik asitlerin kombinasyonlarının SE değerleri

	ESC	TSC	SE
Gallik-Ferulik	184,49	76,03	2,43
Gallik-Vanillik	183,55	90,56	2,03
Gallik-o-kumarik	184,61	96,54	1,91
Ferulik-Vanillik	150,30	96,75	1,55
Ferulik-o-kumarik	133,94	98,81	1,36
Vanillik-o-kumarik	122,39	99,53	1,23

SE değerlerine bakıldığında bütün değerlerin 1'den büyük olduğu görülmektedir. Buna göre bütün fenolik asitlerin kombinasyonlarının, birbirleri ile **sinerjistik** antioksidan aktivite göstermekte olduğu belirlenmiştir.

4.3 Fenolik Asitlerin Elma Suyunda Antimikrobiyal ve Antioksidan Etkilerinin Belirlenmesi

Fenolik asitlerin elma suyundaki antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde, gallik asit-vanillik asit kombinasyonunun, hazırlanan pastörize kırmızı elma suyunda antimikrobiyal ve antioksidan etkisi incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivite *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium* bakterilerine karşı

incelenmiştir. Daha önceden belirlenen gallik-vanillik asit kombinasyonunun bu bakteriler üzerindeki etkili konsantrasyon miktarına göre deney düzenlenmiştir.

Antioksidan aktivite için ise elmalarda bir kalite faktörü olan esmerleşme reaksiyonuna gallik-vanillik asit kombinasyonunun etkisi incelenmiştir. Elma sularında uygulanan ısıtma işleminin etkisinden bağımsız olarak fenolik asitlerin yalnızca kendi etkilerini görmek amacıyla, ısıtma işlemi uygulanmadan ve ısıtma işlemi uygulanarak olmak üzere iki deney grubuyla çalışılmıştır. Her iki deney grubunda da kontrol olarak fenolik asit içermeyen elma suyu kullanılmıştır.

4.3.1 Fenolik asitlerin elma suyunda esmerleşme reaksiyonuna etkisinin belirlenmesi

Fenolik asitlerin elma suyundaki esmerleşme reaksiyonuna etkisinin 1 gün (24 saat) boyuncaki etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmada, gallik-vanillik asit kombinasyonunun günlük hazırlanan elma suyu ile etkileşimine bakılmıştır. Elma suları günlük olarak hazırlanmış, ısıtma işlemi görmeden ve ısıtma işlemi görmüş olarak iki grupta incelenmiştir. Yapılan çalışmada elma suyundaki gallik-vanillik asit miktarı antimikrobiyal etki için yapılan çalışmadaki miktar ile aynıdır.

Polifenoloksidaz enzimi, elmalarda esmerleşmeye neden olmaktadır. Polifenoller, bu enzim ile oksitlenerek rengin kararmasına neden olmaktadır. Bu reaksiyon oksijenin bulunduğu ortamda kendiliğinden gerçekleşmektedir. Enzimatik esmerleşmeyi önlemek için antioksidan kullanmak, en yaygın yöntemlerden biridir. Ancak yapılan araştırmalarda bu esmerleşme reaksiyonunun ilgili fenolik bileşiğin türüne bağlı olduğu gözlemlenmiştir. Polifenoloksidaz enziminin bazı fenolik asitler tarafından inhibe edildiği, bazıları tarafından ise reaksiyonun desteklendiği araştırmalarda belirtilmiştir (Yılmaz ve Elmacı, 2018).

Elma suyunun endüstriyel üretiminde yapılan pastörizasyon işlemi ile de bu enzim inaktive edilebilmektedir. Antimikrobiyal ve antioksidan özelliği olduğu belirlenen gallik-vanillik asit kombinasyonunun, elma sularında bulunan bu reaksiyona etkisini incelemek adına esmerleşme indeksi analizi ve renk analizleri yapılmıştır. Isıtma işleminin etkisini gözlemlemek amacıyla da ısıtma

işlemi uygulanmamış elma suyu ile deneyler yapılarak, sonuçlar karşılaştırılmıştır.

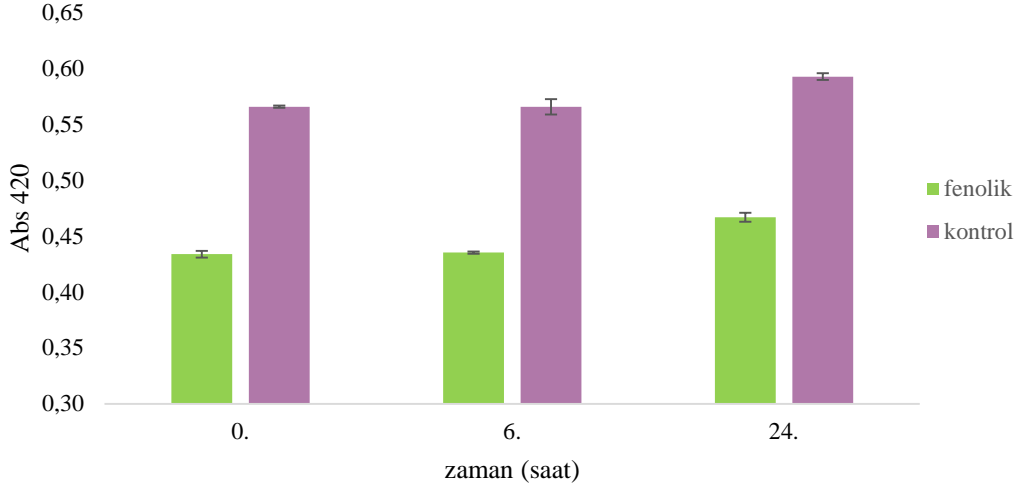
- Esmerleşme indeksi analizi için elma sularının 0., 6. ve 24. saatlerde spektrofotometre ile 420 nm’de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Buna göre değerler aşağıdaki tablodaki gibidir (Çizelge 6).

Çizelge 4.6: Gallik-vanillik asit kombinasyonunun elma suyundaki esmerleşme indeksi

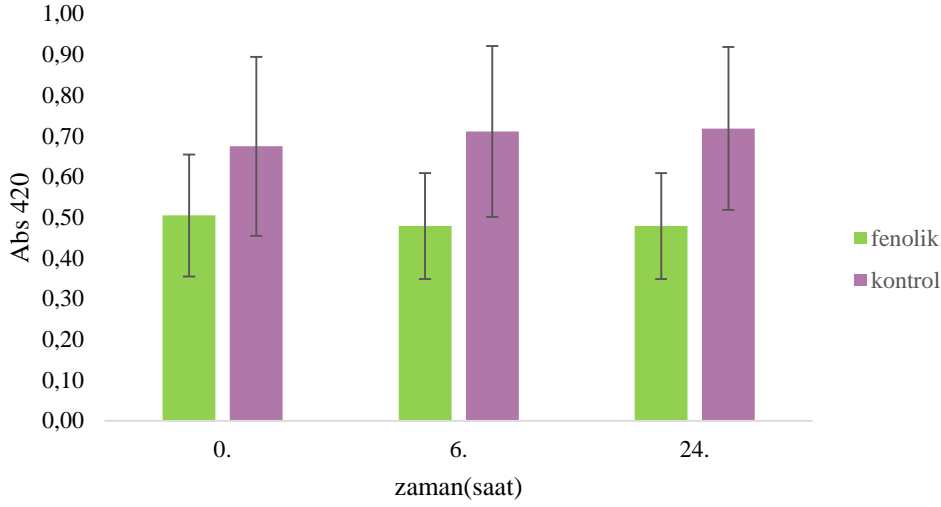
	Isıl işlemlili		Isıl işlemsiz	
	Fenolik asitli	Kontrol	Fenolik asitli	Kontrol
0	0,434±0,003 ^d	0,566±0,003 ^b	0,505±0,158 ^a	0,675±0,227 ^a
6	0,436±0,001 ^d	0,566±0,007 ^b	0,479±0,134 ^a	0,711±0,215 ^a
24	0,467±0,004 ^c	0,593±0,001 ^a	0,479±0,131 ^a	0,718±0,205 ^a

İstatistiksel analiz, ısıl işlemlili sonuçlar kendi arasında ve ısıl işlemsiz sonuçlar kendi arasında olmak üzere yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama±standart sapma olarak verilmiştir ve farklı harfleri içeren sütunlardaki değerler (a-d) birbirlerinden oldukça farklıdır. ($p < 0,05$).

Bu değerlerin doğrultusunda ısıl işlemlili ve ısıl işlemsiz elma sularının esmerleşme indeksi bakımından karşılaştırmalı grafikleri ise aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.6: Gallik-vanillik asit kombinasyonun ve kontrol grubunun ısı işlem uygulanmış elma suyundaki esmerleşme indeksi değerleri



Şekil 4.7: Gallik-vanillik asit kombinasyonun ve kontrol grubunun ısı işlem uygulanmamış elma suyundaki esmerleşme indeksi değerleri

- Renk analizi için elma sularının 0., 6. ve 24. saatlerde L, a, b değerleri ölçülmüştür. L* aydınlığı, a* kırmızı/yesil değerini ve b* sarı/mavi değerini ifade etmektedir (Özcan, 2008).

Buna göre hesaplanan ΔE miktarları ise aşağıdaki tablodaki gibidir (Çizelge 7).

Çizelge 7: Fenolikli asitli elma sularının ve kontrol gruplarının ΔE miktarları

	Isıl işlemlili		Isıl işlemsiz	
	Fenolik asitli	Kontrol	Fenolik asitli	Kontrol
0.saat	0	0	0	0
6.saat	2,56±0,09 ^{ab}	3,28±0,33 ^{ab}	1,87±0,38 ^a	1,85±0,24 ^a
24.saat	2,60±0,01 ^b	3,81±0,05 ^a	2,48±0,07 ^a	1,18±0,89 ^a

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir ve farklı harfleri içeren sütunlardaki değerler (a-b) birbirlerinden oldukça farklıdır. ($p < 0,05$).

ΔE miktarının; 0 ise renk değişimi olmadığı, 1 ise çok küçük bir renk değişiminin olduğu, 2 ise küçük bir renk değişiminin olduğu, 3 ise orta derecede bir renk değişiminin olduğu, 4 ise büyük ve 5 ise çok büyük bir renk değişimi olduğu sonucunu vermektedir.

Buna göre ısıl işlem uygulanan elma sularında ısıl işlemlili-fenolik asitli olanlarda 6. ve 24. saatteki ve fenolik asitli ısıl işlem uygulanmış elma suyunda 24. saatteki renk değişiminin yaklaşık 2 olduğu, yani küçük bir renk değişimi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte ısıl işlemlili elma suyunun kontrol grubunun 6. ve 24. saatteki renk değişimi yaklaşık 3 bulunmuştur, yani orta derecede bir renk değişimi olduğu belirlenmiştir.

Isıl işlem uygulanmayan elma sularına bakıldığında ise kontrol grubunun 6. ve 24. saatteki renk değişiminin yaklaşık 1 olduğu, aynı zamanda fenolik asitli elma suyunun 6. Saatteki renk değişiminin de yaklaşık 1 olduğu, yani çok küçük bir renk değişimi olduğu belirlenmiştir.

4.3.2 Fenolik asitlerin elma suyunda antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivite *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium* bakterilerine karşı incelenmiştir. Daha önceden belirlenen gallik-vanillik asit kombinasyonunun bu bakteriler üzerindeki etkili konsantrasyon miktarına göre deney düzenlenmiştir. Elma suları deneyler için kullanılmadan önce pastörize edilmiştir. Deney gruplarının 0., 6. ve 24. saatlerde TSA besiyerine ekimleri yapılmış ve sayımları gerçekleştirilmiştir.

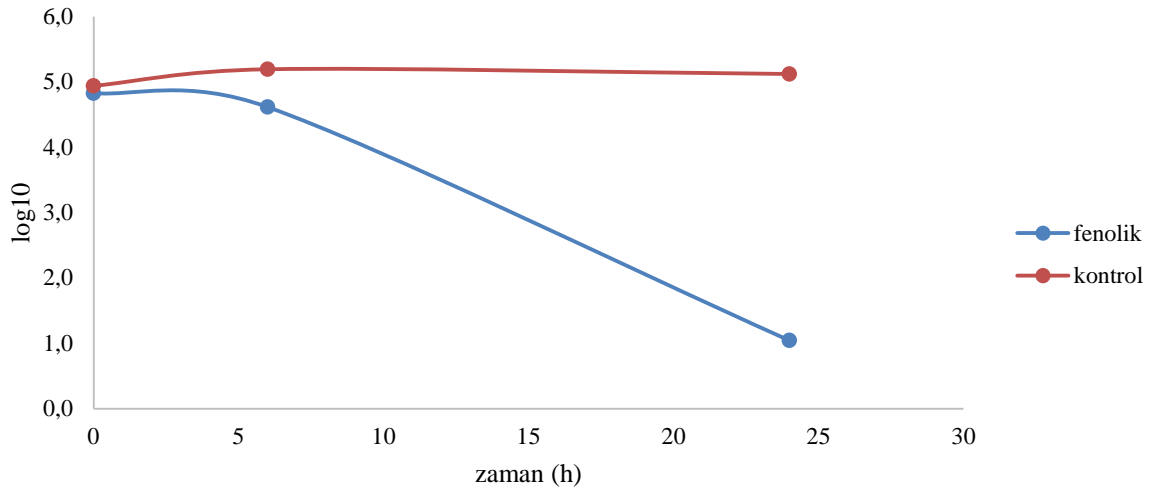
Buna göre elma sularındaki bakterilerin miktarı tablodaki gibidir (Çizelge 8);

Çizelge 8: Fenolik asitli elma suyundaki ve kontrol elma suyundaki bakterilerin miktarları (log)

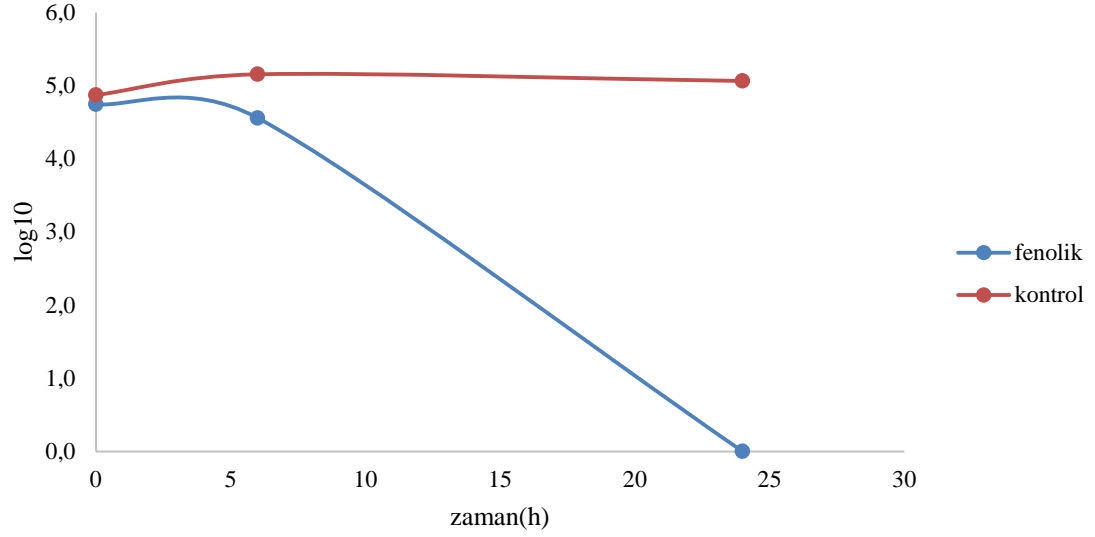
	Kontrol			Fenolik asitli		
	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>
0	4,82±0,05 ^{bc}	4,87±0,01 ^b	5,04±0,05 ^c	4,94±0,01 ^{abc}	4,74±0,03 ^b	5,03±0,04 ^c
6	5,19±0,08 ^a	5,15±0,06 ^a	5,24±0,04 ^{ab}	4,61±0,02 ^c	4,56±0,02 ^c	5,12±0,01 ^{bc}
24	5,12±0,08 ^{ab}	5,07±0,08 ^a	5,29±0,01 ^a	1,02±0,17 ^d	0,00 ^d	5,16±0,03 ^{abc}

İstatistiksel analiz, bütün bakteriler için kendi aralarında ve kontrol grupları kendi aralarında olmak üzere yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama±standart sapma olarak verilmiştir ve farklı harfleri içeren sütunlardaki değerler (a-d) birbirlerinden oldukça farklıdır. ($p < 0,05$).

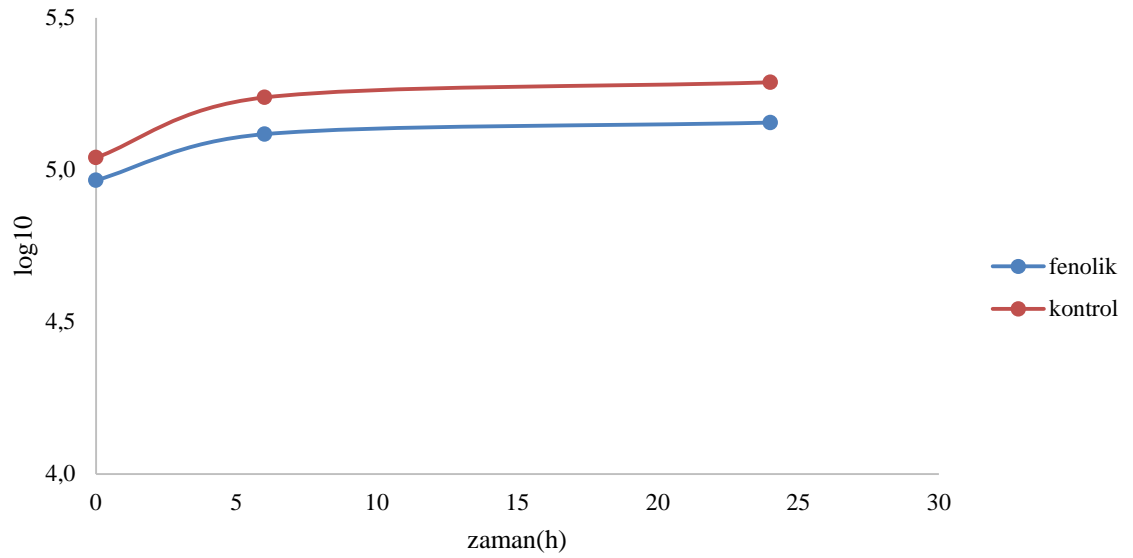
Buna göre bakterilerin büyüme eğrileri grafiklerdeki gibidir (Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10);



Şekil 4.8: *E.coli*'nin, gallik-vanillik asit kombinasyonlu(fenolik) ve kontrol grubu pastörize elma suyundaki büyüme eğrileri



Şekil 4.9: *S. Typhimurium*'un, gallik-vanillik asit kombinasyonlu(fenolik) ve kontrol grubu pastörize elma suyundaki büyüme eğrileri



Şekil 4.10: *S. aureus*'un, gallik-vanillik asit kombinasyonlu(fenolik) ve kontrol grubu pastörize elma suyundaki büyüme eğrileri

Buna göre, bakteri miktarlarına ve büyüme eğrileri göz önüne alındığında, fenolik asit kombinasyonunun elma suyunda; *E.coli* üzerinde oldukça etkili olduğu ve 24 saatte neredeyse tamamını yok ettiği, *S. Typhimurium* üzerinde de etkili olduğu ve 24 saatte bütün bakterileri yok ettiği, ancak *S. aureus*'ta diğer

bakterilerdeki kadar etkili olamadığı yalnızca bakteri büyümesini yavaşlattığı gözlemlenmiştir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Fenolik asitler gıdalarda doğal olarak bulunan ve ikincil metabolit olarak sentezlenen bileşenlerdir. Antikarsinojenik, antioksidan, antifungal olması gibi birçok faydası araştırmalarda belirtilmiştir. Fenolik asitler bitkisel gıdalarda bulunmaktadır. Doğada serbest yapıda olmaları onları antioksidan yapan etkendir. Aynı zamanda antimikrobiyal etkileri de antioksidan etkileri kadar önemlidir.

Yapılan çalışmada, gallik asit, ferulik asit, vanillik asit ve o-kumarik asit fenolik asitleri kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, bu fenolik asitlerin ve kombinasyonlarının antimikrobiyal ve antioksidan etkileri belirlenmesi ve elma suyunda fenolik asitlerin bu etkilerinin incelenmesidir. Buna göre ilk olarak antimikrobiyal aktivite belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium* patojen bakterilerine karşı incelenmiştir. Fenolik asitlerin konsantrasyonları ise %0,3 (w/v), %0,4 (w/v) ve %0,5 (w/v) olacak şekilde çalışılmıştır. Bu doğrultuda ilk olarak fenolik asitlerin bu bakteriler üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC) ve minimum bakteriyosidal konsantrasyonları (MBC) belirlenmiştir.

Buna göre, minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC), gallik asit için, *Escherichia coli*'de %0,3 (w/v), *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium*'da %0,4 (w/v); ferulik asit için, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium*'da % 0,4 (w/v); vanillik için, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium*'da % 0,3 (w/v); aynı şekilde o-kumarik asit için, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium*'da % 0,3 (w/v)'tür. MBC değerleri ise; gallik asit için, *Escherichia coli*'de %0,3 (w/v), *Staphylococcus aureus*'ta %0,5(w/v) ve *Salmonella Typhimurium*'da %0,4 (w/v); ferulik asit için ise üç bakteride de %0,5 (w/v)'ten büyük olduğu; vanillik asit için de benzer şekilde *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium*'da %0,5 (w/v)'ten büyük

olduğu, ancak *Escherichia coli*'de %0,5 (w/v) olduğu ve o-kumarik asit için *Escherichia coli* ve *Salmonella Typhimurium*'da %0,4 (w/v) olduğu, *Staphylococcus aureus*'ta ise %0,3 (w/v) olduğu sonucuna ulaşılmıştır. MIC değeri, fenolik asitlerin bakteriler üzerindeki etkili oldukları minimum inhibisyon konsantrasyonudur ve bu değer belirlenirken 620 nm'de okunan absorbans değerlerinin sabitlendiği en dűřük konsantrasyon göz önüne alınmaktadır. MBC değeri ise fenolik asitlerin bakterileri tamamen yok ettiği minimum bakteriyosidal konsantrasyondur. Bu değer belirlenirken absorbans okumalarının yanısıra, ekim yapılan petrilerde de üreme olmaması gerekmektedir.

Patojen bakterilere karşı MIC ve MBC değerleri belirlenen fenolik asitlerin ikili kombiasyonlarının da patojen bakterilere karşı sinerjistik antimikrobiyal etkilerine (FIC) bakılması amacı ile fenolik asitlerin, **1/2MIC+1/2MIC**; **1/2MIC+1/4MIC**; **1/4MIC+1/2MIC**; **1/4MIC+1/4MIC** olacak şekilde ikili kombinasyonları yapılmıştır. Benzer şekilde yapılan çalışma sonucunda ve matematiksel hesaplamalar ile fenolik asitlerin ikili kombinasyonlarının patojen bakteriler üzerinde eř katkılı etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Benzer konudaki çalışmalara bakıldığında, sonuçların yapılan deneyin sonuçlarıyla yakınlık gösterdiği gözlemlenmiştir. Fenolik asitler zayıf asitlerdir ve mikrobiyal hücrelerde pH'yı dűřürerek hücredeki zar yapısını bozmakta, sitoplazmayı asitleştirmekte ve protein denatürasyonuna neden olmaktadır.

Fenolik asitlerin en önemli özelliklerin biri de antioksidan yapılarıdır. Fenol kısmının reaktivitesine bağlı olarak antioksidanlar gibi davranmaktadırlar. Fenolik asitlerin baskın antioksidan aktivite çeşidinin, hidrojen atomu vermeleriyle radikalleri süpürücü etki oluşturmaları olduğu yapılan araştırmalarda belirlenlemiştir. Buna göre bu tez çalışmasında, fenolik asitlerin antioksidan etkileri ve birbirleri ile sinerjistik antioksidan etkileri incelenmiştir. İlk olarak DPPH radikali giderme aktivitesi tayini metodu kullanılarak fenolik asitler ve ikili kombinasyonları için %inhibisyon değerleri belirlenmiştir. Buna göre %inhibisyon değerleri, gallik asit için 78,77; ferulik asit için 27,40; vanillik asit için 10,80 ve o-kumarik asit için ise 3,96 olarak belirlenmiştir. En yüksek inhibisyon değerinin gallik asit için olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Fenolik asitlerin kombinasyonlarının sinerjistik antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için ise, ilk olarak her bir fenolik asit için deneysel süpürme kapasitesi (ESC) ve teorik süpürme kapasitesi (TSC) belirlenmiş, ardından bu iki değer oranlanarak sinerjistik etki (SE) belirlenmiştir. Yapılan hesaplamalar ile fenolik asitlerin ikili kombinasyonlarının birbirleri ile sinerjistik bir etki gösterdikleri sonucuna ulaşılmıştır. %inhibisyon değerlerine bakıldığında da, örneğin gallik asit-o-okumarik asit bileşiminin, fenolik asitlerin tek haldeki %inhibisyon değerinin toplamı olduğu görülebilmektedir. Benzer şekilde vanillik-o-kumarik asit kombinasyonunun da bu iki asidin toplamından daha etkili %inhibisyon oluşturduğu gözlemlenmektedir.

Fenolik asitlerin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin gıdalar üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, seçilen fenolik asit kombinasyonunun bir gün (24 saat) boyunca elma suyu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Buna göre ilk olarak, bu asit kombinasyonunun antioksidan özelliğinin, elma suyundaki esmerleşme reaksiyonuna etkisi belirlenmiştir. Bu çalışmada ısıtma işleminin de etkisini görmek amacıyla ısıtma işlemi uygulanarak ve uygulanmayarak iki deney grubuyla çalışılmıştır. Esmerleşme indeksi değerleri ve renk değişim değerleri belirlenmiştir. Deney sonuçlarına bakıldığında, fenolik asit kombinasyonunun elma suyunda esmerleşme reaksiyonuna az da olsa bir etkisi olduğu, ancak ısıtma işleminin yine de en etkili yöntem olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Renk değerlerinde de benzer şekilde fenolik asit kombinasyonunun kontrol gruplarına göre daha az değişim olduğu, ancak ısıtma işleminin yine en etkili yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Benzer çalışmalara bakıldığında fenolik asitlerin belirli bir konsantrasyona kadar esmerleşme indeksi için katalizör görevi yaptığı belirtilmiştir. Ancak seçilen konsantrasyonlarla hazırlanan gallik asit-vanillik asit kombinasyonunun, bu reaksiyon için katalizör olmadığı, aksine inhibe edici etkisi olduğu yapılan tez çalışması ile belirlenmiştir.

Gallik asit-vanillik asit kombinasyonunun elma suyunda antimikrobiyal etkilerinin araştırılması amacıyla daha önceden patojen bakterilerde bu kombinasyon için belirlenen etkili MIC kombinasyonuna göre çalışılmıştır. Buna göre ilk olarak elma suları pastörize edilmiş ardından 10^5 kob/ml olacak şekilde *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella Typhimurium*

patojen bakterilerden ve gallik asit-vanillik asit ilave edilmiştir. 0., 6. ve 24. saatlerde TSA besiyerine ekim yapılarak bakteri sayımları gerçekleştirilmiştir.

Buna göre, fenolik asit içermeyen elma sularındaki bakterilerin büyüme eğrilerine bakıldığında hepsi için büyümenin gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Fenolik asit içeren elma sularına bakıldığında ise 24 saatin sonunda fenolik asitlerin, *Escherichia coli*'nin neredeyse tamamını yok ettiği; *Salmonella Typhimurium*'u tamamen yok ettiği ve *Staphylococcus aureus*'un ise büyümesini yavaşlattığı gözlemlenmiştir.

Fenolik asitlerin ve kombinasyonlarının gıdalardaki antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinin araştırılması için yapılan çalışmada, bu etkiler için uygun koşullar anlatılan şekilde belirlenmiştir. Fenolik asitler, gıdalarda da kombin halde bulunmaktadır ve benzer çalışmalar direkt olarak gıdalar üzerinden de yapılmaktadır. Sonuçlara bakıldığında da tez çalışmasındaki sonuçları destekler nitelikte olduğu görülmektedir. Fenolik asitler doğal olmaları ve çok düşük konsantrasyonlarda bile oldukça etkili olmaları nedeniyle koruyucu olarak da tercih edilebilmektedirler. Yapılan tez çalışmasında da elma suyu üzerinde bu özelliklerinin etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Tez çalışmasında, literatürden farklı olarak, seçilen fenolik asitlerin ve bunların kombinasyonlarının antimikrobiyal ve antioksidan etkileri birlikte olarak ve gallik asit-vanillik asit kombinasyonunun elma suyu üzerindeki bu etkileri incelenmiştir. Bu tez çalışması doğrultusunda yapılabilecek çalışmalarda, bu fenolik asit kombinasyonunun farklı gıdalar üzerindeki antimikrobiyal ve antioksidan etkisi veya farklı fenolik asitlerin kombinasyonlarının elma suyunda ve/veya farklı gıdalardaki antimikrobiyal ve/veya antioksidan etkisi incelenebilir. Gıdalarda etkili olduğu düşünülen fenolik asitlerin veya kombinasyonlarının gıdaların tadında nasıl bir etki oluşturduğu benzer şekilde tez çalışması doğrultusunda çalışılabilir.

KAYNAKÇA

- Abdel-Wahab, M. H., El-Mahdy, M. A., Abd-Ellah, M. F., Helal, G. K., Khalifa, F., Hamada, F. M. A.** (2003). Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacological Research*, 48, 461-465.
- Alakomi, H.-L., Puupponen-Pimiä, R., Aura, A.-M., Helander, I. M., Nohynek, L., Oksman-Caldentey, K.-M., Saarela, M.** (2007). Weakening of salmonella with selected microbial metabolites of berry-derived phenolic compounds and organic acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55, 10, 3905-3912.
- Andjelkovic, M., Vancamp, J., Demeulenaer, B., Depaemelaere, G., Socaciu, C., Verloo, M., Verhe, R.** (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chemistry*, 98, 1, 23-31.
- Atak, E., Uslu, M.E.** (2018). Fenolik bileşikler, ekstraksiyon metotları ve analiz yöntemleri. *M. C. B. Ü. Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, 27, 3, 39-48.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S.** (2006). Phenolic compounds in plants and agroindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191– 203.
- Bajpai, B., Patil, S. A.** (2008). New approach to microbial production of gallic acid. *Braz. J. Microbiol*, 39, 708–711.
- Battestin, V., Matsuda, L. K., Macedo, G. A.** (2004). Fontes e aplicacoes de taninos e tanases em alimentos. *Alim. Nutri. Araraquara*, 15, 63–72.
- Bektaş, N., Öztürk, Y.** (2005). Bazı fenolik asitler ve kombinasyonlarının antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi. Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksekisans Tezi.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M.J., Simoes, M.** (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 00, 0, 1-10.
- Büyüktuncel, S.E.** (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan baslica spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2, 17, 93-103.
- Campos, F. M., Couto, J. A., Figueiredo, R., Tóth, I. V., Rangel, A. O. S. S., Hogg, T. A.** (2009). Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 135, 2, 144-51.
- Chia, Y., Rajbanshi, R., Calhoun, C., Chin, R. H.** (2010). Anti-neoplastic effects of gallic acid, a major component of toona sinensis leaf extract, on oral squamous carcinoma cells. *Molecules*, 15, 8377–8389.

- Clifford, M.N.** (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 79,362.
- Colon, M., Nerin, C.** (2015). Synergistic, antagonistic and additive interactions of green tea polyphenols. *Eur Food Res Technol*, 242, 2, 211-220.
- Colon, M., Nerin, C.** (2016). Synergistic, antagonistic and additive interactions of green tea polyphenols. *Eur Food Res Technol*, 242, 211–220.
- Couto, A. G., Kassuya, C. A. L., Calixto, J. B., Petrovick, P. R.** (2013). Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from phyllanthus niruri leaves, stems, roots and whole plant. *Braz. J. Pharmacogn.*, 23, 124–131.
- De Azeredo, G.A., Stamford, T.L.M., Nunes, P.C., Gomes Neto, N.J., de Oliveira, M.E.G., de Souza, E.L.** (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Res. Int*, 44, 1541–1548.
- De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G.A.** (2010). Fruit and vegetable phytochemicals- chemistry, nutritional value, and stability. 1st edn. Wiley-Blackwell, Ames
- Del Campo, J., Nguyen, C., Sergeant, M., Amiot, M. J.** (2003). Determination of the most Bioactive Phenolic Compounds from Rosemary against *Listeria monocytogenes*: Influence of Concentration, pH, and NaCl. *Journal of Food Science*, 68, 6, 2066-2071.
- De Oliveira, C.E.V., Stamford, T.L.M., Neto, N.J.G., de Souza, E.L.,** (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *Int. J. Food Microbiol.*, 137, 312–316.
- Dhananjaya, B.L., Nataraju, A., Gowda, C.D.R., Sharath, B.K., D'Souza, C.J.M.** (2009). Vanillic acid as a novel specific inhibitor of snake venom 50-nucleotidase: a pharmacological tool in evaluating the role of the enzyme in snake envenomation. *Biochemistry*, 74, 1315.
- Einhellig, F. A.** (2004). Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals. *Mode of Allelochemical Action of Phenolic Compounds*. 217-238.
- Ephraim, E., Odenyo, A., Ashenafi, M.** (2005). Isolation and characterization of tannin-degrading bacteria from faecal samples of some wild ruminants in Ethiopia, *Animal Feed Science and Technology*, 118, 243-253.
- Falsaperla, M., Morgiab, G., Tartaronec, A., Arditoc. R., Romano, G.** (2005). Support ellagic acid therapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC) on standard chemotherapy using vinorelbine and estramustine. Phosphate. *Eur Urol*, 47, 449.
- Ferna´ndez-Zurbano, P., Ferreira, V., Escudero, A., Cacho, J.** (1998). Role of Hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4937-4944.
- Fischer, E.** (1914). Synthesis of depsides, lichen-substances and tannins. *J. Am. Chem. Soc.*, 36, 1170–1201.
- Fischer, T. C., Gosch, C., Pfeiffer, J., Halbwirth, H., Halle, C., Stich, K. and Forkmann, G.,** (2007). Flavonoid genes of pear (*Pyrus communis*). *Trees*, 21,521–529.

- Fujisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y., Sakagami, H.** (2002) Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*, 177, 39.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G.** (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Fuhrman, B., Volkova, N., Rosenblat, M., Aviram, M.** (2000). Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antioxid Redox Signal*, 2, 491–506.
- Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R., Palazo'n J.** (2013). Phenolic acids, *Natural Products*, 1951-1973.
- Gonzalez, J., Cruz, J. M., Dominguez, H., Parajö, J.C.** (2004). Production of antioxidants from Eucalyptus globulus wood by solvent extraction of hemicellulose hydrolysates, *Food Chemistry*, 84, 243-251.
- Harris, C.S., Mo, F., Migahed, L., Chepelev, L., Haddad, P.S., Wright, J.S., Willmore, W.G., Arnason, J.T., Bennett, S.A.L.** (2007). Plant phenolics regulate neoplastic cell growth and survival: a quantitative structure-activity and biochemical analysis. *Can J Physiol Pharmacol*, 85, 1124.
- Hosoda, A., Ozaki, Y., Kashiwada, A., Mutoh, M., Wakabayashi, K., Mizuno, K., Nomura, E., Taniguchi, H.** (2002). Syntheses of ferulic acid derivatives and their suppressive effects on cyclooxygenase-2 promoter activity. *Bioorg Med Chem*, 10, 1189.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, I., V.** (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 126, 1821–1835.
- Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Kobayashi, M., Tamesada, M., Yagi, K.** (2009). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin A-induced liver injury. *Biol Pharm Bull*, 32, 1215.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke E., Vivanco, J. M.** (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions, *Food Chemistry*, 83, 547-550.
- Jayamani, J., Shanmugam, G.** (2014). gallic acid, one of the components in many plant tissues, is a potential inhibitor for insulin amyloid fibril formation. *Eur. J. Med. Chem*, 85, 352–258.
- Jung, J., Bae, K. H., Jeong, C. S.** (2013). Anti-Helicobacter pylori and antiulcerogenic activities of the root cortex of Paeonia suffruticosa. *Biol. Pharm. Bull*, 36, 1535–1539.
- Keman, D.,** (2012). Outer membrane protein profiling of Escherichia Coli O157:H7 in response to phenolic acid stress, İzmir Institute of Technology, Molecular Biology and Genetics, Master Thesis.
- Kim, Y.** (2007). Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 1052–1055.
- King, P.J., Ma, G., Miao, W., Jia, Q., McDougall, B.R., Reinecke, M.G., Cornell, C., Kuan, J., Kim, T.R., Robinson, W.E. Jr.** (1999). Structure-activity relationships: analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human

- immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. *Med Chem*, 42, 497.
- Kratz, J.M., Andrighetti-Freohner, C.R., Kolling, D.J., Leal, P.C., Cirne-Santos, C.C., Yunes, R.A., Nunes, R.J., Trybala, E., Bergstream, T., Frugulhetti, I.C.P.P., Barardi, C. R.M., Simoes, C.O.S.** (2008). Anti-HSV-1 and Anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Mem. Inst*, 103, 437–442.
- Kubo, I., Fujita, K. I., Nihei, K. I., Masuoka, N.** (2003). non-antibiotic antibacterial activity of dodecyl gallate. *Bioorg. Med. Chem.*, 11, 573–580.
- Lacombe, A., Wu, V. C. H., Tyler, S., Edwards, K.** (2010). Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International journal of food microbiology*, 139, 1-2, 102-7.
- Lee, S.K., Mbwambo, Z.H., Chung, H.S., Luyengi, L., Gamez, E.J.C., Mehta, R.G., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M.** (1998). Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb Chem HighThroughput Screen* 1:1.
- Liang, C. Z., Zhang, X., Li, H., Tao, Y. Q., Tao, L. J., Yang, Z. R., Zhou, X. P., Shi, Z. L., Tao, H. M.** (2012). Gallic acid induces the apoptosis of human osteosarcoma cells in vitro and in vivo via the regulation of mitogen-activated protein kinase pathways. *Cancer Biother. Radiopharm*, 27, 701–710.
- Liu, Y., Carver, J. A., Calabrese, A. N., Pukala, T. L.** (2014). Gallic acid interacts with a-synuclein to prevent the structural collapse necessary for its aggregation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1844, 1481–1485.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni M., Dolara P.** (2001). Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation in vitro, *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1205-1210.
- Luis, A., Duarte, A.P., Pereira, L., Domingues, F.** (2018). Interactions between the major bioactive polyphenols of berries: effects on antioxidant properties, *Eur Food Res Technol*, 244, 175–185.
- Luy, J.F., Jiang, H., Wu, K., Zheng, X., Cai, Y., Katakowski, M., Chopp, M.** (2010). Effects of mixtures of phenolic acids on phosphorus uptake by cucumber seedlings. *Eur J Pharmacol*, 641, 102.
- Mackay, M.L., Milne, K., Gould, I.M.** (2000). Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 15, 125–129.
- Mao, S., Wang, K., Lei, Y., Yao, S., Lu, B., Huang, W.,** (2017). Antioxidant synergistic effects of *Osmanthus fragrans* flowers with green tea and their major contributed antioxidant compounds. *Scientific Reports*, 7, 46501, 1-10.
- Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V.** (2003). Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures, *Food Chemistry*, 81, 189-197.
- Naczk, M., Shahidi, F.,** (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.

- Nizamoğlu, N. M., Sebahattin, N.A.S.** (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikleri; yapıları ve önemleri. *Electronic Journal of Food Technologies*, 5, 1, 20-35.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C.H., Katan, M.B.** (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr*, 131, 66.
- Oomah, B. D.** (2001). Flaxseed as a functional food source. *J. Sci. Food and Agric*, 81, 889-894.
- Özcan, A.** (2008). Kağıt yüzey pürüzlülüğünün L*a*b* değerleri üzerine etkisinin belirlenmesi. *İstanbul Ticaret Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7, 14, 53-61.
- Özçelik, S., Özaydın, A.G.** (2013). Farklı kurutma koşullarının bazı önemli armut çeşitlerinin aroma, fenolik madde ve diğer kalite bileşenleri üzerine etkilerinin araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilimdalı, Doktora Tezi.
- Peyrat-Maillard, M.N., Bonnely, S., Berset, C.** (2000). Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, 51, 709-716.
- Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., Somasundaram, R.** (2006). Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem*, 54, 9764–9772.
- Robbinsr, J.** (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 2866-2887.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F.A.** (1998). Pcedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agr*, 76, 270-6.
- Santos, S.C., Mello, J.P.C. Taninos** (2010). In Farmacognosia: Da planta ao medicamento, Simoes, C.M.O., Ed., *Editora UFRGS*: Porto Alegre, Brazil, 615–656.
- Scalbert, A., Williamson, G.** (2000). Dietary intake and bioavailablity of polyphenols. *J. Nutr.*, 130, 2073-2085.
- Shahidi, F., Naczk, M.** (2004). Phenolics in food and nutraceuticals: sources, applications and health effects. *CRC Press*, Boca Raton, FL.
- Sher, A.** (2009). Antimicrobial Activity Of Natural Products from Medicinal Plants. *Journal of Medical Sciences*, 7, 1, 72-78.
- Shetty, K., Lin, Y.** (2007). Phenolic antimicrobials from plants for control of bacterial pathogens. *Taylor and Francis Group*, LLC.
- Sousa, W.R., Rocha, C., Cardoso, C.L., Silva, S., Zanoni, M.** (2004). Determination of the relative contnbution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 619- 633.
- Sroka, Z., Cisowski, W.** (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 753-758.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P.E., Hussain, E.A., Damayanti-Wood, B., Farnsworth, N.R.** (2001). Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Crit. ReV. Food Sci. Nutr.*, 41, 251-286.

- Tan, S.C.** (2000). Determinants of eating quality in fruits and vegetables. *Proc Nutr Soc Aust*, 24, 183.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M.** (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition research reviews*, 18, 1, 98-112.
- Toma's-Barbera'n, F.A., Espi'n, J.C.** (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 853-876.
- Vaquero, M.J.R., Alberto, M.R., Nadra, M.C.M.** (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18, 2, 93-101.
- Yılmaz , L., Elmacı, Y.** (2018). Polifenol oksidaz enzimi ve inaktivasyon yöntemleri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6, 3, 333-345.
- Yu, L., Zhou, K.** (2005). Antioxidants properties of bran extracts from 'Platte' wheat grown at different locations, *Food Chemistry*, 90, 311-316.
- Zengin, H., Baysal, A.H.,** (2014). Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules*, 19, 17773-17798.
- Wang, S., Meckling, K.A., Marcone, M.F., Kakuda, Y., Tsao, R.** (2011). Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 960–968.
- Wells, J.E., Berry, E.D.** (2005). Effects of common forage phenolic acids on *Escherichia coli* O157:H7 viability in bovine feces. *Appl Environ Microbiol*, 71, 12, 7974-7979.
- Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K., Toivonen, P.** (2003). Antilisterial activity of selected phenolic acids, *Food Microbiology*, 20, 305–311.
- Wu, J.M., Jan P.S., Yu, H.C., Haung, H.Y., Fang, H.J., Chang, Y.I., Cheng, J.W., Chen, H.M.** (2009). Structure and function of a custom anticancer peptide, *CB1a. Peptides*, 30, 839.
- Anonim** 1, (Ziyaret tarihi: 06.06.2019)
megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller/G%C4%B1dalarda
ki%20Pigmentler%20ve%20Fenolik%20Bile%C5%9Fikler.pdf

ÖZGEÇMİŞ

İletişim Bilgileri

E-Mail : belisaycasakarya@gmail.com

Adres : Türkiye - İstanbul(Asya)

Kişisel Bilgiler

Toplam Tecrübe : 2 yıl

Eğitim Durumu : **Yüksek lisans(Öğrenci)**

Uyruk : Türkiye Cumhuriyeti

Doğum Tarihi: 24.03.1995

Doğum Yeri : Türkiye - İstanbul(Avr.)

Ehliyet : B(2017)

İş Deneyimleri

Bursiyer

Tübitak Mam Gıda Enstitüsü

06.2017-12.2019 (18 ay) Kocaeli/Türkiye – Stajyer

Stajyer Mühendis

Tübitak Mam Gıda Enstitüsü

06.2015-08.2015 (2 ay) Kocaeli/Türkiye – Stajyer

Stajyer Mühendis

Özlem Et ve Et Kombinasyonu

06.2016-07.2016 (20 iş günü) İstanbul/Türkiye – Stajyer

Stajyer Mühendis

Elvan San. ve Tic. A.Ş.

07.2016-08.2016 (20 iş günü) İstanbul/Türkiye - Stajyer

Eğitim Bilgileri

Üniversite (Yüksek Lisans) - İstanbul Aydın Üniversitesi - (Örgün Eğitim)

06.2017- halen



Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği

(Türkçe) – Başarı Bursu (%100)

Üniversite (Lisans) - İstanbul Aydın Üniversitesi - (Örgün Eğitim)

09.2013- 06.2017

Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği

(Türkçe) – YÖK Bursu (%100)

Lise - Üsküdar Ahmet Keleşoğlu Anadolu Lisesi

06.2013

Fen

Yabancı Dil

	Okuma	Yazma	Konuşma
İngilizce	İyi	İyi	İyi
Almanca	Orta	Orta	Orta

Yetkinlikler

Bilgisayar Bilgisi

Microsoft Office (Word, Excel, OneNote, PowerPoint), Prezi, Autocad, C++

Sertifika Bilgisi

ISO22000:2005 FOOD SAFETY MANAGEMENT SYSTEMS

TSC MANAGEMENT SYSTEMS ACADEMY - 04.2016

BRC-GLOBAL STANDARD FOR FOOD SAFETY-ISSUE-7

TSC MANAGEMENT SYSTEMS ACADEMY - 04.2016

FSSC 22000 - FOOD SAFETY SYSTEM CERTIFICATION

TSC MANAGEMENT SYSTEMS ACADEMY - 04.2016

ISO22000:2005 FOOD SAFETY MANAGEMENT SYSTEMS INTERNAL
AUDITOR

TSC MANAGEMENT SYSTEMS ACADEMY - 04.2016

BGT

TMMOB-Gıda Mühendisleri Odası - 10.2015

*İlkokul ve ortaokul düzeyindeki öğrencilere kendi okullarında Bilinçli Gıda
Tüketimi eğitimi vermek üzere bu programa katılmış bulunmaktayım.*

Über A2

Generalkonsular der Bundesrepublik Deutschland-İstanbul - 06.2012

Konuşma: B1 Dinleme: B1 Okuma: B1 Yazma: A2

Almanca Sprachkurs

did-Berlin - 07.2011

2011 senesinin Temmuz ayında Berlin'de katılmış olduğum 40 saatlik Almanca kursu sonucunda bu belgeyi almaya hak kazandım.

A2(Almanca)

Zentralstelle für das Auslandsschulwesen-Ankara - 06.2011

Royal Academy of Music (Piano)

ABRSM-London - 01.2008

2006-2012 yılları arasında gitmiş olduğum piyano kursu doğrultusunda 2008-2012 yılları arasında Royal Academy of Music(Piano)-Grade 1,2,3 ve 4 sertifikaları almış bulunmaktayım.

Sınav Bilgileri

ALES (Akademik Personel ve Lisansüstü Eğitimi)

Giriş Sınavı(74,57)

ÖSYM - 05.2017

Burslar/Projeler

TÜBİTAK-2209-Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı – A/ 2. Dönem başvurusu (2014)(Kabul edilmedi.)

TÜBİTAK-2209-B Sanayiye Yönelik Lisans Bitirme Tezi Destekleme Programı / 12. Dönem başvurusu (2016)

Meyvesuyu Katı Atıklarından Biyogaz ve Organik Gübre Üretimi(Lisans Bitirme Tezi)

Meyvesuyu Katı Atıklarından Biyogaz ve Organik Gübre Üretimi (Tasarım Ders Projesi(Fabrika tasarımı))

Hasbay İ., Aslan Ö., Sakarya B.A., Alasalvar C, (2018). Barley β -glucans: Bioactive properties, health effects and applications as functional food ingredients, International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods, p90, Vancouver, BC, Canada. (Poster)

Sakarya B.A., Zengin H., (2019). Antimicrobial and antioxidant activity of individual and combinations of phenolic acids, International Conference on Agriculture, Food, Veterinary and Pharmacy Sciences, p875, Trabzon, Turkey. (Sunum)

TÜBİTAK-1003- Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı/Arpadan β -glukan elde edilmesi, fonksiyonel gıda bileşeni ve doğal kıvam arttırıcı gıda katkı maddesi olarak kullanılması (Bursiyer)

Başarı ve Ödüller

Food Technologist 2016 by the department of Food Technology of the Faculty of Technologies and Landscaping, Kauno Kolegija / University of Applied Sciences (10.2016)

Litvanya'da uluslararası düzenlenen bölümümle alakalı bilgi yarışmasında finale gitme hakkı kazandım.

Üniversite Bölüm Birinciliği

Üniversiteden bölümümde 1. olarak mezun oldum. (GNO:3,66)

Ek Bilgiler

Hobiler : Piyano çalmak, kişisel gelişim kitapları, bilimsel makaleler, müzik, sinema, tiyatro

Üye Olunan Topluluklar: TMMOB Gıda Mühendisleri Odası

Sigara Kullanımı : Kullanmıyorum