

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FINDIK YEŞİL KABUĞUNUN
FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN VE
BİYOETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

PELİN KİRAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FINDIK YEŞİL KABUĞUNUN
FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN VE
BİYOETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

PELİN KİRAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE
2023

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**INVESTIGATION OF PHYTOCHEMICAL
COMPOSITION AND BIOEFFECTS OF
HAZELNUT GREEN LEAFY COVER**

PELİN KİRAZ
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

GEBZE

2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 02/06/2023 tarih ve 2023/31 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 15/06/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Pelin Kiraz'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ÜYE

: Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Yapılan tez çalışmasında, metanol ve su çözücülerini kullanılarak elde edilen fındık yeşil kabuğu ekstraktlarının (FM ve FS) fitokimyasal içerikleri ve *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus uberis* ATCC 700407 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşları üzerinde antibakteriyel etkileri ile FM ekstraktının antibiyofilm ve anti quorum-algılama etkinliği incelendi. Ekstraktlar % 80 metanol veya saf su ile 50°C sıcaklıkta 30 dakika uygulama süresinde hazırlandı. Ekstraktların toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemi, toplam flavonoid içerikleri alüminyum klorür yöntemi ve antioksidan etkinlikleri DPPH radikali süpürme aktivitelerinin tayin edilmesi ile belirlendi. Ekstraktların antimikrobiyal etkinliğinin incelenmesinde agar kuyu difüzyonu ve MİK yöntemleri uygulandı. FM ekstraktının *E. faecalis* suşunun 24 ve 48 saatlik biyofilm oluşumlarını ortadan kaldırma etkinliği ve anti quorum-algılama aktivitesi *Chromobacterium violaceum* bakterisi ile test edildi.

FM ekstraktının toplam fenolik (FM: 17.8±1.7, FS: 11.9±1.4 mg GAE g⁻¹), toplam flavonoid (FM: 0.4±0.1, FS: 0.2±0.1 mg QE g⁻¹) içeriklerinin ve DPPH radikali süpürme etkinliğinin (FM: IC₅₀=0.75 mg mL⁻¹, FS: IC₅₀=1.61 mg mL⁻¹) FS ekstraktından daha yüksek olduğu tespit edildi. FS ekstraktının *B. cereus*, *S. uberis*, *E. faecalis* bakterileri, FM ekstraktının ise *B. cereus*, *E. faecalis* bakterileri üzerinde gentamisine benzer veya daha fazla etki gösterdikleri görüldü. FM ekstraktının *E. faecalis* bakterisi üzerinde yüksek antimikrobiyal etkisi (MİK₅₀=0.81 mg mL⁻¹) olduğu ve *E. faecalis* bakterisinin 24 ve 48 saatlik biyofilmlerine 5 dakika süre ile uygulamasının (1:8 dilüsyonda, 18.4 mg mL⁻¹) % 42 oranında biyofilm oluşumunu ortadan kaldırdığı tespit edildi. Ayrıca, FM ekstraktının anti quorum-algılama etkinliği gösterdiği saptandı. Bu çalışmanın sonuçları, fındık yeşil kabuk ekstraktlarının gıda, kozmetik veya ilaç endüstrileri için potansiyel doğal antioksidan ve antimikrobiyal ajan kaynakları olabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Fındık yeşil kabuğu, antimikrobiyal, antibiyofilm, bitkisel ekstrakt, fitokimyasal.

SUMMARY

In the thesis study, the phytochemical contents and antibacterial effects of hazelnut green leafy cover extracts (FM and FS) obtained by using methanol and water were assessed. The antibacterial effect of extracts were evaluated against *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Streptococcus uberis* ATCC 700407 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. The antibiofilm and anti quorum sensing efficacy of FM extract was also determined. Extracts were prepared with 80% methanol or pure water at 50 °C for 30 minutes. The total phenolic contents of the extracts were evaluated by the Folin-Ciocalteu method, the total flavonoid contents were evaluated by the aluminum chloride method, and the antioxidant activity was evaluated by determining the DPPH radical scavenging activities. Agar well diffusion and broth dilution methods were used to investigate the antimicrobial activity of the extracts. The biofilm removal effect of the FM extract tested against *E. faecalis*. Anti quorum-sensing activity was tested with *Chromobacterium violaceum*.

Total phenolic (FM: 17.8 ± 1.7 , FS: 11.9 ± 1.4 mg GAE g⁻¹) and total flavonoid (FM: 0.4 ± 0.1 , FS: 0.2 ± 0.1 mg QE g⁻¹) contents and the DPPH free radical scavenging activities (FM: IC₅₀=0.75 mg mL⁻¹, FS: IC₅₀=1.61 mg mL⁻¹) of FM extract were found to be higher than those obtained by FS extract. It was observed that the FS extract had similar or more effects than gentamicin against *B. cereus*, *S. uberis*, *E. faecalis*, and the methanol extract against *B. cereus*, *E. faecalis*. FM extract had high antimicrobial effect (MIC₅₀=0.81 mg mL⁻¹) against *E. faecalis*. It was determined that applying the extract for 5 minutes (1:8 dilution) to the 24 and 48-hour biofilms of *E. faecalis* removed the biofilm at a rate of 42 %. It was determined that the FM extract showed anti-quorum-sensing activity. The results of this study provided evidence that hazelnut green leafy cover extracts could be potential sources of natural antioxidant and antimicrobial agents for the food, cosmetic, or pharmaceutical industries.

Key Words: Hazelnut green leafy cover, antimicrobial, antibiofilm, plant extract, phytochemical.

TEŞEKKÜR

Başta, her zaman yol göstericiliği ile yanımda olan yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen bu çalışmayı tamamlamamda en büyük destekçim olan danışmanım sayın Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a,

Fındık yeşil kabuklarının temini için SELAHATTİN AKBAŞ'a

Çalışmam boyunca yanımda olan, geçirdiğimiz seneler boyunca arkadaşlıkları ile yanımda olup bu süreci daha değerli ve unutulmaz kılan, laboratuvar içerisinde ve dışarısında hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Gamze ŞEKER'e ve Hazel ARKAN'a,

Hayallerime ve hedeflerime her zaman inanan, bana her daim destek veren Züfer Kiraz, Hülya Kiraz ve Fatih Kiraz'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Gebze Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2022-A-101-13 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyoaktif Bileşikler ve Etkileri	3
2.1.1. Biyoaktif Bileşiklerin Antimikrobiyal Etkileri	5
2.2. Ekstraksiyon Yöntemleri	6
2.3. Antioksidanlar	8
2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Bakterilerin Özellikleri	9
2.4.1. <i>Bacillus</i> Suşlarının Karakteristik Özellikleri	9
2.4.2. <i>Streptococcus</i> Suşlarının Karakteristik Özellikleri	10
2.4.3. <i>Enterococcus</i> Suşlarının Karakteristik Özellikleri	11
2.5. ...Biyofilmler	11
2.5.1. Gıda Sanayide Biyofilmler	13
2.5.2. Quorum-Algılama	14
2.6. Fındık ve Fındık Yan Ürünleri	16
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	20
3.1. Gereçler	20
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler	20
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	20
3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları	21
3.2. Yöntemler	21

3.2.1. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu	21
3.2.2. Bakteri Kültürlerinin Saklanması	22
3.2.3. Fındık Yeşil Kabuklarının Ekstraksiyonu	22
3.2.3.1. Fındık Yeşil Kabuklarının Ekstraksiyon İçin Hazırlanması	22
3.2.3.2. Fındık Yeşil Kabuğu Ekstraktının Hazırlanması	22
3.2.4. Ekstraktların Kuru Madde Tayini ve Ekstraksiyon Veriminin Hesaplanması	24
3.2.5. Ekstraktların pH Değerlerinin Ölçülmesi	24
3.2.6. Ekstraktların Toplam Fenolik İçeriklerinin Tayini	24
3.2.7. Ekstraktların Toplam Flavonoid İçeriklerinin Tayini	25
3.2.8. Ekstraktların Antioksidan Etkinliklerinin Tayini	25
3.2.9. Ekstraktların Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkinin İncelenmesi	26
3.2.10. FM Ekstraktının Minimal İnhibisyon ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	27
3.2.11. FM Ekstraktının Biyofilm Oluşumunu Ortadan Kaldırılma Etkinliğinin İncelenmesi	28
3.2.12. FM Ekstraktının Anti Quorum-Algılama Etkisinin İncelenmesi	29
3.2.13. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR	30
4.1. Ekstraktların Kuru Madde İçeriği ve Ekstraksiyon Verimi	30
4.2. Ekstraktların pH Analizi	31
4.3. Ekstraktların Toplam Fenolik İçerikleri	31
4.4. Ekstraktların Toplam Flavonoid İçerikleri	32
4.5. Ekstraktların Antioksidan Etkinlikleri	32
4.6. Ekstraktların Antimikrobiyal Etkileri	34
4.6.1. Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemi ile Ekstraktların Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi	34
4.6.2. FM ekstraktının Minimal İnhibisyon Konsantrasyonlarının ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	39
4.7. Ekstraktın Biyofilm Oluşumunu Ortadan Kaldırma Etkinliği	41

4.8. Ekstraktın Anti Quorum-Algılama Etkisinin Belirlenmesi	42
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar

Kisaltmalar

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ATCC	: American Type Culture Collection (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu)
CE	: Kateşin eşdeğeri
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FM	: Fındık yeşil kabuğu-metanol
FS	: Fındık yeşil kabuğu-su
FTS	: Fizyolojik Tuzlu Su
g	: Gram
G	: Gentamisin
GA	: Gallik asit
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Kob	: Koloni oluşturan birim
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani Besiyeri
LB-A	: Luria-Bertani Agarlı Besiyeri
MBK	: Minimal bakterisidal konsantrasyon
mg	: Miligram
MHB	: Mueller Hinton Besiyeri
MİK	: Minimal inhibisyon konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
OD	: Optik yoğunluk
Ppm	: Parts per million
Rpm	: Revolutions per minute
TSB	: Triptik Soya Besiyeri
QA	: Quorum-algılama

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Fitokimyasal bileşiklerin sınıfları	4
3.1: Fındık yeşil kabuğu ekstraktlarının fitokimyasal içeriğinin, antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliklerinin araştırılmasında uygulanan yöntemler.	23
4.1: FM ve FS ekstraktları ve gallik asitin (GA) (mg mL^{-1}) DPPH radikali süpürme aktivitesi (%).	33
4.2: FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) <i>B. cereus</i> bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin).	35
4.3: FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) <i>B. subtilis</i> bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin).	36
4.4: FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) <i>S. uberis</i> bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin).	37
4.5: FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) <i>S. uberis</i> bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin).	38
4.6: FM ekstraktının EF: <i>E. faecalis</i> , SU: <i>S. uberis</i> ve BS: <i>B. subtilis</i> bakterileri üzerinde MİK_{50} , MİK_{70} ve MİK_{90} (mg mL^{-1}) değerleri.	41
4.7: <i>E. faecalis</i> bakterisinin 24 ve 48 saat inkübasyon sonucu oluşan biyofilmlerin FM ekstraktı (1:8) ve Klor çözeltisinin (200 ppm) uygulanması ile ortadan kaldırma (%) oranları.	42
4.8: FM ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) <i>C. violaceum</i> bakterisi üzerinde etkileri.	43
4.9: FM ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (a: 1:1, b: 1:2, c: 1:4, d: 1:8, e: 1:16, f: 1:32) <i>C. violaceum</i> bakterisi üzerinde etkileri.	43

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Çözücüye göre ekstrakte olan fitokimyasal bileşikler	8
2.2: Fındık yeşil kabuğu ile ekstrakt elde edilen çalışmalarda analiz edilen bileşikler.	17
2.3: Literatürde fındık yeşil kabuğu kullanılarak elde edilen ekstraktların ekstraksiyon yöntemleri.	18
2.4: Fındık yeşil kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik (mg GAE g ⁻¹ (1 gramda gallik asit eşdeğeri mg kuru madde miktarı) veya mg CE g ⁻¹ (1 gramda kateşin eşdeğeri mg kuru madde miktarı) ve flavonoid içerikleri (mg CE g ⁻¹)	19
3.1: Kullanılan bakteri türlerinin üremesi için gereken inkübasyon sıcaklığı (°C).	22
4.1: FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda (1-1:512 sulandırılmalarda) içerdikleri kuru madde miktarı (mg mL ⁻¹).	30
4.2: FM ve FS ekstraktlarının ekstraksiyon verimi (%).	31
4.3: FM ve FS ekstraktlarının 30 ve 37°C sıcaklıklardaki pH değeri.	31
4.4: FM ve FS ekstraktlarının toplam fenolik (mg GAE g ⁻¹), toplam flavonoid (mg QE g ⁻¹) içerikleri ve antioksidan etkinlikleri (IC ₅₀ mg mL ⁻¹).	32
4.5: FM ekstraktının EF: <i>E. faecalis</i> , SU: <i>S. uberis</i> , BS: <i>B. subtilis</i> ve BC: <i>B. cereus</i> bakterileri üzerinde Minimal İnhibisyon (MİK, MİK ₅₀ , MİK ₇₀ ve MİK ₉₀ , mg mL ⁻¹) ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (MBK) (mg mL ⁻¹).	40

1. GİRİŞ

Son yıllarda çeşitli kaynaklardan yeni antimikrobiyal ajanların elde edilmesine artan bir ilgi oluşmuştur [Balouiri et al., 2016]. Bu kaynaklardan en önemlileri bitkilerden elde edilen fitokimyasal ajanlardır. Bitki sekonder metabolitleri olarak bilinen, besin olarak tüketilemeyen ancak insan sağlığı için yararlı etkileri bulunan maddelere fitokimyasallar denir. Fitokimyasallar, bitkilerin kendine has koku, tat ve renklerinin oluşumunda rol oynarlar [Demir ve Akpınar, 2020]. En bilinen fitokimyasal bileşikler; fenolik bileşikler, flavonoidler, tanenler, terpenler ve karotenoidlerdir. Fitokimyasalların antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar, antikarsinojen ve antialerjenik etkilerinin olduğu bilinmektedir [Demir ve Akpınar, 2020].

Kuruyemişler meyvenin kurutularak, tuz kullanılarak ya da kavrularak fazla neminin uzaklaştırılmasıyla elde edilen gıdalardır [Apaydın, 2021]. Birçok kuruyemiş meyvesi ağaçlar sallandırılarak veya dallara vurularak düşürülür ve toplanır. Fındık, fıstık, ceviz, badem gibi kuruyemişlerin meyvelerinin dışlarını saran, yenilemeyen yaş ve sert kabukları bulunur. Toplama işleminden sonra meyveler yaş kabuktan ayrılır ve altındaki sert kabukla birlikte kurutulur. Toplama işleminin ardından meyvenin dışındaki yaş kabukların bırakılması, meyvenin düzgünce kurumamasına ve dolayısıyla kalitenin düşmesine, küf sorunlarına ve raf ömrünün kısılmasına neden olur [Perry and Sibbett, 1998]. Kurutulan kuruyemişler sert kabuktan ayrılarak çekirdekleri çiğ olarak veya kavrularak tüketilebilirler. Toplama işleminden sonra oluşan yaş kabuk atıkları ve tüketimden sonra atılan sert kabuklar gibi atıkların ticari değeri yoktur. Bu atıkların hayvan yemlerine katıldıkları, toprağa gömüldükleri ve ısınma amaçlı yakıldıkları bilinmektedir. Ancak bu atıkların kontrolsüzce yok edilmeye çalışılması çevre kirliliğine neden olmaktadır.

Türkiye kuruyemiş üretimi ve tüketimi açısından önde gelen ülkelerden biridir [Apaydın, 2021]. Fındık üretimi ve tüketimi sonucu açığa çok miktarlarda çıkan kabuk atıkları çevre kirliliğine sebep olabilmektedir. Bu tez çalışmasında fındık yeşil kabuğu atığından elde edilen ekstraktların antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidan etkileri ve fitokimyasal içerikleri araştırılmıştır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Türkiye’de 2020 yılında 665000 ton fındık üretimi yapıldığı belirlenmiştir [FAOSTAT, 2020]. Fındık üretiminde yılda 300 bin tondan fazla yeşil kabuk atığı ortaya çıkmaktadır [Oğuzkan vd., 2016]. Hasat sonrası oluşan yan ürünlerin (yaş kabuk, sert kabuk, ince kabuk gibi) hayvan yemlerine katıldığı, toprağa gömülerek gübre olarak kullanıldığı ve sert kabukların ısınma amaçlı kullanıldığı bilinmektedir.

Her yıl fazla miktarlarda açığa çıkan bu atıkların değerlendirilmesi, fitokimyasalların ekstraksiyon ile kazanılması ve antimikrobiyal etkilerinin araştırılması sürdürülebilirlik, doğal antimikrobiyaller ve ekonomi kapsamlarında ele alınması giderek önem kazanmıştır. Bu nedenle ülkemizde de tarımı yapılan bir kuruyemiş olan fındığın yeşil kabuğunun fitokimyasal içeriğinin doğal antimikrobiyal kaynağı açısından incelenmesi bu tez çalışmasının konusunu oluşturmaktadır.

Fındık yeşil kabuğundan elde edilen ekstraktların fitokimyasal içeriklerini araştırmak amacıyla toplam fenolik içerik tayini ve toplam flavonoid içerik tayini deneyleri yapılmıştır. Ekstraktların antimikrobiyal etkilerini araştırmak amacıyla agar kuyu difüzyonu ve minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemleri kullanılmıştır, antibiyofilm etkinlik ise 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakaları kullanılarak polistren yüzeyde oluşan biyofilmlerin ortadan kaldırılması çalışmalarıyla incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoaktif Bileşikler ve Etkileri

Mikroorganizmaların doğal evrimsel süreçlerinde kimyasal ajanlara karşı direnç geliştirmeleri, antimikrobiyallerin arayışını sürekli kılmaktadır. [Erdoğan ve Everest, 2013]. Antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı sonucu dirençli patojen karakterli mikroorganizmalar ortaya çıkmıştır. Bu mikroorganizmalarla savaşmak için yeni antimikrobiyal ajan arayışında fitokimyasal bileşikler önemli bir kaynak haline gelmiştir [Demir ve Akpınar, 2020].

Gıda maddelerinin oksidatif bozulmalarına karşı sentetik antioksidanlar veya mikrobiyal bozulmalara karşı antimikrobiyal bileşikler gıda katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır. Bu maddeler gıdaları koruyarak raf ömrünün uzatılmasına katkı sağlarlar. Ancak son zamanlarda gıda katkı maddesi olarak kullanılan sentetik antioksidan ve antimikrobiyal maddelerin yan etkilerinin olduğu tespit edilmiştir [Zoral ve Turgay, 2014]. Bu sebeple gıda katkı maddesi olarak kullanılabilecek doğal kaynaklı, antioksidan ve antimikrobiyal etkileri olan fitokimyasal ajanlar araştırma konusu olarak ilgi çekici hale gelmiştir.

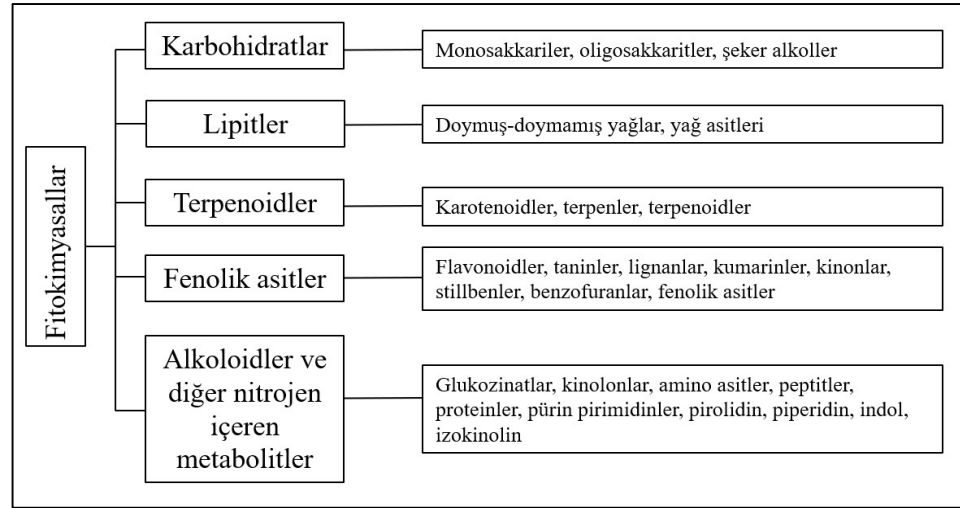
Bitkilerde bulunan biyoaktif bileşikler, insan ve hayvanlarda farmakolojik veya toksikolojik etkilere neden olan bitki sekonder metabolitleri olarak tanımlanmaktadır [Bernhoft, 2010]. Bu sekonder metabolitler insanlar tarafından tüketildiğinde sağlık açısından olumlu etkileri görülmektedir [Demir ve Akpınar, 2020]. Fitokimyasal ajanlar olarak da isimlendirilen bu bileşiklerin bitkinin savunma mekanizmasında, aroma ve koku oluşumunda rol oynadıkları bilinmektedir [Cowan, 1999]. Fitokimyasal bileşikler farklı sınıflara ayrılırlar (Şekil 2.1) [Huang et al., 2016].

Fitokimyasal bileşiklerin en geniş grubu fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler flavanoller, kumarinler ve fenoller gibi alt gruplara ayrılırlar [Campos-Vega and Oomah, 2013]. Doğada 30000'den fazla fenolik bileşiğin bulunduğu bilinmektedir [Atak ve Uslu, 2018]. Fenolik bileşenlerin en büyük alt gruplarından biri olan flavonoidler, kırmızı, yeşil, turuncu pigmentlerden sorumlu molekülüdür. Diğer bir alt grup olan tanenler suda çözünabilir ve yüksek yapılı bitkilerin hemen hemen hepsinde bulunurlar. Protein ve diğer makro moleküllerle çapraz bağ oluşturma yeteneğine sahiptir [Atak ve Uslu, 2018]. Fenolik bileşenlerin *Bacillus subtilis*,

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Enterococcus faecalis* gibi çeşitli bakterilerin büyümelerini inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [Rauha et al, 2000; Naz et al, 2007].

Bitki ekstraktlarından çeşitli fitokimyasal bileşiklerin analizinde kromatografik yöntemler kullanılabilir [Ingle et al., 2016]. Kromatografi yöntemleri moleküllerin boyutuna, şekline ve yüküne göre ayrılma prensibine dayanır [Heftmann, 1992]. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi, ince tabaka kromatografisi gibi yöntemler fitokimyasal bileşiklerin analizinde kullanılabilmektedir [Ingle et al., 2016].

Fenolik bileşiklerin analizinde hızlı ve kolay bir yöntem olan Folin-Ciocalteu yöntemi tercih edilmektedir [Atak ve Uslu, 2018]. Folin-Ciocalteu reaktifi bir fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asit karışımıdır. Alkali koşullarda oluşan reaksiyon sonucu açığa çıkan oksotungstat ve oksolibdat, polifenollerin konsantrasyonu ile orantılı mavi renklenme gösterir [Lemuela-Raventós, 2018]. Bu rengin 760 nm dalga boyunda absorbansı okunabilir [Atak ve Uslu, 2018]. Folin-Ciocalteu yöntemi bitkilerden elde edilen ekstraktların içeriğindeki polifenollerin analizinde ve şarap gibi içeceklerin içeriğindeki fenolik bileşenlerin analizinde kullanılmaktadır [Blainski et al., 2013; Lee et al., 2014; Lamuela-Raventós, 2018].



Şekil 2.1: Fitokimyasal bileşiklerin sınıfları.

2.1.1. Biyoaktif Bileşiklerin Antimikrobiyal Etkileri

Fitokimyasal bileşikler hücrenin biyokimyasal süreçlerini doğrudan veya dolaylı yoldan etkileyerek ve hücrenin fizikokimyasal bütünlüğünü bozarak etki etmektedir [Erdoğan ve Everest, 2013]. Bazı fenolik bileşiklerin hücre membranını tahrip ettiği, enzim inaktivasyonu gerçekleştirdiği, adhezinlere ve proteinlere bağlandığı, metal-iyon kompleksleri oluşturduğu bilinmektedir [Cowan, 1999]. Bitkisel kaynaklı malik asit, sitrik asit gibi organik asitler hücre içi veya ortam pH'sını düşürerek, mikroorganizmanın yaşamı için gerekli metallerle şelat oluşturarak, hücre membranının geçirgenliğini değiştirip substrat taşınımını bozarak antimikrobiyal etki gösterebilirler [Demir ve Akpınar, 2020].

Farklı bileşiklerin hücre üzerindeki etki mekanizması farklılık göstermektedir. Örneğin terpenler hücre duvarındaki lipitler ile interaksyona girerek zarın geçirgenliğinin artmasına neden olurlar. Herhangi bir bileşenin hücrenin hedef bölgesini etkilemesi hücrede zincirleme reaksiyonlara sebep olarak başka bir bölgenin de tahribatına sebep olabilmektedir. Terpenlerin etkisiyle hücre zarı geçirgenliği artan bir hücrede proton hareketi ve elektron akışı etkilenir, bu durum taşınım aksaklıklarına sebep olur ve hücre içeriğinin değişmesine sebep olarak metabolik aktivitelere etki eder. Tanenler ise genellikle toksik maddeler olarak bilinirler ve proteinleri çöktürme yeteneğine sahiptirler. Özetle fenoller ve başka moleküllerle oluşan kombinasyonlar hücrede toksik etki oluşturarak farklı zincirleme reaksiyonlar ile hücreyi genel bir tahribata götürmektedir [Erdoğan ve Everest, 2013].

Antimikrobiyal aktivite araştırmalarında kullanılan en yaygın yöntemler disk difüzyonu, broth ve agar dilüsyon metotlarıdır [Balouiri et al., 2016]. Temeli antimikrobiyal etkisi test edilen bileşiğin veya ekstraktın agarla difüze olmasıyla bakterinin büyümesini inhibe etmesine dayanan agar kuyu difüzyonu ve disk difüzyonu yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır [Balouiri et al., 2016]. Bu yöntemlerde bakteri dökme plak veya yayma plak yöntemleri aracılığıyla agarlı besiyerine ekilir. Agar üzerinde 6-8 mm çapında kuyular açılır veya 6 mm çapında steril filtre kağıdı diskleri kullanılır [Balouiri et al., 2016]. Petri kapları uygun koşullar altında inkübe edildikten sonra oluşan inhibisyon zon çapları ölçülür. Bu yöntem kullanılarak kısa zamanda çok sayıda bakteri üzerinde antimikrobiyal etki taraması yapılabilir, kolay ve hızlı uygulanması açısından avantajlı yöntemlerdir [Balouiri et al., 2016].

Minimal inhibisyon konsantasyonu, antimikrobiyal ajanın mikroorganizmanın büyümesinin inhibe edildiği en düşük konsantrasyondur. Minimal bakterisidal konsantrasyon, antimikrobiyal ajanın mikroorganizmanın üremesini engellediği en düşük konsantrasyondur [Andrews, 2001]. Antimikrobiyal ajanın bir bakteri üzerinde MİK değerini saptamada farklı yöntemler uygulanmaktadır. Optik yoğunluk ölçme, canlı sayımı yapma veya bakterinin metabolik aktivitesini ölçmeye dayalı yöntemler kullanılabilmektedir [Balouiri et al., 2016]. Antimikrobiyal ajanların bakteriler üzerinde MİK ve MBK konsantrasyonlarının belirlenmesi bakterilerin maruz kalacağı antimikrobiyal madde miktarının bilinmesi açısından önemlidir. Bakterinin maruz kalması gerekenden daha düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal maddeye maruz kalması bakteride direnç gelişimine sebep olabilmektedir [Gülmez, 2014].

2.2. Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitkisel fitokimyasalların açığa çıkarılması için kullanılan ekstraksiyon yöntemleri çeşitlilik gösterir. Ekstraksiyon esnasında kullanılacak çözelti veya sıcaklık, sonikasyon gibi ortam değişkenleri elde edilecek ekstrakt çözeltisinin veriminde farklılığa sebep olabilir. Hedeflenen bileşik gruplarına göre yüksek verimde ekstraksiyon yapabilmek için en uygun organik çözücünün ve ortam koşullarının belirlenmesi gereklidir.

Yüksek sıcaklıklarda bitki dokularının yumuşaması ve hücre zarlarının etkilenmesi sonucu fenolik bileşikler çözücüye kolayca ekstrakte edilebilmektedir. Ancak yüksek sıcaklıklara uzun süre maruz kalan ekstraksiyon işlemlerinde verimin ve elde edilen fenolik içeriğin düşük olduğu görülmüştür. Nispeten düşük sıcaklıklara daha kısa sürelerde maruz bırakılan ekstraktlarda ise bu sonuçların daha yüksek olduğu görülmektedir [Che Sulaiman et al., 2017].

Bitkisel materyalden elde edilecek bileşiklerin zenginliği kullanılan ekstraksiyon çözücüsüne bağlıdır. Sulandırılmış metanol ve etanolün, saf metanol ve etanolden daha fazla içeriği ekstraksiyon çözeltisine kattığı gösterilmiştir. Bunun sebebi ise özellikle fenoliklerin polar çözücüler içerisine daha fazla ekstrakte olmasıdır [Sultana et al., 2009].

Çeşitli gıda atıklarından farklı çözücülerle ekstraktlar elde edilen ve bu ekstraktların fenolik madde içeriklerinin araştırıldığı bir çalışmada; tüm bitkilerden

elde edilen ekstraktlarda en yüksek fenolik içeriğin saf su ve metanol ile elde edilen ekstraktlarda görüldüğü tespit edilmiştir [Zoral ve Turgay, 2014]. Kullanılan çözücünün çeşidine göre ekstrakt çözeltisine geçecek farklı bileşikler bulunmaktadır (Tablo 2.1) [Rajkumar et al., 2018]. Kullanılan bitki materyali ve çözünmesi hedeflenen bileşikler doğrultusunda ekstraksiyon yöntemine uygun çözücünün seçilmesi gereklidir.

Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri olarak sokslet ekstraksiyonu, maserasyon yöntemleri örnek verilebilir. Sokslet ekstraksiyonu, katı-sıvı ekstraksiyon esasına dayanır [Kutlu vd., 2017]. Katı-sıvı ekstraksiyonu genellikle organik çözücülerin karışımlarının veya sulu çözeltilerinin bitki materyali ile doğrudan ekstraksiyonundan oluşur, bitki materyalindeki bileşiklerin bir çözücü içerisine göç etmesi olarak tanımlanır [Atak ve Uslu, 2018]. Bitki materyali ekstraksiyon süresi boyunca yüksek sıcaklıklara maruz kaldığı için sokslet ekstraksiyonunun sıcaklığa hassas materyallerde kullanımı uygun değildir [Kutlu vd., 2017]. Maserasyon işleminde materyal öğütülerek veya doğranarak boyutu küçültüldükten sonra oda sıcaklığında solvent içerisinde belli süre bekletilerek ekstrakt elde edilir [Starmans and Nijhuis, 1996]. Bu yöntemin sıcak ortamda gerçekleştirilmesi ile ekstraksiyon verimi artırılabilir ancak sıcaklığa uzun süre maruziyetin ekstraksiyon verimi düşürdüğü görülmüştür [Vergara-Salinas et al., 2012]. Geleneksel yöntemler haricinde mikrodalga aracılı, ultrases destekli ve yüksek basınç destekli modern ekstraksiyon yöntemleri de geliştirilmiştir [Kutlu vd., 2017].

Tablo 2.1: Çözücüye göre ekstrakte olan fitokimyasal bileşikler.

Çözücüler				
Aseton	Etanol	Eter	Metanol	Su
Flavonoller	Alkoloidler	Alkoloidler	Antosiyaninler	Antosiyaninler
	Flavonoller	Kumarinler	Flavonlar	Lektinler
	Poliasetilenler	Yağ asitleri	Laktonlar	Poliipeptitler
	Polifenoller	Terpenoidler	Polifenoller	Saponinler
	Steroller		Saponinler	Taninler
	Taninler		Taninler	Terpenoidler
	Terpenoidler		Terpenoidler	
			Kuasinoidler	
			Ksantoksilinler	

2.3. Antioksidanlar

Normal koşullarda insan vücudundaki serbest radikaller ve antioksidanlar arasında bir denge durumu vardır. Oksijen, organik moleküllerin yapı taşlarından biri ve aerobik canlılar için hayati öneme sahip bir elementtir. Metabolik reaksiyonlarda bulunarak reaktif oksijen türlerinin oluşmasına sebep olabilir. Reaktif oksijen türleri fagositoz gibi önemli faaliyetlerde rol üstlenirler. Normal durumda bulunan oksidan antioksidan dengesinin bozulması sonucunda canlıda oksidatif stres oluşur [Evcimen ve Aslan, 2015].

Oksidatif stres, oksidan antioksidan dengesinin bozularak bunun sonucunda DNA, protein, karbonhidrat ve lipidlerin zarara uğraması ve dolayısıyla birçok hastalığın oluşmasına neden olan bir durumdur [Zoral ve Turgay, 2014].

Antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek koruyucu etki gösteren bileşiklerdir. Vücutta oksidatif stres oluşması durumunda antioksidan savunma sistemi devreye girer. Bu savunma sistemi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek ve oluşanların meydana getirebileceği hasarı önlemek üzere çalışır. Antioksidanlar insan vücudu tarafından üretilen endojen antioksidanlar ve insan vücuduna dışarıdan alınan ekzojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılır. Endojen antioksidanlar aynı zamanda insan vücudu tarafından üretilen doğal kaynaklı antioksidanlar olarak da bilinir. Ekzojen

kaynaklı antioksidanlar ise vitaminler ve ilaç olarak kullanılan sentetik antioksidanlar olarak sınıflanabilir [Karabulut ve Gülay, 2016].

Antioksidan maddeler ekzojen ve endojen kaynaklı olarak sınıflandırılmasının yanı sıra, doğal ve sentetik olmak üzere de ikiye ayrılır. Sentetik bazı antioksidanların sağlık için tehlikeli olabileceği anlaşıldığından beri doğal kaynaklı antioksidanların araştırılmasına yoğunlaşmıştır [Evcimen ve Aslan, 2015]. Doğal kaynaklı antioksidanlar insan vücudunda sentezlenenler ve insan vücudunda sentezlenmeyenler olarak ikiye ayrılır. İnsan vücudunda sentezlenen antioksidanlara Süperoksit Dismutaz, Glutathion-S-Transferaz, Katalaz gibi enzimler örnek gösterilebilir. Diğer doğal kaynaklı antioksidanlara bitkisel kaynaklı fitokimyasal ajanlar örnek verilebilir. Fitokimyasal ajanlardan fenolik asitler, flavonoidler, kateşinler gibi bileşiklerin antioksidan etkilerinin olduğu bilinmektedir [Kasnak ve Palmutoğlu, 2015].

Antioksidan bileşikler ayrıca gıdalarda bozulmanın ana nedenlerinden biri olan lipid peroksidasyonu sonucu oluşan bozulma sürecini geciktirmek üzere katkı maddeleri olarak kullanılırlar. Bu sayede serbest radikaller temizlenmekte ve gıda raf ömrü uzamaktadır. Bütillenmiş hidroksitoluen ve bütillenmiş hidroksianisol gibi antioksidan maddelerin toksik etkileri nedeniyle kullanımları sınırlandırılmıştır. Sonuçta sentetik antioksidanlara artık şüpheli yaklaşım neticesinde doğal kaynaklı antioksidanların gıda uygulamalarında kullanımı konusunda araştırmalara eğilim artmıştır [Gülçin, 2008].

Antioksidan etkinliğin tayin edilmesinde DPPH (2,2-difenil-2-pikrilhidrazil) radikali ile uygulanan yöntem kullanılabilir. DPPH radikali metanol çözeltisi içerisinde stabil mor renklidir ve 515 nm dalga boyunda absorbanşı okunabilir. Antioksidan maddeden DPPH radikalinin bir hidrojen atomu alması üzerinde radikal DPPH₂'ye indirgenerek sarı renge döner. Bu durum 515 nm dalga boyunda absorbanş yoğunluğunun kaybolmasıyla gözlemlenir [Mishra et al., 2012].

2.4. Tez Çalışmasında Kullanılan Bakterilerin Özellikleri

2.4.1. *Bacillus* Suşlarının Karakteristik Özellikleri

Bacillaceae familyasına dahil olan *Bacillus* cinsi bakteriler, çubuk şekilli, endospor oluşturan, aerobik veya fakültatif aerobik olan Gram pozitif bakteriler

grubuna giren bakterilerdir [Turnbull et al., 1996]. Türler arasında koloni morfolojisi ve boyutu açısından çeşitlilik gösterir [Logan and Vos, 2015]. Genellikle krem, beyaz kolonilere sahiptir fakat bazı türlerinde sarı, pembe, siyah gibi renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır [Kalkan ve Halkman, 2006].

Bacillus suşlarının birçok doğal ortamda yaşamalarına izin veren çeşitli fizyolojik yetenekler sergilediği bilinmektedir. Psikrofillikten termofilik ve asidofilik ve alkalifilik arasında değişen yetenekler sergilerler. Birçok *Bacillus* suşunun oluşturduğu sporlar ısıya, radyasyona, dezenfektanlara karşı dirençli olduğundan ameliyathanelerde tıbbi ve farmasötik ürünlerde ve gıdalarda kontaminasyon nedenidir bakterilerdir [Turnbull et al., 1996]. Çoğu *Bacillus* türünün patojenik potansiyeli azdır ancak Şarbon hastalığı etkeni olarak *Bacillus anthracis* bilinmektedir [Logan and Vos, 2015]. Enfeksiyon hastalıklarında ise en sık rastlanılan *Bacillus* türünün ise *Bacillus cereus* suşları olduğu görülmüştür. Bu tür bakterilerin ikincil istilacılar olarak var olan enfeksiyonları şiddetlendirdiği bilinmektedir [Turnbull et al., 1996].

Bacillus cereus, optimum üreme sıcaklığı genellikle 30°C'dir. Optimum üreme pH'sı 7.0'dır. *Bacillus* türleri gıda zehirlenmesine sebep olabilir. *Bacillus* kaynaklı bir gıda zehirlenmesi olayı genellikle sporların pişirme veya pastörizasyondan sonra çoğalması nedeniyle oluşur [Kalkan ve Halkman, 2006].

2.4.2. *Streptococcus* Suşlarının Karakteristik Özellikleri

Streptokoklar, hareketsiz, spor oluşturmayan, çifler veya zincirler halinde görülebilen, çoğu türü fakültatif anerobik olan Gram pozitif bakterilerdir. Streptokoklar hayvan ve insanların doğal florasında, saprofit olarak suda, havada, süt ve süt ürünlerinde, meyve ve sebzelerde bulunabilirler. Streptokok kaynaklı en önemli insan hastalıkları arasına romatizmal kalp hastalığı, pnömoni, menenjit gibi ciddi enfeksiyonların yanında kulak enfeksiyonları ve diş çürükleri gibi olgularda da görülürler [Patterson, 1996; Ünlü vd., 2017].

Streptokokların sınıflandırılması büyük ölçüde hücre duvarı bileşenlerinin serogrup tanımlanmasına dayanmaktadır. A, B, C, D ve G grupları olarak bilinen alt sınıflardan D grubu daha sonra Enterokok olarak farklı bir bakteri türü olarak değerlendirilmeye başlanmıştır [Patterson, 1996].

Streptococcus uberis sığır mastitisine sebep olduğu için süt endüstrisinde önemli bir patojen bakteridir [Kahraman, 1985].

2.4.3. *Enterococcus* Suşlarının Karakteristik Özellikleri

Enterokoklar spor oluşturmayan, tek kok veya zincir halde bulunabilen, fakültatif anaerobik, Gram pozitif bakterilerdir. Çevresel kaynaklarda ve insan ve hayvanların gastrointestinal floralarında doğal olarak bulunurlar [Fisher and Phillips, 2009].

Enterokok türleri stafilokok türlerinden sonra hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en sık karşılaşılan türlerdir. Genellikle idrar yolları enfeksiyonları ve yara enfeksiyonlarının etkenleridir. Enterokoklarda birçok antibiyotiğe karşı geliştirilen direnç rapor edilmiştir bu da enfeksiyonların tedavisine sinerjistik antibiyotik tedavisini gerektirmektedir [Yavuz vd., 2006].

Enterococcus cinsi bakteriler GRAS (Generally Recognized As Safe) olarak kabul edilmemiş olmasına rağmen hayvanların doğal florasında bulunması nedeniyle özellikle et ve süt ürünlerinin fermentasyonunda kullanılan starter kültürler arasında yer almaktadır. Fakat enterokok türlerinin yüksek sıcaklığa olan toleransı ve zorlu çevresel koşullarda üreyebilmeleri nedeniyle hayvansal gıdalar üzerinde kolonize olabilirler [Erginkaya vd., 2006].

Enterokokların patojenitesi antibiyotik dirençleri ve virülans faktörleri ile ilişkilendirilir. Ayrıca *E. faecalis* ve *E. faecium* gibi yaygın Enterokok türleri biyofilm oluşturma kabiliyetine sahiptir [Gürkan vd., 2021]. Biyofilm oluşturarak antimikrobiyal ajanlara karşı güçlenmeleri enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmaktadır.

2.5. Biyofilmler

Biyofilmler bir matris ile çevrili, birbirlerine ve yüzeylere yapışık durumda olan bakteri popülasyonları olarak tanımlanır [Costerton et al., 1999]. Bakteri hücreleri doğada planktonik formda veya bir yüzeye tutunma sonrası çoğalarak biyofilm oluşumu içerisinde bulunabilirler. Biyofilm yapısındaki bakteriler doğada genellikle farklı türde mikroorganizmaları ve simbiyotik ilişkileri içerir [Watnick and Kolter,

2000; Temel ve Eraç, 2018]. Biyofilm yapısının oluşumu dört basamakta meydana gelir [Temel ve Eraç, 2018].

- Tutunma
- Geri dönüşümsüz bağlanma
- Kolonizasyon ve mikrokoloni oluşumu
- Kopma

Tutunma aşamasında hücre yüzeyi ve tutunulan yüzey arasında zayıf geri dönüşümlü van der Waals etkileşimleri oluşur ve mikroorganizma canlı veya cansız bir yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlanır [Dufour et al., 2012; Temel ve Eraç, 2018]. Tutunma gerçekleştikten sonra bakteride ekstraselüler polimerik maddelerin (EPS) sentezi başlar. EPS'nin biyofilm yapısının yapıtaşı olduğu bilinmektedir [Temel ve Eraç, 2018]. Biyofilm matrisi çoğunlukla (% 97) sudan oluşur [Zhang et al., 1998]. Polisakkaritler, proteinler, ekstraselüler DNA ve RNA ve iyonlar matris yapısında mevcut olabilir. Biyofilm matrisinin yapısı, biyofilm içerisindeki hücrelerden fizyolojik duruma, mevcut besinlerden çevresel koşullara çeşitli sebeplere bağlı olarak değişiklik gösterir [Sutherland, 2001].

Geri dönüşümsüz bağlanma aşamasının ardından bakteri hücreleri bölünüp çoğalarak mikrokolonileri oluşturur. Bakteriler sinyal moleküllerini salgılamaya başlar ve Quorum Sensing (Quorum-algılama) sistemi devreye girer. Biyofilmin oluşumu ve olgunlaşmasının ardından biyofilm yapısında üst tabakada bulunan bakteriler koparak yapıdan ayrılır ve yeni biyofilm yapıları oluşturmak üzere göç eder [Temel ve Eraç, 2018].

Biyofilm yapısında alt kısımda lokalize olan hücreler durağan fazdaki planktonik hücrelere benzer bir büyüme aşamasında görülürken, üst katmanlarda lokalize olan hücreler logaritmik büyüme fazındaki planktonik hücrelere benzer [Dufour et al., 2012]. Bu durumun biyofilmlerde üst tabakadaki hücrelerin besin ve oksijeni tüketmesi ve biyofilmin derinliklerine gidildikçe besin ve oksijenin azalmasının bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Biyofilmin kimyasal heterojenliği olarak da bilinen durum, biyofilmin farklı bölgelerinde farklı koşulların oluşmasıyla beraberinde fizyolojik heterojenliği de getirir. Olgun biyofilmin alt tabakalarında anaerobik bakteriler bulunabilirken üst tabakalarda aerobik bakteriler bulunur [Stewart and Franklin, 2008]. Bakterilerin biyofilm içerisinde ve planktonik formlarında farklı genlerin ifade edildiğine dair kanıtlar vardır. Bu duruma hücrenin

bir yüzeye tutunması sonrası EPS materyallerini salgılayacak genlerin ifade edilmeye başlanması veya Quorum-algılama sinyal moleküllerinin ortamda eşik değere ulaştıktan sonra belli genlerin ifadesini sağlamak üzere çalışması örnek verilebilir [Kuchma and O'Toole, 2000].

Biyofilm yapısındaki bakterilerin planktonik formlarına kıyasla antibiyotiklere 100 ila 1000 kat daha fazla toleransa sahip olduğu gösterilmiştir [Govan and Deretic, 1996]. Bu durum antibiyotikle tedavinin sonuç vermemesine ve antibiyotiğin belli konsantrasyonlarına maruz kalan bakterilerin direnç geliştirmesini tetikleyebilmektedir [Temel ve Eraç, 2018]. Biyofilmlerin antibiyotiğe direnç mekanizmasını açıklamak üzere EPS matrisinin bir bariyer gibi davranarak biyofilm yapısını koruduğu ve biyofilm içerisindeki hücreleri antibiyotiklere karşı koruduğu öne sürülmüştür [Dufour et al., 2012].

Biyofilmler antibiyotiklere ve antimikrobiyal ajanlara direnç göstermesi sebebiyle tıbbi, endüstriyel ve çevresel ortamlarda problemlere neden olurlar [Costerton et al., 1995]. Kullanılan tıbbi cihaz veya biyomateryalde biyofilm oluşumu hastalar için enfeksiyon kaynağı olmakla birlikte cihazda da fonksiyon kaybı oluşturur [Temel ve Eraç, 2018]. Biyofilm enfeksiyonlarını önlemede iki önemli yaklaşım vardır. Bunlar biyofilm oluşumunun engellenmesi veya oluşmuş biyofilmin uzaklaştırılmasıdır [Altınok vd., 2018].

2.5.1. Gıda Sanayinde Biyofilmler

Patojenik mikroorganizmalar gıda yüzeylerine, ekipmanlarına ve işleme ortamlarına yapışarak biyofilm oluşturabilirler [Shi and Zhu, 2009]. Biyofilm içerisindeki bakteriler planktonik formlarına göre antimikrobiyal ajanlara direnç göstermektedir, gıda temaslı yüzeylerde yapılan dezenfeksiyon işlemlerinin de planktonik formdaki bakterileri etkisiz hale getirmesine rağmen biyofilm içerisindeki bakterileri tamamen yok edemediği tespit edilmiştir [Wirtanen et al., 1996; Shi and Zhu, 2009].

Gıda temaslı yüzeylerde temizlik ve dezenfeksiyon kontaminasyonun önüne geçilmesinde iki temel adımdır. Uygun şekilde temizlenmemiş ekipmanlar dezenfektanın organik maddelere bağlanması sebebiyle uygun şekilde sterile edilemez. Ayrıca temizleyici ve dezenfektan kalıntıları gıda maddelerine bulaşarak

insanlar ve çevre üzerinde toksik etkiye sebep olabilir [Dosti et al., 2005]. Gıda temaslı yüzeylerde dezenfeksiyon işleminde durulama yapılmayacak durumlarda kullanımına izin verilen maksimum düzey 200 ppm olmak üzere klor en yaygın kullanılan dezenfektanlardan biridir [Schmidt, 1997]. Endüstride 50-200 ppm arası hipokloröz asit ve hipoklorit gibi klorlu bileşikler maksimum maruz kalma süresi 5 dakika olmak üzere uygulanır [Goodburn and Wallace, 2013; Meireles et al., 2016]. 5 dakikadan daha uzun sürelerde yıkama yapılmasının mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasını arttırmadığı gösterilmiştir [Adams et al., 1989].

Klorlu bileşikler toksik yan ürünler oluşturarak kalıntılar bırakması ve böylelikle çevre ve insan sağlığına olumsuz etkileri sebebiyle bazı ülkelerde yasaklanmıştır. Bu sebeple klora alternatif dezenfektanların ve dezenfeksiyon yöntemlerinin araştırılması gündemde olan bir konu haline gelmiştir [Meireles et al., 2016].

Farklı bitki ekstraktlarının gıda patojeni bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin kontrol edilmesinde potansiyel etkileri araştırılmıştır [Nostro et al., 2016]. Fenolik bileşiklerin farklı bakterilerin oluşturduğu biyofilmler üzerinde inhibe edici etkisi olduğu yapılan farklı çalışmalarla tespit edilmiştir [Slobodníková et al., 2016].

2.5.2. Quorum-Algilama

Quorum-algılama (Çoğunluğu algılama) biyofilm içerisindeki bakterilerin sinyal molekülleri üretilip salgılamasıyla oluşan hücre-hücre iletişiminin bir örneğidir [Fuqua et al., 1994]. Minimum popülasyon birimi algılama olarak bilinen, bakteri hücrelerinin biyofilm yapısında popülasyon yoğunluğunu saptamasına yarayan çoğunluğu algılama sistemi, yapının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu sistem sayesinde bakteriler değişen besin kaynaklarına uyum sağlar ayrıca enfeksiyon sırasında çeşitli virülans faktörlerinin regülasyonunu düzenleyerek konak immün yanıtından kaçabilir [Temel ve Eraç, 2018]. Çoğunluğu algılama biyolüminesansı, virülans faktörlerin ifadesini, biyofilm oluşumunu, sporulasyonu düzenlemede rol oynar [Bassler, 2002].

Sinyal molekülleri ortamda belli bir eşik değere ulaştığında hem sinyal molekülünün hem de sinyal molekülü aracılığıyla kontrol edilen genlerin regülasyonunda değişiklik görülür. Bu sinyal molekülleri “Otoindükleyiciler” olarak

isimlendirilir. Bu sinyal moleküllerinin farklı bakteri türlerinde bulunan farklı sınıfları tanımlanmıştır [Bassler, 2002].

- Gram negatif bakteriler

Açıl Homoserin Lakton (AHL) sınıfı sinyal molekülleri LuxI tip enzimler tarafından sentezlenir. Sitoplazmik olarak sentezlenen otoindükleyiciler hücre membranından difüze edilerek salgılanır. Yeterli eşik sağlandığı zaman LuxR tip proteinlere bağlanır ve LuxR-AHL kompleksi hedef genlerin promotör bölgesine bağlanarak transkripsiyonu aktive eder [Bassler, 2002].

- Gram pozitif bakteriler

Otoindükleyiciler kısa ve genellikle modifiye edilmiş peptitlerden oluşur. Sinyal peptitleri hücreden aktif olarak salınır ve hücre membranındaki sensör proteinlerin dış domainine bağlanır. Sinyal iletimi ve hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol eden bir DNA'ya bağlanan proteinin aktivasyonu gerçekleşir. Hücre membranındaki sensör proteinler sinyal peptitlerine yüksek seçicilik gösterir. Dolayısıyla bu mekanizma spesifiktir [Bassler, 2002].

- Otoindükleyici-2

Gram negatif ve Gram pozitif bakteri sinyal sistemlerinden farklı olarak bazı bakterilerde ayrıca tanımlanan bir sinyal molekülüdür. İlk olarak *Vibrio harvei* bakterisinde keşfedilmiştir ve biyoluminesans mekanizmasında rol oynadığı görülmüştür [Bassler et al., 1993]. Farklı bakterilerde de Otoindükleyici-2 molekülü aracılı çoğunluğu algılama sistemi görülmüştür [Altınok vd., 2018].

Sinyal moleküllerindeki bu çeşitlilik aynı veya farklı türden mikroorganizmalar arası iletişim açısından önem taşır [Temel ve Eraç, 2018]. Biyofilmle mücadelede, biyofilmdeki mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara dirençli olması ve dirençlerinin artabileceği bilinmektedir. Quorum algılama gibi biyofilm oluşumunda rol oynayan sinyal mekanizmalarının engellenmesi biyofilm oluşumunun engellenmesinde yeni bir strateji olarak araştırılmaktadır [Brackman and Coenye 2015].

Chromobacterium violaceum, Gram negatif, viyolasein pigmentini sentezleyen bir bakteridir [Lichstein and Van De Sand, 1945; Choo et al., 2006]. Viyolasein pigmentinin üretimi *vio* operonu tarafından gerçekleştirilir. Bakteri tarafından Quorum-algılama molekülü olarak *cviI* geni tarafından sentezlenen AHL moleküllerinin ortamda eşik değere ulaştıktan sonra bakteri hücresine girip CViR

transkripsiyon regülatörüne bağlanarak *vio* operonunun transkripsiyonu aktif hale getirir [Kothari et al., 2017]. *C. violaceum* CV026 suşu ise AHL üretimini sağlayan *cviI* geni mutant bir suştur. Üreme ortamına dışarıdan AHL takviyesi yapılması sayesinde viyolasein pigmeni üretebilir [McClellan et al., 1997; Choo et al., 2006]. Bu suş anti-quorum-sensing etkinliğinin araştırılmasında model bakteri olarak kullanılmaktadır [Choo et al., 2006].

2.6. Fındık ve Fındık Yan Ürünleri

Fındık (*Corylus avellana* L.) Betulaceae familyasına ait olup, dünya çapında en popüler kuruyemişlerden biridir [Bottone et al., 2019]. Fındık gıda sanayinde çiğ veya kavrulmuş, tuzlanmış çerez olarak kullanılabildiği gibi ezme, un, püre haline getirilerek fındık ürünleri olarak veya çikolata gibi ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılabilmektedir [Şimşek ve Aslantaş, 1999]. Bu ticari önemi yüksek olan yemişin üretiminde Türkiye, İtalya ve ABD önde gelen ülkeler olup Türkiye 2021 yılında, % 60.6 ile dünya fındık üretiminde önemli bir pay sahibi olmuştur [TEPGE, 2021].

Ülkemizde özellikle Karadeniz bölgesinde yetişen fındığın üretiminde hasattan hemen sonra fındıklar yeşil kabuklarından ve sert kabuklarından mekanik yöntemlerle çıkarılır ve iç fındık ticari olarak kullanılır. Fındığın sert kabuklarının yakılarak ısı kaynağı olarak, yeşil kabukların ise kompostlama sonrası organik gübre olarak kullanıldığı bilinmektedir. Fakat bunlar dışında fındık yan ürünlerinin ticari bir değeri yoktur [Alasalvar et al., 2006]. Kavurma, parçalama, kabuk soyma ve hasat işlemlerinden sonra oluşan ince zar kabuk, sert kabuk, yeşil kabuk gibi yan ürünler biyolojik aktiviteye sahip fitokimyasal ajan kaynağı olarak ortaya sürülmüştür [Bottone et al., 2019].

Literatürde fındık yeşil kabuğu ile ekstrakt elde edilen çalışmalarda, bu ekstraktların fitokimyasal içerik bakımından zengin olduğu ve gallik asit, kuersetin, elajik asit gibi bileşikler içerinde olduğu görülmüştür (Tablo 2.2) [Alasalvar et al., 2006; Cerulli et al., 2017; Cabo et al., 2020].

Tablo 2.2: Fındık yeşil kabuğu ile ekstrakt elde edilen çalışmalarda analiz edilen bileşikler.

Bileşikler	Referans
Gallik asit	Alasalvar et al., 2006 Cabo et al., 2020
Protokateşik asit Epikateşin Kuersetin Elajik asit Luteolin Vanilik asit	Cabo et al., 2020
Kaempferol	Cerulli et al., 2017 Cabo et al., 2020
Kafeik asit P-kumarik asit Ferulik asit Sinapik asit	Alasalvar et al., 2006
Giffoninler Sitrik asit Metilsitratlar Mirisetin	Cerulli et al., 2017

Literatürde fındık yeşil kabuğundan farklı çözücüler ve farklı yöntemler uygulanarak elde edilen ekstraktlarla (Tablo 2.3) yapılan çalışmalarda ekstraktların antioksidan [Oğuzkan vd., 2016; Cabo et al., 2020; Kurtça, 2020] ve antimikrobiyal [Oğuzkan vd., 2016; Cerulli et al., 2017] aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Tablo 2.3: Literatürde findık yeşil kabuğu kullanılarak elde edilen ekstraktların ekstraksiyon yöntemleri.

Ham madde miktarı (g)	Çözücü miktarı (mL)	Ekstraksiyon yöntemi	Çözücü	Referans
0.24	1	70°C sıcaklıkta 45 dakika bekletme	Su % 80 Metanol Aseton Etil asetat Hekzan	Cabo et al., 2020
10	100	50°C sıcaklıkta 30 dakika bekletme	% 80 Etanol % 80 Aseton	Alasalvar et al., 2006
6	100	80°C sıcaklıkta 30 dakika bekletme	% 80 Etanol	Shahidi et al., 2007
0.4	5	15 dakika ultrasonik banyoda bekletme	% 80 Metanol % 80 Aseton	Sürek ve Büyükkilci, 2018
100		Sokslet aparatında 10-12 saat ekstraksiyon	Su Aseton Etanol	Kurtça, 2020
100	200	Birkaç gün boyunca bekletme	Su-aseton	Kurtça, 2020

Literatürde findık yeşil kabuğundan farklı çözücüler ve farklı yöntemler uygulanarak elde edilen ekstraktlarla (Tablo 2.3) yapılan çalışmalarda ekstrakt içeriklerinin analizinde toplam fenolik ve flavonoid içerikleri araştırılmıştır. Elde edilen ekstraktların uygulanan ekstraksiyon yöntemi ve kullanılan ekstraksiyon çözücüsüne göre farklılık gösteren konsantrasyonlarda içeriklerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Genel olarak findık yeşil kabuğu ekstraktlarının fenolik içeriğinin zengin olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4: Fındık yeşil kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik (mg GAE g⁻¹ (1 gramda gallik asit eşdeğeri mg kuru madde miktarı) veya mg CE g⁻¹ (1 gramda kateşin eşdeğeri mg kuru madde miktarı) ve flavonoid içerikleri (mg CE g⁻¹).

Toplam Fenolik İçerik	Toplam Flavonoid İçerik	Referans
2.2±0.1 mg GAE g ⁻¹ 10.2±0.1 mg GAE g ⁻¹ 1.5±0.2 mg GAE g ⁻¹ 0.6±0.0 mg GAE g ⁻¹ 0.2±0.0 mg GAE g ⁻¹	0.8±0.0 mg CE g ⁻¹ 3.8±0.1 mg CE g ⁻¹ 1.4±0.1 mg CE g ⁻¹ 0.5±0.0 mg CE g ⁻¹ 0.4±0.0 mg CE g ⁻¹	Cabo et al., 2020
156±1 mg CE g ⁻¹ 201±2 mg CE g ⁻¹	385±2.1 mg CE g ⁻¹ 542±2.1 mg CE g ⁻¹	Alasalvar et al., 2006
127.3±0.7 mg CE g ⁻¹		Shahidi et al., 2007
12.8 mg GAE g ⁻¹ 16.83 mg GAE g ⁻¹		Sürek ve Büyükkileci, 2018
257.7±47.0 mg GAE g ⁻¹ 172.5±17.5 mg GAE g ⁻¹ 189.7±5.5 mg GAE g ⁻¹	10.6±4.0 mg CE g ⁻¹ 4.2±0.6 mg CE g ⁻¹ 5.3±0.4 mg CE g ⁻¹	Kurtça, 2020
273.6±10.1 mg GAE g ⁻¹	1.7±0.4 mg CE g ⁻¹	Kurtça, 2020

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan agar, Mueller-Hinton Broth (MHB), Tryptic Soy Broth (TSB) ve pepton Biolife (Milano İtalya); maya özütü AppliChem (Barselona, İspanya); metanol, gentamisin sülfat, kristal viyole, Folin-Ciocalteu reaktifi, alüminyum klorür, sodyum klorür, potasyum asetat, sodyum karbonat ve DPPH radikali Merck (Darmstadt, Almanya); etanol Alkomed (Plovdiv, Bulgaristan); 0.45 µm gözenek çaplı filtreler Isolab (Bavyera, Almanya); petri kapları FıratMed (Türkiye); 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakası TPP (Darmstadt, Almanya); sodyum hipoklorit ACE (İstanbul, Türkiye), kuersetin ve gallik asit Sigma-Aldrich (Darmstadt, Almanya); ve fındık yeşil kabukları bahçesinde ilaçlama yapmayan yerel bir üreticiden Ağustos 2021 tarihinde (Şile, İstanbul) temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında fındık yeşil kabuklarının ekstraksiyondan önce öğütülmesi için mutfak tipi bir öğütücü (Sinbo, Scm-2934, Düzce, Türkiye) kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi bir sıcak su banyosunda (Isolab, Ultrasonic Cleaner 621.05.001, Bavyera, Almanya), katı madde ayrımı ise santrifüj cihazı (Gyrozen 1248R, Daejeon, Kore) ile yapıldı. Ekstraktlardaki çözücü ve fazla miktardaki suyun uzaklaştırılması ise bir evaporatör cihazı (Heidolph Hei-VAP, Bavyera, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi.

Fındık yeşil kabuklarının ve besiyeri içeriklerinin tartımında bir hassas terazi (Kern, Balingen, Almanya) ve besiyeri hazırlama aşamasında bir ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA RH basic 2, Deutschland, Almanya) kullanıldı. Bakteri hücrelerinin uygun koşullarda inkübasyonu bir çalkalamalı inkübatör (New Brunswick Innova 42, Hamburg, Almanya) ve bir etüv (Thermo Scientific Heratherm IGS 60, Lagenselbold, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Gelişen bakteri kültürlerinin optik yoğunluğunu belirlemede bir spektrofotometre cihazı (Simadzu UV-1280, Duisburg,

Almanya) kullanıldı. Standart kimyasalların ve ekstrakt dilüsyonlarının hazırlanmasında ve bulunduğu kap içerisinde dip kısma çöken bakterilerin besiyeri içerisinde eşit olarak dağılmasında bir hızlı karıştırıcı (IKA Vortex Genius 3, Deutschland, Almanya) kullanıldı.

Ekstraktların toplam fenolik, toplam flavonoid içerikleri ve antioksidan etkinliklerini incelemek için uygulanan yöntemlerin ve biyofilm oluşumunun absorbans değerlerini uygun dalga boyunda ölçmek için bir ELISA okuyucu (BMG LABTECH FLUOstar Omega, Offenburg, Almanya) kullanıldı. Tüm deney malzemelerinin ve hazırlanan besiyerlerinin sterilizasyonu bir otoklav cihazı (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) kullanılarak yapıldı.

3.1.3. Kullanılan Bakteri Soyları

Bu tez çalışmasında GTÜ Mikrobiyal Biyoteknoloji Laboratuvarı bünyesinde bulunan *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus uberis* ATCC 700407 ve *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 suşları kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Kullanılan besiyerleri 121°C’de, 15 dakika boyunca otoklav cihazında (Hirayama Hiclave™, HVE-50, Saitama, Japonya) steril edildi ve oda sıcaklığında soğutulduktan sonra kullanılacağı zamana kadar +4°C sıcaklıkta saklandı. Şeker içeren besiyerinin şeker içeriği besiyerinden ayrı olarak otoklavlandı. Daha sonra şeker içeriği ve besiyeri steril koşullarda bir araya getirildi. İçerisinde agar bulunan besiyerleri 17 mL hacimde steril koşullarda Petri kaplarına aktarıldı. Besiyerleri katılaştıktan sonra kullanılacakları zamana kadar +4°C sıcaklıkta saklandı.

3.2.2. Bakteri Kùltürlerinin Saklanması

Kullanılan bakteri suşlarının steril Luria-Bertani katı besiyeri (LB-A) (15 g/L agar) üzerine öze yardımıyla çizgi ekim yöntemi kullanılarak ekimleri yapıldı. *Bacillus* türü bakterileri içeren petriler 30°C sıcaklıkta, diğer bakteri türleri 37°C sıcaklıkta bir gece etüvde (Thermo Scientific Heratherm IGS 60, Lagenselbold, Almanya) inkübe edildi. Taze kùltürler +4°C sıcaklıkta saklandı ve iki haftada bir sıklıkta kùltürler taze katı besiyeri içeren petrilere aktarıldı.

Tablo 3.1: Kullanılan bakteri türlerinin üremesi için gereken inkübasyon sıcaklığı (°C)

Bakteri	İnkübasyon sıcaklığı (°C)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	30
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	30
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	37
<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 700407	37

3.2.3. Fındık Yeşil Kabuklarının Ekstraksiyonu

3.2.3.1. Fındık Yeşil Kabuklarının Ekstraksiyon İçin Hazırlanması

Fındıkları ayıklanmış taze fındık yeşil kabukları İstanbul, Şile'den Ağustos 2021'de temin edildi. Taze fındık yeşil kabukları tozlarından su yardımıyla arındırıldıktan sonra kurumaya bırakıldı. Taze fındık yeşil kabuklarının nemi gittikten sonra paketleni ve kullanıma kadar -20°C'de saklandı.

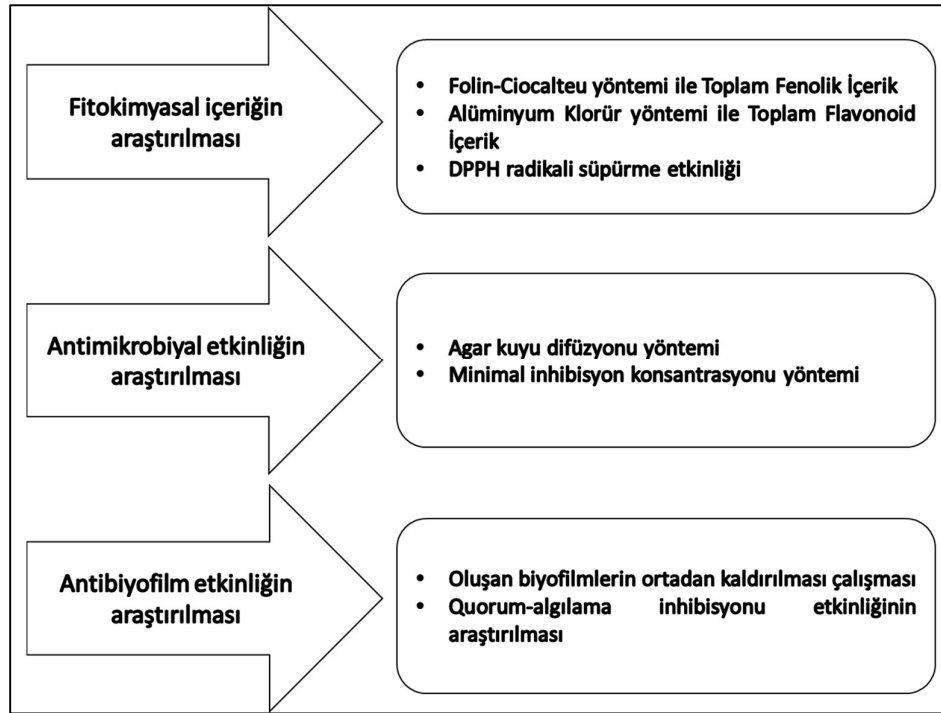
3.2.3.2. Fındık Yeşil Kabuğu Ekstraktının Hazırlanması

20 gram fındık yeşil kabuğu ev tipi öğütücü (Sinbo, Scm-2934, Düzce, Türkiye) yardımıyla toz haline getirildi ve 100 mL metanol:su (80:20) (FM: Fındık yeşil kabuğu metanol ekstraktı) veya 100 mL distile su (FS: Fındık yeşil kabuğu su ekstraktı) ile karıştırıldı. Bu karışımlar 30 dakika 50°C'de sıcak su banyosunda (Isolab, Ultrasonic

Cleaner 621.05.001, Bavyera, Almanya) bekletildikten sonra [Alasalvar et al., 2006] karışımlardaki tortu gazlı bez yardımıyla süzüldü ve kalan sıvılar 4000 rpm +4°C’de 10 dakika santrifüj (Gyrozen 1248R, Daejeon, Kore) edildi. Süpernatant filtre kağıdından geçirilerek süzüldü ve elde edilen ekstrakt çözeltisi evaporatöre (Heidolph Hei-VAP, Bavyera, Almanya) alınarak, 100 rpm 50 °C’de ekstraksiyon verimi her seferinde aynı olacak şekilde çözücü uçuruldu.

Evaporasyon işlemi sonrasında 8 mL ekstrakt çözeltisi elde edildi ve ekstraktlar deneyde kullanılmak üzere -20°C’de saklandı. -20°C’den çıkarıldıktan sonra tortuların giderimi için 4000 rpm +4°C’de 8 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı 0.45 µm gözenek çaplı şırınga filtresinden geçirilerek süzüldü.

Hazırlanan fındık yeşil kabuğu ekstraktları farklı oranlarda steril saf su ile seyreltilerek Şekil 3.1’de özetlenen deneylerde kullanıldı.



Şekil 3.1: Fındık yeşil kabuğu ekstraktlarının fitokimyasal içeriğinin, antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliklerinin araştırılmasında uygulanan yöntemler.

3.2.4. Ekstraktların Kuru Madde Tayini ve Ekstraksiyon Veriminin Hesaplanması

Ekstrakt çözeltilerinden 1 mL alınarak darası alınan mikrofüj tüplerine konuldu. 70°C sıcaklıkta etüvde (Thermo Scientific Heratherm IGS 60, Lagenselbold, Almanya) 2 gün kurutulduktan sonra 1 mL ekstrakttaki kuru ağırlık tartıldı. 1 mL ekstraktın kaç gram olduğu hesaplanarak mg mL⁻¹ cinsinden ekstraktların kuru madde miktarı hesaplandı. İşlem her ekstrakt için 3 tekrarlı olarak yapıldı.

Ekstraksiyon verimi aşağıda verilen formülle [Herodež et al., 2003] hesaplandı.

$$\text{Ekstraksiyon verimi (\%)} = \frac{\text{Ekstrakt Ağırlığı}}{\text{Ekstrakte Edilen Ham Materyal Ağırlığı}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.5. Ekstraktların pH değerlerinin ölçülmesi

Ekstraktların pH ölçümü için bir pH metre (Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP, Bedfordshire, İngiltere) cihazı kullanıldı. Ekstraktların sıcaklığı 30 ve 37 °C'ye ayarlandı. İçerisinde ekstrakt bulunan cam beher içerisine pH elektrodu ve sıcaklık probu yaklaşık 3 cm derinliğinde daldırıldı ve hafifçe karıştırıldı. Elektrodun sabit olması sağlandı. Farklı ekstrakt ölçümleri sırasında çapraz kontaminasyonu önlemek için elektrot distile su ile yıkandı ve kurulandı.

3.2.6. Ekstraktların Toplam Fenolik İçeriklerinin Tayini

Ekstraktların toplam fenolik içeriğini tayin etmek amacıyla Folin-Ciocalteu yöntemi kullanıldı [Singleton and Rossi, 1965]. FM ve FS ekstraktlarından 150 µL cam tüplere alınarak üzerine 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi ve üzerine 350 µL % 5'lik sodyum karbonat eklendi ve 2.9 mL distile su eklenerek reaksiyon hacmi 3.5 mL'ye tamamlandı. Tüpler 60 dakika süre ile oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Tüp içerikleri düz tabanlı 96 kuyucuklu mikropalakaya alınarak 760 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda absorbansları okundu [Montella et al., 2013]. Kontrol olarak metanol ve standart olarak gallik asit dilüsyonları (500-300-250-200-150 µg mL⁻¹) kullanıldı. Oluşturulan standart kalibrasyon grafiğine göre ($y=1.732x-0.022$, $R^2=0.9947$) sonuçlar mg GAE g⁻¹ cinsinden hesaplanarak belirtildi.

3.2.7. Ekstraktların Toplam Flavonoid İçeriklerinin Tayini

Ekstraktların toplam flavonoid içeriğini tayin etmek amacıyla Chang ve ark (2002) alüminyum klorür (AlCl_3) yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. FM ve FS ekstraktlarından 125 μL mikrofij tüplerine örnekler alındı ve üzerine 375 μL metanol eklendi. Ardından her tüpe 25 μL % 10'luk AlCl_3 ve 25 μL 1 M potasyum asetat eklendi. Son olarak tüplere 700 μL distile su eklendi. Tüpler 30 dakika süre ile karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Ardından tüp içerikleri düz tabanlı 96 kuyucuklu mikropalakaya alınarak 415 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda absorbansları okundu. Kontrol olarak metanol ve standart olarak kuersetin dilüsyonları (250-200-100-50-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) kullanıldı [Chang et al., 2002]. Oluşturulan standart kalibrasyon grafiğine göre ($y=2.465x+0.0278$, $R^2=0.9999$) sonuçlar mg QE g^{-1} cinsinden hesaplanarak belirtildi.

3.2.8. Ekstraktların Antioksidan Etkinliklerinin Tayini

Ekstraktların antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla DPPH serbest radikali giderme aktivitesi tayini yapıldı. Metanol içerisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlardan ve standart olarak kullanılan gallik asit çözeltilerinden 0.0125 mL alınarak metanol içerisinde hazırlanan 50 ppm DPPH çözeltisinden 0.4875 mL ilave edildi. Hızlı karıştırıcı (IKA Vortex Genius 3, Deutschland, Almanya) yardımıyla karıştırıldıktan sonra 37°C sıcaklıkta, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Ardından düz tabanlı 96 kuyucuklu mikropalakaya alınarak 517 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda absorbansları okundu [Rufino et al. 2007]. Kontrol olarak metanol, standart olarak gallik asit dilüsyonları (250-200-100-75-50-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) kullanıldı. Sonuçlar DPPH radikali giderme aktivitesi (%) olarak ve IC_{50} cinsinden hesaplandı. DPPH radikali süpürme aktivitesi (%) aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$\text{DPPH radikali süpürme etkinliği(\%)} = \frac{\text{OD517 Ekstrakt uygulaması} - \text{OD517 Kör}}{\text{OD517 Kontrol}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.9. Ekstraktların Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkilerinin İncelenmesi

Hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi için *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. uberis* ve *E. faecalis* bakterileri kullanıldı. Bakteriler 50 mL hacimli erlende 10 mL hacimde bulunan Luria-Bertani sıvı besiyerine ekilerek 16-18 saat *Bacillus* suşları 30°C ve diğer bakteriler 37°C sıcaklıkta olmak üzere 180 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde (New Brunswick Innova 42, Hamburg, Almanya) ön kültür inkübasyonuna bırakıldı. İnkübasyon süresi sonucunda bakterilerin 600 nm dalga boyunda optik yoğunluğu 0.1 absorbans değerinde olacak şekilde (yaklaşık 8×10^7 kob mL⁻¹) fizyolojik tuzlu su (% 0.9 NaCl, FTS) içerisinde seyreltildi. Hazırlanan bakteri süspansiyonları hızlı karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak fizyolojik tuzlu su içerisinde eşit dağılması sağlandıktan sonra 100 µL hacimde alınarak steril koşullarda Luria-Bertani katı besiyeri (LB-A) (12 g/L agar) üzerine yayılarak ekim yapıldı. Kültürlerin besiyeri üzerinde kuruması için 10 dakika beklendi. Agar üzerine 6 mm çapında kuyular açıldı ve açılan kuyulara 40 µL farklı konsantrasyonlarda FM ve FS ekstraktları (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) eklendi [Oğuzkan vd., 2016].

Kontrol olarak *Enterococcus faecalis* bakterisi için 100 µg mL⁻¹, diğer bakteriler için 10 µg mL⁻¹ gentamisin [Selvados et al., 2018] antibiyotiği kullanıldı. Ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücünün evaporasyon işlemi sırasında tamamen uçtuğunu kanıtlamak için, ekstraktlarla aynı evaporasyon işlemi uygulanan organik çözücü (% 80 metanol) kullanıldı. 24 saat inkübasyonun ardından oluşan inhibisyon zon çapları incelendi. Ekstraktların antimikrobiyal etkileri gentamisin antibiyotiğinin etkisi ile karşılaştırıldı.

3.2.10. FM Ekstraktının Minimal İnhibisyon ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

FM ekstraktının bakteri hücresinin büyümesini engelleyen en düşük konsantrasyonunu belirlemek amacıyla MİK belirleme deneyi yapıldı. *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. uberis*, *E. faecalis* bakterileri kullanıldı. Bakteriler 50 mL hacimli erlende 10 mL hacimde bulunan Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerine ekilerek 16-18 saat *Bacillus* suşları 30 °C ve diğer bakteriler 37 °C sıcaklıkta olmak üzere 180 rpm

çalkalama hızındaki inkübatörde ön kültür inkübasyonuna bırakıldı. 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakası kuyusundaki bakterilerin 600 nm dalga boyunda optik yoğunluğu finalde 0.1 absorbans değerinde (yaklaşık 8×10^7 kob mL⁻¹) olacak şekilde Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) içerisinde ayarlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonları hızlı karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak Mueller-Hinton sıvı besiyeri (MHB) içerisinde eşit dağılması sağlandıktan sonra 100 µL hacimde alınarak kuyuya eklendi. Aynı hacimde, farklı konsantrasyonlarda (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512) ekstrakt dilüsyonları kuyuya eklendi [Vaillancourt et al., 2018].

Ekstraktın 1:1 dilüsyonunun bakteri üremesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, 600 nm dalga boyunda optik yoğunluğu 0.1 absorbans değerinde olacak şekilde 1 mL bakteri mikrofüj tüplerine alındı ve 10000 rpm dönme hızında 10 dakika santrifüj (Eppendorf AG, Barkhausenweg, Hamburg, Germany) edildi. Santrifüjün ardından üst sıvı döküldü ve 1 mL ekstrakt çözeltisi pellete eklendi ve karışım hızlı karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Bu çözeltiden 200 µL hacimde 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakasının kuyularına eklendi. Pozitif kontrol için ekstrakt eklenmeyen kuyular kullanıldı.

96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakası 24 saat statik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından FTS içerisinde seyreltme yapıldı. Hazırlanan bakteri solüsyonlarından 100 µL hacimde alınarak Luria-Bertani katı besiyerine (LB-A) (15 g/L agar) ekildi. 24 saat statik koşullarda inkübasyonun ardından canlı koloni sayımı gerçekleştirildi. Ekstrakt dilüsyonlarının bakteriler üzerindeki etkisi, elde edilen sonuçların pozitif kontrolle karşılaştırılarak inhibisyon oranı (%) olarak hesaplanmasıyla incelendi.

3.2.11. FM Ekstraktının Biyofilm Oluşumunu Ortadan Kaldırma Etkinliğinin İncelenmesi

FM ekstraktının *E. faecalis* bakterisinin biyofilm oluşumunu ortadan kaldırma etkisi incelendi. Bunun için, *E. faecalis* bakterisi 50 mL hacimli erlende 10 mL hacimde bulunan % 2 glukoz içeren TSB besiyeri içerisine ekilerek 16-18 saat 37 °C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde ön kültür inkübasyonuna bırakıldı.

Mikrotitrasyon plakası kuyusunda final bakteri yoğunluğu OD₆₀₀ değeri 0.02 olacak şekilde (yaklaşık 10^6 kob mL⁻¹) % 2 glukoz içeren TSB besiyerinde ayarlandı.

96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakasının kuyularına hazırlanan kültürlerden 200 µL konuldu [Sánchez et al., 2016].

Mikrotitrasyon plakaları statik koşullarda 24 saat ve 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kültürler nazıkçe döküldü ve kuyular 3 kez distile su ile yıkandı. Mikrotitrasyon plakası 30 dakika oda şartlarında kurutuldu. Kuyulara 200 µL ekstraktın 1:8 dilüsyonu eklendi ve 5 dakika muamele edildi. Mikrotitrasyon plakaları 3 kez distile su ile yıkandı. Kuyulara 150 µL % 0.5 kristal viyole çözeltisi (k:s) yüklenip 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Kristal viyole çözeltisi döküldü ve kuyular 3 kez distile su ile yıkandı. Kuyulara 150 µL % 95 etanol çözeltisi yüklendi ve 15 dakika süre ile inkübe edildi. Kuyulardaki çözelti yeni bir plakaya alındı ve 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda absorbansları ölçüldü [Akbas and Cag., 2016].

Ekstraktın biyofilm ortadan kaldırma etkisini kıyaslamak için klor çözeltisi gıda endüstrisinde kullanılan konsantrasyonda (200 ppm) kullanıldı. Klor çözeltisini hazırlamak için sodyum hipoklorit (50000 ppm) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak ekstrakt veya klorla muamele edilmeyen kuyucuklar kullanıldı. Sonuçlar biyofilm ortadan kaldırma oranı (%) olarak hesaplandı.

Biyofilm ortadan kaldırma oranları (%) aşağıdaki formüle göre hesaplandı. (A: Ekstrakt veya klorla muamele yapılmayan kuyuların OD değeri, B: Ekstrakt veya klorla muamele yapılan kuyuların OD değeri, C: Bakteri içermeyen, ekstrakt veya klorla muamele yapılan kuyuların OD değeri)

$$\text{Biyofilm ortadan kaldırma oranı (\%)} = \frac{(A-C)-(B-C)}{(A-C)} \times 100 \quad (3.3)$$

3.2.12. FM Ekstraktının Anti Quorum-Algilama Etkisinin İncelenmesi

FM ekstraktının anti quorum-algilama etkisi *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 bakterisine karşı agar kuyu difüzyonu yöntemi ile tespit edildi [Guzman and Padilla, 2017]. *C. violaceum* LB sıvı besiyerinde 30°C sıcaklığında 150 rpm çalkalama hızında ön kültür inkübasyonuna bırakıldı. Bakterinin yoğunluğu OD₆₀₀ değeri 0.1 olacak şekilde otoklavla sterilizasyon işleminden sonra uygun sıcaklığa

gelen, LB katı besiyeri içerisinde ayarlandı ve karıştırılıp petrilere döküldü. Petriler donduktan sonra agar üzerine 6 mm çapında kuyular açıldı. Açılan kuyulara 40 µL ekstrakt dilüsyonları (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) eklendi. 24 saat 30°C’de inkübasyonun ardından oluşan inhibisyon zon çapları incelendi.

3.2.13. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında tüm deneyler en az üç kez tekrar edildi. İstatistiksel analizler, Microsoft Office, Excel 2016 programı ile belirlendi. *p* değerleri, tek kuyruklu t-testi ile fındık yeşil kabuğu ekstraktlarının kuru madde miktarları ve antimikrobiyal etkinlikleri arasında anlamlı fark olup olmadığı belirlendi. Antimikrobiyal etkileri gentamisin antibiyotiği ile, biyofilm oluşumunun ortadan kaldırma etkinliği ise klor çözeltisi uygulaması ile karşılaştırılarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Ekstraktların Kuru Madde İçeriği ve Ekstraksiyon Verimleri

FM ve FS ekstraktlarının içerdikleri kuru madde miktarları mg mL^{-1} cinsinden hesaplandı. Her bir ekstrakt için en az üç kez kurutma işlemi yapıldı, sonuçların ortalaması alınarak hesaplama yapıldı. Değerlendirmede iki ekstraktın kuru madde miktarları arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). FM ekstraktında $147.0 \pm 10.0 \text{ mg mL}^{-1}$, FS ekstraktında $146.7 \pm 10.2 \text{ mg mL}^{-1}$ kuru madde içeriği tespit edildi (Tablo 4.1).

FM ve FS ekstraktlarının ekstraksiyon verimleri hesaplandı. Analiz her bir ekstrakt için en az üç kez tekrarlandı. FM ekstraktının ekstraksiyon verimi % 40.385, FS ekstraktının ekstraksiyon verimi % 41.56 olarak belirlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.1: FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda (1-1:512 sulandırmalarda) içerdikleri kuru madde miktarları (mg mL^{-1}).

	Ekstraktlar	
	Kuru madde (mg mL^{-1})	
Dilüsyon	FM	FS
1:1	147.0 ± 10.0	146.7 ± 10.21
1:2	73.5 ± 5.00	73.3 ± 5.11
1:4	36.8 ± 2.50	36.7 ± 2.55
1:8	18.4 ± 1.25	18.3 ± 1.28
1:16	9.2 ± 0.63	9.2 ± 0.64
1:32	4.6 ± 0.31	4.6 ± 0.32
1:64	2.3 ± 0.16	2.3 ± 0.16
1:128	1.1 ± 0.08	1.1 ± 0.08
1:256	0.6 ± 0.04	0.6 ± 0.04
1:512	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.02

Tablo 4.2: FM ve FS ekstraktlarının ekstraksiyon verimleri (%).

Ekstraktlar	Ekstraksiyon verimi (%)
FM	40.385
FS	41.56

4.2. Ekstraktların pH Analizi

FM ve FS ekstraktlarının pH değerleri iki farklı sıcaklıkta (30 ve 37°C) ölçüldü. Ölçüm sonucunda elde edilen pH değerleri Tablo 4.3'te verildi. FM ekstraktının pH değerleri 3.68 ve 3.65 olarak ölçüldü. FS ekstraktının pH değerleri 3.85 ve 3.83 olarak belirlendi (Tablo 4.3). Ekstraktların pH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.05$).

Tablo 4.3: FM ve FS ekstraktlarının 30 ve 37°C sıcaklıklardaki pH değeri.

Ekstraktlar	pH	
	Sıcaklık	
	30°C	37°C
FM	3.68	3.65
FS	3.85	3.83

4.3. Ekstraktların Toplam Fenolik İçerikleri

FM ve FS ekstraktlarının toplam fenolik miktar içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlendi. Standart olarak kullanılan gallik asit konsantrasyonlarından elde edilen sonuçlara göre oluşturulan kalibrasyon grafiğine göre ($y=1.732x-0.022$, $R^2=0.9947$) ekstraktların toplam fenolik içerikleri mg GAE g⁻¹ cinsinden hesaplandı. Analiz sonuçlarına göre FM ekstraktında 17.8 ± 1.7 mg GAE g⁻¹, FS ekstraktında 11.9 ± 1.4 mg GAE g⁻¹ fenolik miktar içeriklerinin olduğu belirlendi (Tablo 4.4). İki ekstraktın toplam fenolik miktar içerikleri arasında istatistiki açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).

Tablo 4.4: FM ve FS ekstraktlarının toplam fenolik (mg GAE g⁻¹), toplam flavonoid (mg QE g⁻¹) içerikleri ve antioksidan etkinlikleri (IC₅₀ mg mL⁻¹).

	Ekstraktlar	
	FM	FS
Toplam fenolik içerik (mg GAE g⁻¹)	17.8 ± 1.7	11.9 ± 1.4
Toplam flavonoid içerik (mg QE g⁻¹)	0.4 ± 0.1	2.2 ± 0.1
Antioksidan Etkinlik (IC₅₀ mg mL⁻¹)	0.75 ± 0.05	1.61 ± 0.14

4.4. Ekstraktların Toplam Flavonoid İçerikleri

FM ve FS ekstraktlarının toplam flavonoid içerikleri alüminyum klorür (AlCl₃) yöntemi ile belirlendi. Standart olarak kullanılan kuersetin konsantrasyonlarından elde edilen sonuçlara göre oluşturulan kalibrasyon grafiğine göre ($y=2.465x+0.0278$, $R^2=0.9999$) ekstraktların toplam flavonoid içerikleri mg QE g⁻¹ cinsinden hesaplandı. Analiz sonuçlarına göre FM ekstraktının 0.4 ± 0.1 mg QE g⁻¹, FS ekstraktının 2.2 ± 0.1 mg QE g⁻¹ flavonoid miktar içeriklerinin olduğu belirlendi (Tablo 4.4). İki ekstraktın toplam flavonoid miktar içerikleri arasında istatistiki açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).

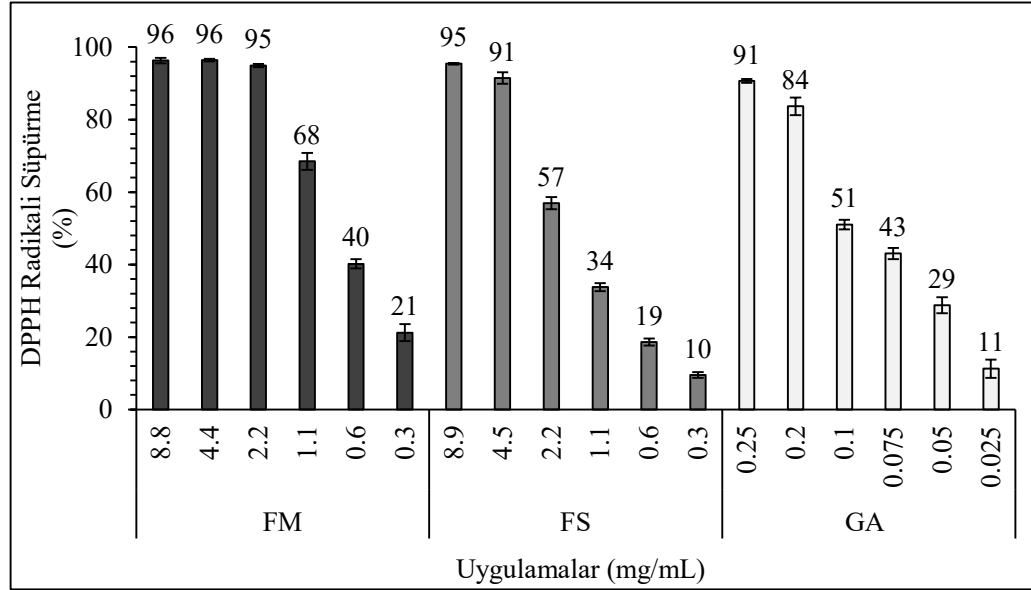
4.5. Ekstraktların Antioksidan Etkinlikleri

FM ve FS ekstraktlarının antioksidan etkinlikleri DPPH radikali süpürme aktivitelerine göre belirlendi. Elde edilen OD₅₁₇ değerleri kontrol ile kıyaslanarak DPPH radikali giderme aktivitesi (%) olarak hesaplandı. FM ekstraktı uygulamasının, DPPH radikali süpürme aktivitesini 1:64 seyreltme oranına (2.3 mg mL⁻¹) kadar % 95 olarak sürdürdüğü gözlemlendi. 1:128, 1:256 ve 1:512 seyreltme oranlarında (sırasıyla

1.1, 0.6, 0.3 mg mL⁻¹) ise DPPH radikali süpürme etkinliğinin sırasıyla % 68, % 40 ve % 21 şeklinde düşüş seyrettiği tespit edildi.

FS ekstraktının 1:16 seyreltme oranına (9.2 mg mL⁻¹) kadar olan ekstrakt uygulamalarında % 95 olmak üzere DPPH radikali süpürme etkinliğini sürdürdüğü görüldü. 1:32 seyreltme oranında bu etkinliğin %91'e düştüğü ve devam eden seyreltme oranlarındaki ekstrakt uygulamalarında % 57, % 34, % 19 ve % 10 şeklinde düşüş görüldüğü gözlemlendi.

Standart olarak kullanılan gallik asit dilüsyonlarının (250-200-100-75-50-25 µg mL⁻¹) DPPH radikali süpürme aktivitesi sırasıyla % 91, % 84, % 51, % 43, % 29 ve % 11 şeklinde gallik asit çözeltisi içeriğindeki bileşik miktarı azalıkça düşüş gösterdi.



Şekil 4.1: FM ve FS ekstraktları ile gallik asitin (GA) (mg mL⁻¹) DPPH radikali süpürme aktiviteleri (%). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

FM ve FS ekstraktlarının ve standart olarak kullanılan gallik asit dilüsyonlarının ortamdaki DPPH radikalinin % 50'sini süpürdüğü konsantrasyonu (IC₅₀) değerleri hesaplandı. FM ekstraktının IC₅₀ değeri 0.75 mg mL⁻¹ olarak, FS ise 1.61 mg mL⁻¹ olarak belirlendi (Tablo 4.3). Gallik asidin ise IC₅₀ değeri 0.08 mg mL⁻¹ olarak belirlendi. Sonuçta FM ekstraktının daha az miktarıyla ortamdaki DPPH radikalinin % 50'sinin süpürüldüğü ve DPPH radikalini süpürme konusunda FS ekstraktından daha iyi bir aktivite sergilediği tespit edildi. İki ekstraktın da gallik asit ile DPPH radikali

süpürme aktiviteleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0.05$). Gallik asitin, FM ve FS ekstraktlarından daha iyi DPPH radikali süpürme aktivitesi gösterdiği belirlendi.

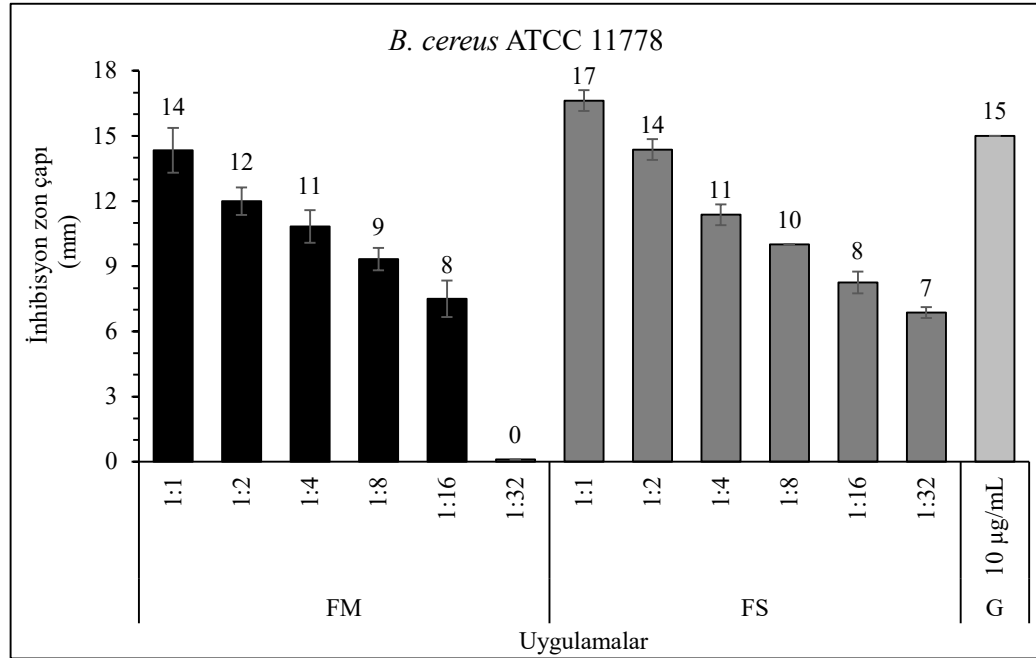
4.6. Ekstraktların Antimikrobiyal Etkileri

4.6.1. Ekstraktların Agar Kuyu Difüzyonu Yöntemi ile Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi

FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının agar kuyu difüzyonu yöntemi ile *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. uberis*, *E. faecalis* bakterileri üzerinde antibakteriyel etkileri incelendi. Ön kültür işlemleri tamamlanan ve OD₆₀₀ değerleri 0.1'e denk gelecek şekilde yoğunlukları ayarlanan bakteri kültürlerinden 100 µL alınarak LB-A katı besiyerine ekim yapıldı. Ekim sonrası agar üzerinde açılan 6 mm çapındaki kuyulara 40'ar µL farklı konsantrasyonlarda ekstrakt çözeltileri (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) yüklendi. İnkübasyon sonrasında oluşan zon çapları kuyu çapı (6 mm) dahil edilerek hesaplandı. Kontrol olarak *Enterococcus faecalis* bakterisi hariç bakteriler için 10 µg mL⁻¹ [Selvadoss et al., 2018] *E. faecalis* bakterisi için 100 µg mL⁻¹ gentamisin antibiyotiği kullanılarak ekstraktların antimikrobiyal etkisi gentamisin antibiyotisinin etkisi ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Ayrıca ekstraktlarla aynı evaporasyon işlemi uygulanan ve sadece organik çözücü (% 80 metanol) kullanılarak elde edilen çözeltilerin antimikrobiyal etkisinin olmadığı ve hazırlanan ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin içerdikleri kuru maddeki biyoaktif bileşiklerden kaynaklandığı ve böylece metanolün evaporasyon sırasında tamamen uçtuğu belirlendi.

FM ve FS ekstraktlarının *B. cereus* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde; FM ekstraktı ile 14-8 mm arası, FS ekstraktı ile 17-7 mm arası inhibisyon zon çapları oluştuğu belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin antibiyotisinin (10 µg mL⁻¹) 15 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu saptandı. Ekstraktların en düşük inhibisyon zon çapları sırasıyla 1:16 oranında seyreltmede (9.2 mg mL⁻¹) 8 mm ve 1:32 (4.6 mg mL⁻¹) oranında seyreltmede 7 mm olarak görüldü. FS ekstraktının seyreltme yapılmadan uygulanmasının gentamisin antibiyotikinden daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi ($p<0.05$). FM ekstraktının

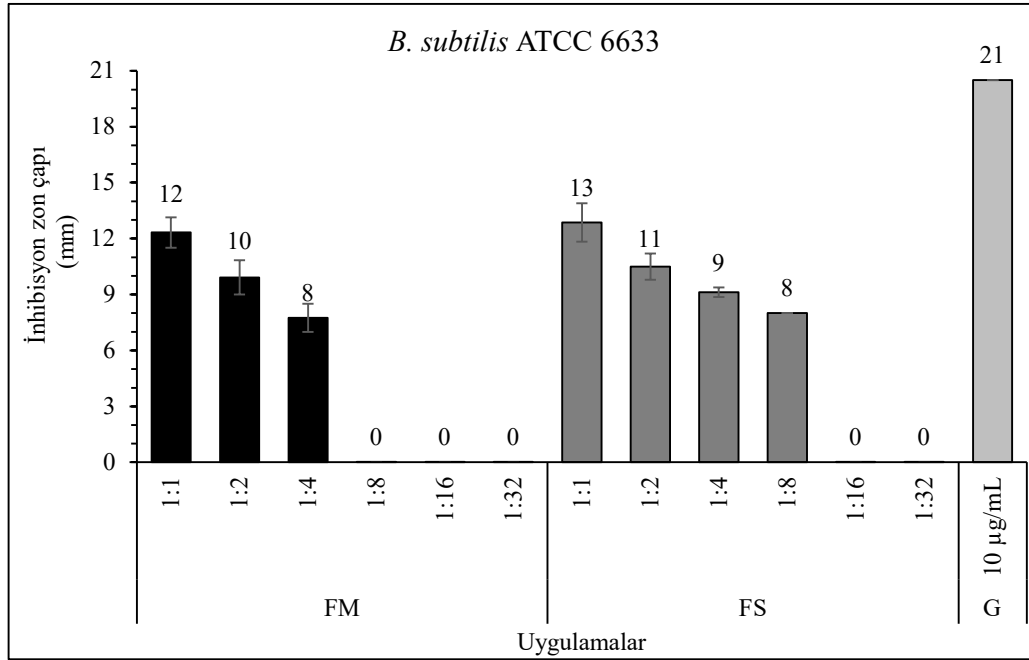
seyreltme yapılmadan uygulanmasının gentamisin antibiyotiğine yakın antimikrobiyal etki gösterdiği görüldü ($p>0.05$) (Şekil 4.2). FS ve FM ekstraktlarının *B. cereus* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).



Şekil 4.2: FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) *B. cereus* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin).

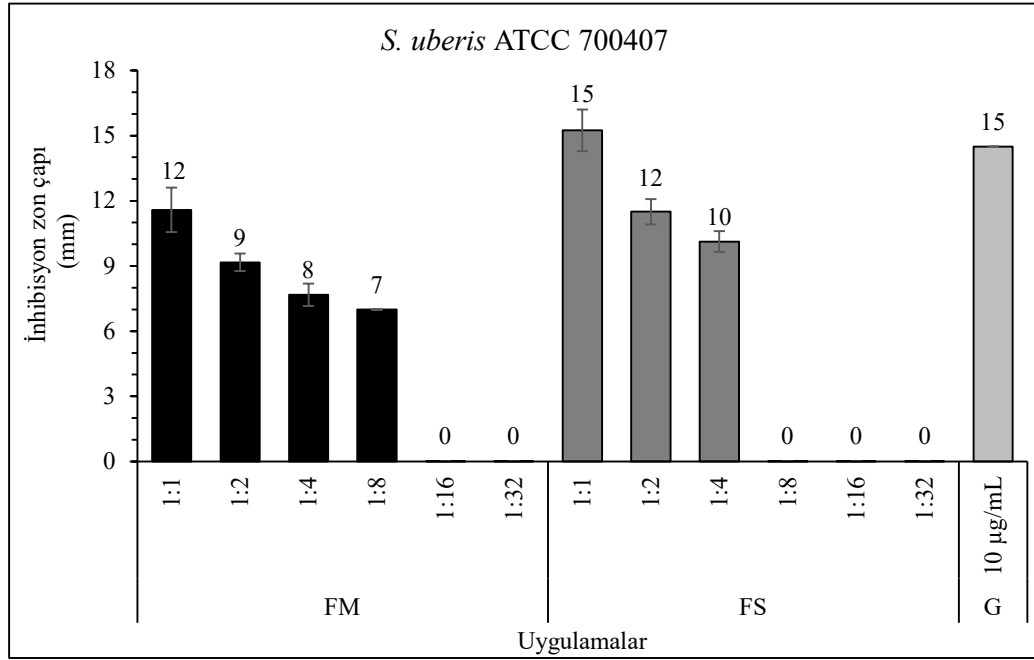
Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

FM ve FS ekstraktlarının *B. subtilis* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde; FM ekstraktı ile 12-8 mm arası, FS ekstraktı ile 13-8 mm arası inhibisyon zon çapı olduğu belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin antibiyotiğinin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) 20.5 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu saptandı. Ekstraktlar ile belirlenen düşük inhibisyon zon çapları sırasıyla FM ekstraktında 1:4 oranında seyreltmede (36.8 mg mL^{-1}) 8 mm ve FS ekstraktında 1:8 oranında seyreltmede (18.3 mg mL^{-1}) 8 mm olarak görüldü (Şekil 4.3). FS ve FM ekstraktlarının *B. subtilis* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).



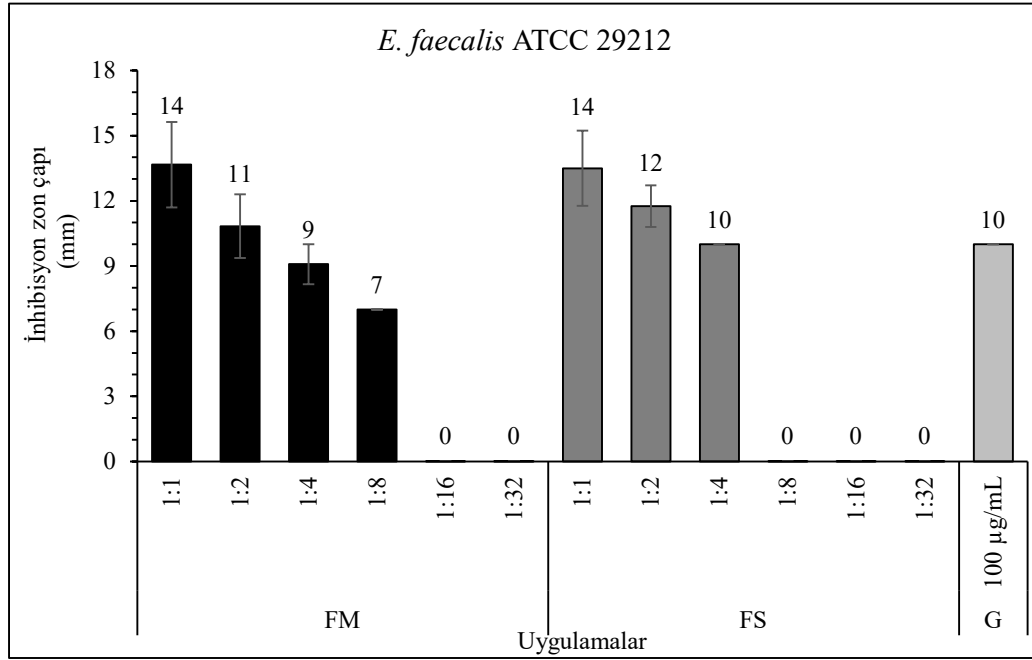
Şekil 4.3: FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) *B. subtilis* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

FM ve FS ekstraktlarının *S. uberis* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde; FM ekstraktı ile 12-7 mm arası, FS ekstraktı ile 15-10 mm arası inhibisyon zon çapı olduğu belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin antibiyotiğinin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) 15 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu saptandı. Ekstrakt uygulamaları ile elde edilen en düşük inhibisyon zon çapları sırasıyla FM ekstraktında 1:8 oranında seyreltmede (18.4 mg mL^{-1}) 7 mm ve FS ekstraktında 1:4 oranında seyreltmede (36.7 mg mL^{-1}) 10 mm olarak görüldü. FS ekstraktının seyreltme yapılmadan uygulanmasının gentamisin antibiyotiğine yakın/eşit antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi ($p>0.05$) (Şekil 4.4). İki ekstrakt uygulamasının *S. uberis* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri arasında istatistiki açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0.05$).



Şekil 4.4: FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) *S. uberis* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

FM ve FS ekstraktlarının *E. faecalis* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelendiğinde; FM ekstraktı ile 14-7 mm arası, FS ekstraktı ile 14-10 mm arası inhibisyon zon çapı olduğu belirlendi. Kontrol olarak kullanılan gentamisin antibiyotiğinin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) 10 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu saptandı. Ekstrakt uygulamaları ile ölçülen en düşük inhibisyon zon çapları sırasıyla FM ekstraktında 1:8 oranında seyreltmede (18.4 mg mL^{-1}) 7 mm ve FS ekstraktında 1:4 oranında seyreltmede (36.7 mg mL^{-1}) 10 mm olarak görüldü. FM ve FS ekstraktlarının seyreltme yapılmadan uygulanmasının gentamisin antibiyotiğinden daha fazla antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.5). İki ekstrakt uygulamasının *E. faecalis* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri arasında istatistiki açıdan anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$).



Şekil 4.5: FM ve FS ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) *E. faecalis* bakterisi üzerindeki antimikrobiyal etkileri (G: Gentamisin). Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

FM ve FS ekstraktları için toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik, antioksidan etkinlik ve antimikrobiyal etkinliğin agar kuyu difüzyonu yöntemi ile belirlenmesi sonucu elde edilen verilerde FM ekstraktının daha zengin fenolik ve flavonoid içeriğe sahip olduğu, daha yüksek antioksidan etkinlik gösterdiği ve FS ekstraktı ile antimikrobiyal etkilerinin benzer görülmesi sonucu tez çalışmasına FM ekstraktının detaylı antimikrobiyal etkinliği için minimal inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi, antibiyofilm etkisinin ve anti quorum-algılama etkisinin belirlenmesi çalışmaları ile devam edildi.

4.6.2. FM ekstraktının Minimal İnhibisyon Konsantrasyonlarının ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

FM ekstraktının, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. uberis*, *E. faecalis* bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkinliği kapsamında minimal inhibisyon konsantrasyonları belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda ekstrakt çözeltileri (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 ve 1:512) ile aynı hacimle final yoğunlukları OD₆₀₀ değerleri 0.1 olacak şekilde ayarlanan bakteriler ile 96 kuyulu mikrotirasyon plakası kuyularına yüklenerek 24 saat statik koşullarda inkübasyonu sağlandı. İnkübasyonun ardından kuyulardan alınarak FTS içerisinde seyreltmeler yapılarak hazırlanan bakteri solüsyonları LB katı besiyerine ekilerek 24 saat statik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından canlı koloni sayımı yapıldı. Petrilere oluşan koloni sayısının 30-300 arasında olmasına dikkat edildi [Breed and Dotterer, 1916]. Ekstrakt uygulaması yapılmayan kontrol grubundan elde edilen sonuçlar ile ekstraktın bakteriler üzerinde inhibisyon etkisi (%) hesaplandı. Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) bir mikroorganizmanın büyümesinin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon, minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) ise bir mikroorganizmanın büyümesinin önlendiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlandı [Andrews, 2001]. Ekstraktın bakteriler üzerinde MİK ve MBK değerleri bu tanımlara uygun olarak belirlendi.

FM ekstraktının *E. faecalis* bakterisi üzerinde bakterisidal etkinliğinin (%100 inhibisyon) 2.3 mg mL⁻¹ (1:64) konsantrasyonuna kadar devam ettiği tespit edildi. Ekstraktın 1.1 mg mL⁻¹ (1:128) konsantrasyonda % 88.4 inhibisyon etkinliği gösterdiği gözlemlendi. Ekstraktın *E. faecalis* bakterisi üzerinde MİK değeri % 7.4 inhibisyon oranıyla 0.6 mg mL⁻¹ (1:256) olarak belirlendi (Tablo 4.5). FM ekstraktının *E. faecalis* bakterisinin % 50 % 70 ve % 90'ını inhibe ettiği konsantrasyonlar (MİK₅₀-MİK₇₀ ve MİK₉₀) sırasıyla 0.81, 1.15 ve 1.63 mg mL⁻¹ olarak belirlendi (Şekil 4.6).

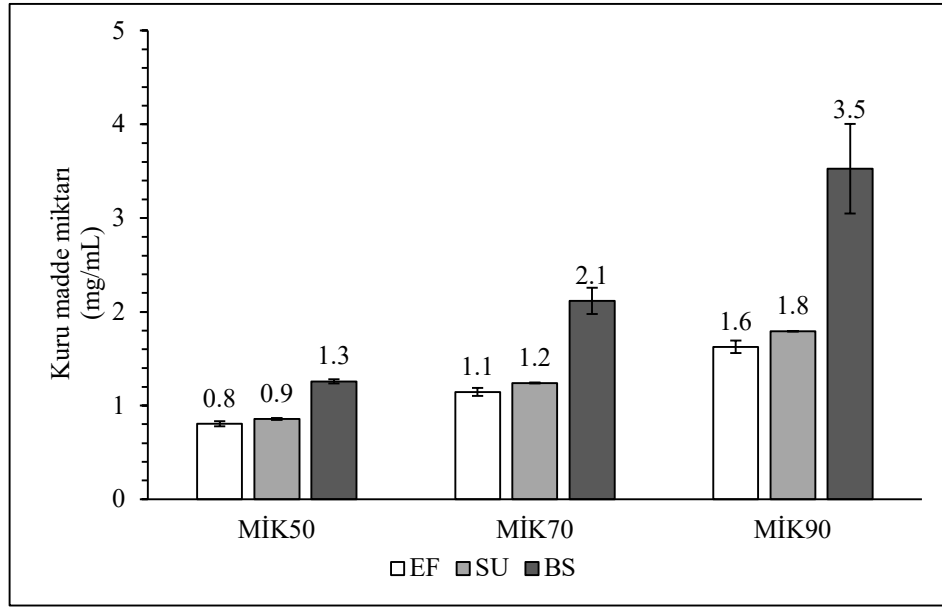
FM ekstraktının *S. uberis* bakterisi üzerinde bakterisidal etkinliğinin 2.3 mg mL⁻¹ (1:64) konsantrasyonuna kadar devam ettiği tespit edildi. Ekstraktın 1.1 mg mL⁻¹ (1:128) konsantrasyonda % 72.8 inhibisyon etkinliği gösterdiği gözlemlendi. Ekstraktın *S. uberis* bakterisi üzerinde MİK değeri % 9.1 inhibisyon oranıyla 0.6 mg mL⁻¹ (1:256) olarak belirlendi (Tablo 4.5). FM ekstraktının *S. uberis* bakterisinin % 50 % 70 ve % 90'ını inhibe ettiği konsantrasyonlar (MİK₅₀-MİK₇₀ ve MİK₉₀) sırasıyla 0.86, 1.24 ve 1.63 mg mL⁻¹ olarak belirlendi (Şekil 4.6).

FM ekstraktının *B. subtilis* bakterisi üzerinde bakterisidal etkinliğinin 4.6 mg mL⁻¹ (1:32) konsantrasyonuna kadar devam ettiği tespit edildi. Ekstraktın 1.1 mg mL⁻¹ (1:128) konsantrasyonda % 11.3 inhibisyon etkinliği gösterdiği gözlemlendi. Ekstraktın *B. subtilis* bakterisi üzerinde MİK değeri % 2.7 inhibisyon oranıyla 0.3 mg mL⁻¹ (1:512) olarak belirlendi (Tablo 4.5). FM ekstraktının *B. subtilis* bakterisinin % 50 % 70 ve % 90'ını inhibe ettiği konsantrasyonlar (MİK₅₀-MİK₇₀ ve MİK₉₀) sırasıyla 1.26, 2.12 ve 3.57 mg mL⁻¹ olarak belirlendi (Şekil 4.6).

FM ekstraktının *B. cereus* bakterisine karşı ekstraktın direkt uygulamasının petriye ekilip 24 saat inkübe edilmesinin ardından bakteriyel üreme görülmesi nedeniyle MBK değeri belirlenemedi. Ekstraktın direkt uygulamasının *B. cereus* bakterisinin büyümesini % 53.4 oranında inhibe ettiği tespit edildi. Ekstraktın *B. cereus* bakterisi üzerinde MİK değeri % 7.5 inhibisyon oranıyla 0.6 mg mL⁻¹ (1:256 seyreltme oranı) olarak belirlendi (Tablo 4.5). FM ekstraktının *B. cereus* bakterisinin % 50'sini inhibe ettiği konsantrasyon (MİK₅₀) 36.8 mg mL⁻¹ olarak belirlendi (Şekil 4.6).

Tablo 4.5: FM ekstraktının EF: *E. faecalis*, SU: *S. uberis*, BS: *B. subtilis* ve BC: *B. cereus* bakterileri üzerinde Minimal İnhibisyon (MİK, MİK₅₀, MİK₇₀ ve MİK₉₀, mg mL⁻¹) ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonları (MBK) (mg mL⁻¹).

Suşlar	MİK (mg mL ⁻¹)	MİK ₅₀ (mg mL ⁻¹)	MİK ₇₀ (mg mL ⁻¹)	MİK ₉₀ (mg mL ⁻¹)	MBK (mg mL ⁻¹)
EF	0.6	0.81	1.15	1.63	2.3
SU	0.6	0.86	1.24	1.79	2.3
BS	0.3	1.26	2.12	3.57	4.6
BC	0.6	36.8	-	-	-



Şekil 4.6: FM ekstraktının EF: *E. faecalis*, SU: *S. uberis* ve BS: *B. subtilis* bakterileri üzerinde MİK₅₀, MİK₇₀ ve MİK₉₀ (mg mL⁻¹) değerleri. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

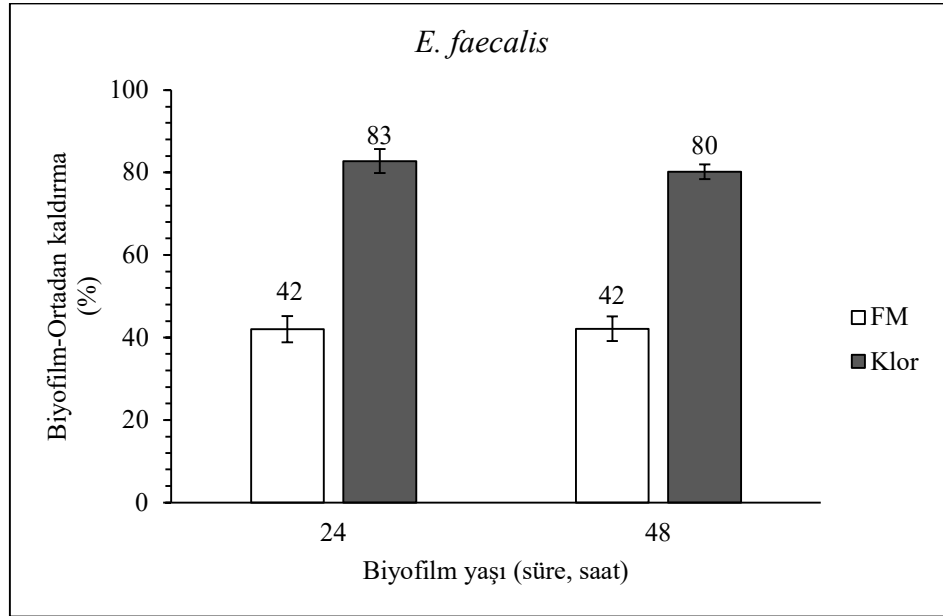
4.7. FM Ekstraktının Biyofilm Oluşumunu Ortadan Kaldırma Etkinliğinin Belirlenmesi

E. faecalis bakterisini steril 96 kuyulu mikrotitrasyon plakasında, % 2 glukoz içeren TSB besiyeri içerisinde, 37°C sıcaklıkta 24 ve 48 saat boyunca statik koşullar altında inkübe edilerek biyofilm oluşumu sağlandı. Oluşan biyofilmin ortadan kaldırılması için, FM ekstraktı (1:8) ve klor çözeltisi (200 ppm) 5 dakika süreyle uygulandı. Uygulama sonucunda kristal viyole çözeltisi ile 15 dakika inkübasyon yapıldı. Ekstrakt veya klor uygulaması yapılmayan kuyulardan elde edilen sonuçlar kontrol olarak kullanıldı.

24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda oluşan genç ve olgun biyofilmlerin ortadan kaldırılmasında FM ekstraktı (1:8) ve klor çözeltisinin (200 ppm) etkileri karşılaştırıldı.

E. faecalis bakterisinin oluşturduğu 24 ve 48 saatlik biyofilmleri üzerinde FM ekstraktının 1:8 konsantrasyonunun biyofilmleri aynı oranda (%42) ortadan kaldırdığı gözlemlendi. Klor çözeltisinin ise *E. faecalis* bakterisinin oluşturduğu 24 saatlik biyofilmi % 83 oranında ve 48 saatlik biyofilmi ise % 80 oranında ortadan kaldırdığı saptandı ($p>0.05$) (Şekil 4.7). Ekstrakt ve klor çözeltisinin *E. faecalis* bakterisinin 24

ve 48 saat inkübasyon sonucu oluşturduğu biyofilmlerinin ortadan kaldırılma oranları (%) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi ($p<0.05$).

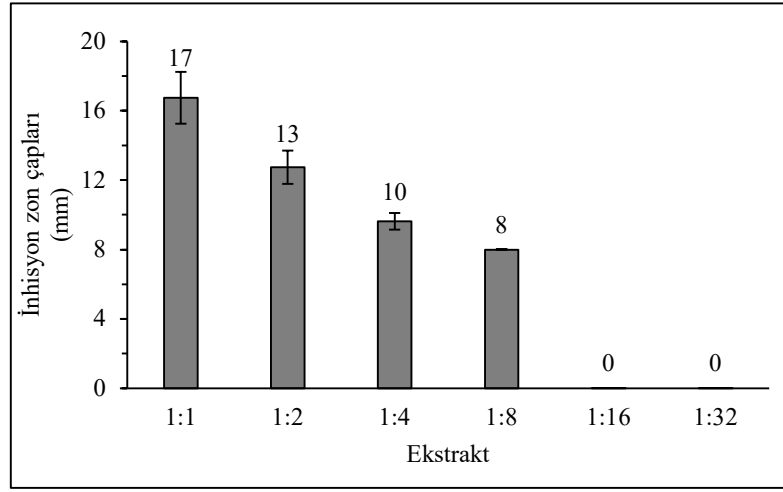


Şekil 4.7: *E. faecalis* bakterisinin 24 ve 48 saat inkübasyon sonucu oluşan biyofilmlerinin FM ekstraktı (1:8) ve Klor çözeltisi (200 ppm) uygulanması ile ortadan kaldırılma (%) oranları. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.

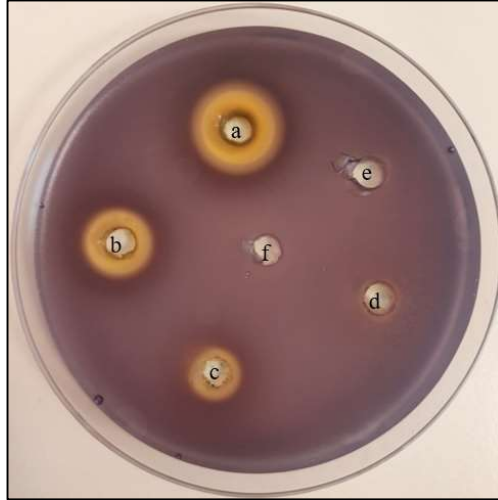
4.8. FM Ekstraktının Anti Quorum-Algılama Etkisinin Belirlenmesi

FM ekstraktının anti quorum-algılama etkinliğinin incelenmesi amacıyla *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 bakterisi üzerinde agar kuyu difüzyonu yöntemi uygulandı. Sterilizasyon işleminden sonra uygun sıcaklığa gelen LB-A katı besiyeri içerisinde bakterinin yoğunluğu OD₆₀₀ değeri 0.1 olacak şekilde ayarlanarak karıştırılıp petrilere döküldü. Dökme ekim işleminden sonra katılaşan petrilerin üzerine 6 mm çapında kuyular açıldı. Açılan kuyulara 40 µL farklı konsantrasyonlarda ekstrakt çözeltileri (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) yüklendi. İnkübasyon sonrasına oluşan zon çapları kuyu çapı (6 mm) dahil edilerek hesaplandı.

Sonuçlar incelendiğinde ekstraktın seyreltilmeden uygulamasının (1:1, 147 mg mL⁻¹) 17 mm renksiz opak zon çapı oluşturduğu belirlendi. Ekstrakt uygulaması sonucu oluşan en düşük renksiz opak zon çapı ise 1:8 seyreltme konsantrasyonunda (18.4 mg mL⁻¹) 8 mm olarak tespit edildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: FM ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) *C. violaceum* bakterisi üzerinde etkileri. Her değer en az üç tekrarın ortalamasıdır ve standart sapmalar hata çubukları ile gösterilmektedir.



Şekil 4.9: FM ekstraktının farklı konsantrasyonlarının (a: 1:1, b: 1:2, c: 1:4, d: 1:8, e: 1:16 ve f: 1:32) *C. violaceum* bakterisi üzerinde etkileri.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Antibiyotiklerin yanlış reçete edilmesi ile bilinçsiz kullanımı bakterilerin düşük antibiyotik dozajına maruz kalarak direnç geliştirmeleriyle sonuçlanmıştır. Tüm biyoteknolojik gelişmelere rağmen antibiyotik dirençli bakteriler sebebiyle tedavi edilemeyen bulaşıcı hastalıklar gelişmekte olan ülkelerde ölüm sebebi olarak ikinci sırada yer almaktadır. Dünya sağlık örgütü (WHO) antibiyotik direncinin halk sağlığı için küresel çapta önemli bir tehdit boyutuna ulaştığını açıklamıştır [Abadi et al., 2019]. Gıda kaynaklı patojenlerin insanları enfekte etmesi sonucu gıda zehirlenmesi, ishalleri bir hastalıkla atlatılsada bağışıklığı düşük bireylerde daha ciddi sonuçlar doğurabilmektedir [White et al., 2002]. Dolayısıyla antibiyotik direncine sahip gıda patojenleri halk sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadır. Antibiyotiklere alternatif doğal antimikrobiyal ajanların araştırılması bu sebeplerden dolayı giderek önem kazanmıştır.

Doğal bileşikler ve bitkisel ekstraktlar antimikrobiyal ajan arayışında önemli bir kaynaktır [Guglielmi et al., 2020]. Meyve ve sebzeler, kendilerinin ve kabuklarının içerdikleri fitokimyasal maddelerin varlığı nedeniyle antioksidan ve antimikrobiyal aktivite göstermektedirler [Güzel ve Akpınar, 2019]. Literatürde farklı meyve kabukları atıklarından elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur. Örneğin portakal ve ananas kabuğu atıklarından elde edilen ekstraktların antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür [Gunwantrao et al., 2016]. Nar kabuğu atığından elde edilen ekstraktın *B. subtilis*, *B. cereus* ve *E. faecalis* bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır [Balaban et al., 2021a].

Kuruyemişlik meyvelerin yaş kabuklarından elde edilen ekstraktlarla çalışmalar yapılmaktadır. Türkiye’de en çok üretimi yapılan kuruyemişlerden biri olan cevizin yan ürünlerinin fenolik bileşikler içerdiği bilinmektedir ve kozmetik ve eczacılıkta kullanılmak üzere çalışmalar yapılmaktadır. Bir çalışmada ceviz yeşil kabuğundan ekstrakt elde edilmiştir ve bu ekstraktın antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir [Fernández-agulló et al., 2013]. Badem yeşil kabuklarından ekstrakt elde edilen bir çalışmada ekstraktın antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [Murathan et al., 2020].

Bu tez çalışmasında fındık yeşil kabuklarından metanol (FM) ve su (FS) aracılığıyla ekstraktlar elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktların içerdiği kuru madde miktarı mg mL^{-1} cinsinden hesaplanmıştır. FM ekstraktı (147 mg mL^{-1}) ile FS ekstraktının (146.7 mg mL^{-1}) kuru madde içerikleri birbirine benzer olarak değerlendirilmiştir. FM ve FS ekstraktlarının ekstraksiyon verimi hesaplanmıştır. İki ekstraktın ekstraksiyon veriminin (FM: % 40.39, FS: % 41.56) benzer olduğu sonucuna varılmıştır.

FM ve FS ekstraktlarının bakterilerin maruz kaldığı sıcaklık dereceleri olan 30°C ve 37°C değerlerde pH analizi gerçekleştirilmiştir. FM ekstraktının pH değeri sıcaklığa göre sırasıyla 3.68 ve 3.65 olarak, FS ekstraktının pH değeri sıcaklığa göre sırasıyla 3.85 ve 3.83 olarak ölçülmüştür. FM ve FS ekstraktlarının pH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücünün elde edilen ekstraktın pH değeri üzerinde etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Bu etkinin ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücünün açığa çıkardığı bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ekstrakt ve besiyeri karışımında pH değerinin 7'ye yakın olduğu gözlemlenmiş olup bakterinin ekstrakta maruz kaldığı ortamda asidik pH olmadığından antimikrobiyal etkinin ekstraktların asidik olmasından kaynaklanmadığı düşünülmektedir.

FM ve FS ekstraktlarının toplam fenolik, toplam flavonoid içerikleri ve DPPH radikali süpürme aktiviteleri incelenmiştir. FM ve FS ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri sırasıyla 17.8 ± 1.7 ve $11.9 \pm 1.4 \text{ mg GAE g}^{-1}$ olarak, toplam flavonoid içerikleri sırasıyla 0.4 ± 0.1 ve $2.2 \pm 0.1 \text{ mg QE g}^{-1}$, DPPH radikali süpürme etkinlikleri 0.72 ve 1.68 mg mL^{-1} (IC_{50}) olarak tespit edilmiştir. FM ekstraktının içeriğinin FS ekstraktından daha zengin olduğu sonucuna varılmıştır. Ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücünün ekstrakt içerisindeki bileşenlere etki ettiği düşünülmektedir.

Literatürde farklı ekstraksiyon yöntemleri ve farklı çözücüler kullanılarak elde edilen fındık yeşil kabuğu ekstraktlarının zengin fenolik içeriğe sahip olduğu görülmüştür (Tablo 2.4). Alasalvar ve ekibi tarafından % 80 etanol ve % 80 aseton çözücülerini kullanılarak elde edilen fındık yeşil kabuğu ekstraktlarının fenolik içeriği sırasıyla 156 ± 1 ve $201 \pm 2 \text{ mg CE g}^{-1}$ olarak belirlenmiştir [Alasalvar et al., 2006]. İlgili başka bir çalışmada, 1 mL farklı çözücüler içerisinde 240 mg fındık yeşil kabuğunun karıştırılıp 70°C sıcaklıkta 45 dakika bekletilmesiyle elde edilen ekstraktlar içerisinde en yüksek fenolik ve flavonoid içeriği % 80 metanol çözücüsü

kullanılarak elde edilen ekstrakt ile sağlanmıştır (sırasıyla 10.23 ± 0.14 mg CE g⁻¹, 3.82 ± 0.14 mg CE g⁻¹) [Cabo et al., 2020]. Farklı bir çalışmada, 100 gram findık yeşil kabuğu ve 200 mL farklı çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktlar arasındaaseton çözücüsü kullanılarak sokslet yöntemi ile elde edilen ekstraktın ($IC_{50} = 44.28 \pm 3.66$ µg mL⁻¹) referans olarak kullanılan α-tokoferol bileşiğinden ($IC_{50} = 7.31 \pm 0.17$ µg mL⁻¹) fazla DPPH radikali süpürme aktivitesi gösterdiğı görölmüştür. Ayrıca, su-aseton çözücüsüyle (1:1) birkaç gün bekletilerek yapılan ekstraksiyon işleminde 273.56 ± 10.12 mg GAE g⁻¹ toplam fenolik içerik ve 10.61 ± 3.96 mg QE g⁻¹ toplam flavonoid içeriğın diğerk ekstraktlardan yüksek olduğı belirlenmiştir [Kurtça, 2021]. Oğuzkan ve arkadaşlarının (2016)'un yaptığı bir çalışmada ise, 400 mg findık yeşil kabuğunun 5 mL %80 metanol veya %80 aseton çözücüleri ile karıştırılarak 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik içerikleri sırasıyla 12.08 ve 16.83 mg GAE g⁻¹ olarak tespit edilmiştir [Sürek ve Büyükkileci, 2018]. İlâveten, 150 mL metanol içerisinde 100 gram findık kabuğunun 72 saat karıştırılmasıyla elde edilen ekstraktın yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğı görölmüştür [Oğuzkan vd., 2016].

Tez çalışmasında elde edilen findık yeşil kabuğu ekstraktlarının literatürdeki diğerk findık yeşil kabuğu ekstraktlarına benzer şekilde zengin fenolik içeriğe sahip olduğı ve antioksidan etki gösterdiğı sonucuna varılmıştır [Alasalvar et al., 2006; Shahidi et al., 2007; Oğuzkan vd., 2016; Sürek ve Büyükkileci, 2018; Cabo et al., 2020; Kurtça, 2020]. FM ve FS ekstraktlarının, ekstraksiyon işlemi sırasında kullanılan çözücünün ve ekstraksiyon süresinin ekstraktın içeriklerinin farklı olmasına neden olduğı sonucuna varılmıştır.

Tez alışması kapsamında FM ve FS ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi agar kuyu difüzyonu yöntemi ile incelenmiştir. FM ve FS ekstraktlarının *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. uberis* ve *E. faecalis* olmak üzere 4 farklı Gram pozitif bakteri üzerinde antimikrobiyal etkisi incelenmiştir ve gentamisin antibiyotiğı uygulamaları ile karışlaştırılmıştır.

B. cereus bakterisine karşı 10 µg mL⁻¹ gentamisin antibiyotiğinin uygulaması sonucu (15 mm) FS ekstraktının direkt uygulamasından (17 mm) daha düşük fakat FM ekstraktının direkt uygulamasına (14 mm) yakın etki gösterdiğı belirlenmiştir. FS ekstraktının 1:2 oranda seyreltilerek uygulamasının gentamisine yakın etki gösterdiğı (14 mm) belirlenmiştir. FS ekstraktının 1:32 konsantrasyonda uygulamasında

antimikrobiyal etki gözlenirken (7 mm), FM ekstraktının aynı oranda uygulamasında antimikrobiyal etki gözlenmemiştir. FM ve FS ekstraktlarının 1:16 konsantrasyonda uygulamalarının eş sayılabilecek etki gösterdiği (8 mm) tespit edilmiştir.

10 µg mL⁻¹ gentamisin antibiyotiğinin *B. subtilis* bakterisine karşı uygulaması sonucu (21 mm) FS ve FM ekstraktlarının direkt uygulamasından (FS:13 mm, FM: 12 mm) daha yüksek etki gözlenmiştir. FM ve FS ekstraktlarının 1:16 ve 1:32 konsantrasyonda uygulamaları sonucu antimikrobiyal etki saptanmamıştır. FS ekstraktının 1:8 oranda seyreltilerek uygulamasında 8 mm inhibisyon zon çapı görülürken FM ekstraktının aynı oranda seyreltilerek uygulamasında inhibisyon zon çapı tespit edilmemiştir, 1:4 konsantrasyonda uygulamasında 8 mm inhibisyon zon çapı tespit edilmiştir.

S. uberis bakterisine karşı 10 µg mL⁻¹ gentamisin antibiyotiğinin uygulaması sonucu (15 mm) FM ekstraktının direkt uygulamasından daha yüksek (12 mm), FS ekstraktının direkt uygulamasından daha düşük (15 mm) antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. FM ekstraktının 1:8 konsantrasyonda uygulaması sonucu 7 mm inhibisyon zon çapı gözlenirken, FS ekstraktının aynı konsantrasyonda uygulaması sonucu herhangi bir etki gözlenmemiştir. FS ekstraktının 1:4 konsantrasyonda uygulanması (10 mm) FM ekstraktı uygulamasından (8 mm) daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür.

100 µg mL⁻¹ gentamisin antibiyotiğinin *E. faecalis* bakterisine karşı uygulaması sonucu (10 mm) FM ve FS ekstraktlarının direkt uygulamalarından daha düşük (14 mm, 14 mm) etki gösterdiği belirlenmiştir. FM ekstraktının 1:8 konsantrasyonda uygulaması sonucu 7 mm inhibisyon zon çapı gözlenirken, FS ekstraktının aynı konsantrasyonda uygulaması sonucu herhangi bir etki gözlenmemiştir. FS ekstraktının 1:4 konsantrasyonda uygulanması (10 mm) FM ekstraktı uygulamasından (9 mm) daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür.

Sonuçta FM ekstraktı için en yüksek antimikrobiyal etki *B. cereus* ve *E. faecalis* bakterileri üzerinde (14 mm) görülmüştür. FS ekstraktı için en yüksek antimikrobiyal etki *B. cereus* bakterisi üzerinde (17 mm) gözlenmiştir. Uygulanan ekstrakt konsantrasyonu azaldıkça inhibisyon zon çapının azaldığı görülmüştür.

FM ve FS ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri ön denemelerde *Escherichia coli* bakterisi üzerinde test edildiğinde inhibisyon zon çapı gözlenmemiştir. Literatürde farklı bitkisel ekstraktların antimikrobiyal etkisinin incelendiği

Çalışmalarda bu tez çalışmasına benzer şekilde Gram pozitif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki görülen fakat Gram negatif bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki gözlenmeyen çalışmalar mevcuttur [Erdoğrul, 2002; nal, 2006; Biswas et al., 2013; Mir et al., 2020]. Antimikrobiyal etkinlikte gözlemlenen bu farklılığın sebebinin Gram pozitif ve Gram negatif bakteri hücreleri arasındaki yapısal farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Gram negatif bakteriler peptidoglikan yapısının üzerinde yer alan bir dış zara sahiptir. Bu dış zar proteinler, fosfolipitler ve lipopolisakkaritler içerir ve dış ortamı periplazmadan ayırır [Beveridge, 1999]. Gram pozitif bakterilerde bu dış zar bulunmaz. Gram pozitif bakterilerde bulunan peptidoglikan tabakası Gram negatif bakterilerdekinden daha kalındır [Rohde, 2019]. Gram negatif bakterilerin yapısındaki dış zar bir nevi bariyer görevi yaparak bakterinin antimikrobiyal ajanlara karşı dayanıklılığını arttırmaktadır [Miller, 2016]. Yapılan tez çalışmasında ekstrakt uygulamaları sonucu Gram pozitif bakteri türlerine karşı antimikrobiyal etki görülürken Gram negatif bakteri türüne karşı görülmemesinin bu bakterilerin hücre yapılarındaki farklardan dolayı olabileceği düşünülmektedir.

Oğuzkan ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada, 150 mL metanol çözücüsü içerisinde 100 gram fındık yeşil kabuğu atığı konularak 72 saat karıştırılmıştır. Sonuçta elde edilen ekstraktın antimikrobiyal aktivtesi agar kuyu difüzyonu yöntemiyle değerlendirilmiştir. *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis* zerinde inhibisyon zon çapları sırasıyla; 21, 26, 0, 25, 0, 25, 27 ve 24 mm (kuyu çapı 6 mm) olmak üzere bu ekstraktın antimikrobiyal etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Kontrol olarak kullanılan ampisilin antibiyotiğinin kullanılması ile ise sırasıyla 26, 0, 15, 27, 25, 0, 35, 31 mm olmak üzere inhibisyon zon çapları oluştuğu gözlenmiştir [Oğuzkan vd., 2016]. Bu alışma genel olarak değerlendirildiğinde elde edilen fındık yeşil kabuk ekstraktının test edilen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışmasına paralel şekilde *E. coli* bakterisi üzerinde antimikrobiyal etki görülmemiştir. *E. faecalis* ve *B. subtilis* bakterilerinde bu tez çalışmasında elde edilenden daha fazla inhibisyon zon çapları elde etmişlerdir. Bu durumun sebebinin ekstraksiyon yöntemindeki farklılıktan ve dolayısı ile elde edilen ekstraktların biyoaktif içeriklerinin farklılıklarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ancak, bahsedilen çalışmada fazla miktarda fındık yeşil kabuğunun (100 gram) kullanılması

ve ekstraksiyon işleminin uzun sürmesi (72 saat) dolayısıyla tez çalışmasında kullanılan daha az miktarda fındık kabuğu (20 gram) ile kısa sürede (30 dakika) gerçekleştirilen ve antimikrobiyal etkinlik sergileyen ekstraktların kolay elde edilen, ucuz maliyetli ve kısa süreli bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

FM ekstraktının *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. uberis* ve *E. faecalis* bakterileri üzerinde minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonu (MBK) belirlenmiştir. MİK değeri bakteri büyümesinin inhibe olduğu en düşük konsantrasyon olarak, MBK değeri ise bakteri üremesinin tamamen engellendiği en düşük konsantrasyon olarak belirlenmiştir. *B. cereus* (% 7.5 inhibisyon oranı), *S. uberis* (% 9.1) ve *E. faecalis* (% 7.4) bakterileri için MİK değeri 0.6 mg mL⁻¹ (1:256) olarak belirlenirken *B. subtilis* bakterisi (% 2.7) için 0.3 mg mL⁻¹ (1:512) olarak tespit edilmiştir. FM ekstraktının direkt uygulaması *B. cereus* bakterisi üzerinde bakterisidal etkiye sahip olmamış ve bakteri büyümesini % 53.4 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu yüzden *B. cereus* bakterisine karşı ekstrakt uygulamasının MBK değeri belirlenememiştir. *E. faecalis* ve *S. uberis* bakterileri için MBK değeri 2.3 mg mL⁻¹ (1:64) olarak, *B. subtilis* bakterisi için 4.6 mg mL⁻¹ (1:32) olarak belirlenmiştir. Bakterilerin % 50, % 70 ve % 90 oranlarında inhibe oldukları konsantrasyonlar hesaplanmıştır. MİK₅₀, MİK₇₀ ve MİK₉₀ değerleri *E. faecalis* bakterisi için sırasıyla 0.81, 1.15, 1.63 mg mL⁻¹ olarak, *S. uberis* bakterisi için sırasıyla 0.86, 1.24, 1.79 mg mL⁻¹ olarak, *B. subtilis* bakterisi için sırasıyla 1.26, 2.12, 3.57 mg mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır. *B. cereus* bakterisinin sadece MİK₅₀ değeri hesaplanabilmiştir (35.2 mg mL⁻¹). FM ekstraktına karşı en duyarlı bakterinin en düşük MİK₅₀₋₇₀₋₉₀ değerleriyle *E. faecalis* bakterisi olduğu belirlenmiştir. Duyarlılık sırasıyla *E. faecalis*, *S. uberis*, *B. subtilis* ve *B. cereus* bakterilerine karşı FM ekstraktının antimikrobiyal etkisi belirlenmiştir. *B. cereus*, bakterisidal etkinin belirlenememesi ve ekstraktın seyreltilmemiş uygulamasında % 53.4 inhibisyon oranıyla FM ekstraktına en dirençli bakteri olarak belirlenmiştir. Uygulanan ekstrakt konsantrasyonu azaldıkça bakteriyel inhibisyonun azaldığı gözlemlenmiştir.

Bakterilerin düşük dozlarda antimikrobiyal maddeye maruz kalması sonucu bakteride direnç gelişimi gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle, antimikrobiyal etkiye sahip olan maddelerin bakteriler üzerinde MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi bakteri üremesinin engellenmesi/inhibe edilmesi için gereken doğru antimikrobiyal madde miktarının belirlenmesi açısından önemlidir [Gülmez, 2014].

Mevcut literatürde fındık yeşil kabuğu ekstraktı ile yapılan çalışmalarda farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktların içeriğinde çeşitli fitokimyasal bileşiklerin bulunduğu belirlenmiştir. Alasalvar ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları çalışmada, 100 mL % 80 etanol ve % 80 aseton çözücülerini ile 10 gram fındık kabuğu karıştırarak 50°C sıcaklıkta 30 dakika bekletilmesi ile elde edilen ekstraktların içeriğini HPLC ile analiz etmişlerdir. Analiz sonucu ekstraktların, gallik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve sinapik asit içerdikleri tespit edilmiştir. Bu fenolik asitlerden gallik asidin ekstraktların içeriğinde fazla bulunduğu görülmüştür [Alasalvar et al., 2006].

Cerulli ve arkadaşlarının (2017) yaptıkları çalışmada, fındık yeşil kabuğu içeriğindeki bileşiklerin analizi gerçekleştirilmiştir. Fındık yeşil kabuğunda, siklik diarilheptanoidler (giffoninler), sitrik asit, metilsitratlar, mirisetin, kaempferol bileşenlerinin bulunduğunu saptamışlardır [Cerulli et al., 2017].

Cabo ve arkadaşlarının (2020) yaptıkları çalışmada, farklı çözücüler ve farklı fındık türleri kullanılarak elde edilen fındık yeşil kabuğu ekstraktlarının içeriğinde bulunan fitokimyasal bileşikler HPLC UV-DAD analizi ile tespit edilmiştir. Analiz sonucu ekstraktların içeriğinde gallik asit, protokateşik asit, epikateşin, kuersetin, ellajik asit, luteolin, vanilik asit ve kaempferol türevleri olduğunu saptamışlardır [Cabo et al., 2020].

B. cereus bakterisine karşı gallik asit [Gutiérrez-Larraínzar et al., 2012], elajik asit [Ghudhaib et al., 2010], kafeik asit ve ferulik asit [Herald and Davidson, 1983] bileşiklerinin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

B. subtilis bakterisine karşı kuersetin ve kafeik asit [Tyagi et al., 2015] ve ferulik asit [Khatkar et al., 2015] bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu literatürdeki bazı çalışmalarda saptanmıştır.

E. faecalis bakterisine karşı ferulik asit [Ergün et al., 2011] ve gallik asit [Gutiérrez-Fernández et al., 2013] bileşiklerinin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir.

Streptococcus pneumoniae bakterisine karşı kuersetin bileşiğinin [de Alencar Pereira et al., 2023], *Streptococcus mutans* bakterisine karşı gallik asit bileşiğinin [Shao et al., 2015] antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasında elde edilen FM ve FS ekstraktlarının *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* ve *S. uberis* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermesinin

sebebinin içeriğindeki fenolik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde fındık yeşil kabuğu ekstraktı ile yapılan diğer çalışmalarda elde edilen ekstraktların zengin fenolik içeriğe sahip olması ve literatürde yapılan farklı çalışmalarda bu bileşiklerin saf hallerinin tez çalışmasında kullanılan bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki sergilemesi bu düşünceyi desteklemektedir.

FM ekstraktının antibiyofilm etkinliği, *E. faecalis* bakterisinin TSB besiyeri içerisinde 96 kuyulu mikrotitrasyon plakasında 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonucu oluşan biyofilmlerinin ekstrakt (1:8) uygulanarak ortadan kaldırılma (%) oranları belirlenerek incelenmiş ve klor (200 ppm) solüsyonu ile karşılaştırılmıştır.

E. faecalis bakterisinin 24 saatlik genç biyofilmi oluşumu sonrasında yapılan uygulamalarda, FM ekstraktının (1:8), % 42 oranında, klor (200 ppm) uygulamasının ise % 83 oranında oluşan biyofilmleri ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir. 48 saatlik biyofilm oluşumu sonrasında yapılan uygulamalarda ise, FM ekstraktının (1:8) % 42 oranında, klor (200 ppm) solüsyonunun ise % 80 oranında oluşan biyofilmleri ortadan kaldırdığı belirlenmiştir.

Mevcut literatürde fındık yeşil kabuğu ekstraktı ile yapılan antibiyofilm etki araştırması olmadığı için tez çalışmasında elde edilen FM ekstraktının *E. faecalis* bakterisi üzerindeki antibiyofilm etkinliği aynı bakteriyle yapılan farklı çalışmalarla karşılaştırılmıştır.

Balaban ve arkadaşlarının (2021) yaptıkları çalışmada, % 60 etanol, % 80 metanol ve bu çözücülerin asit (% 37 HCl) ile kombinasyonları ve distile su çözücülerini aracılığıyla nar kabuğundan (5 g, 10 g) ekstraktlar elde etmişlerdir. Elde edilen ekstraktların *B. cereus*, *B. subtilis* ve *E. faecalis* bakterilerinin biyofilmleri üzerinde etkilerini incelemişlerdir. Nar kabuğu ekstraktlarının *Bacillus* türü bakterilerin biyofilm oluşumunu % 73-80 oranında önlediği, *E. faecalis* bakterisinin biyofilm oluşumunu ise % 64-70 oranında önlediği belirlenmiştir. Ayrıca nar kabuğu ekstraktlarının *E. faecalis* bakterisinin oluşturduğu biyofilmi % 75'e varan oranda ortadan kaldırdığı, *B. cereus* bakterisinin oluşturduğu biyofilmi % 83'e varan oranda ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. Nar kabuğu ekstraktlarının içeriğinde organik asitlerden malik asit ve sitrik asit, fenolik bileşiklerden punikalajin ve elajik asit bileşiklerinin varlığı tespit edilmiştir. Ekstraktın antibiyofilm aktivitesinin içeriğindeki organik asitler ve fenolik bileşiklerden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür [Balaban et al., 2021b]. Gıda işleme atığı ekstraktlarının fitokimyasal içeriklerinden dolayı

biyofilm kontrol ajanı olarak kullanım potansiyeli olduğu bu çalışma ile de desteklenmektedir.

Qayyum ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada kuersetin bileşiğinin *E. faecalis* biyofilmi üzerinde etkisini incelemişlerdir. Kuersetinin (256, 128 ve 64 mg L⁻¹) *E. faecalis* biyofilmini sırasıyla % 95, % 85 ve % 70 oranlarında inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Proteomik analizleri sonucu *E. faecalis* biyofilmlerinde kuersetin varlığında 19 proteinin ifadesinin değiştiği tespit edilmiştir. Kuersetinin biyofilm inhibitör etkisinin glikolitik, protein translasyon-uzama ve protein katlanma yollarını bozmasından kaynaklandığını ve bu durumun bakterinin fizyolojisini bozarak serbest formdaki hücrelerin biyofilm formuna geçişini engellediğini öne sürmüşlerdir [Qayyum et al., 2019]. Tez çalışmasında kullanılan fındık yeşil kabuğu ekstraktının içerisinde literatürdeki diğer fındık yeşil kabuğu ekstraktlarına paralel olarak kuersetin veya kuersetin benzeri bileşiklerden kaynaklanabileceği ve *E. faecalis* bakterisi biyofilmleri üzerinde inhibe edici etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Kuswandani ve arkadaşlarının (2021) yaptıkları çalışmada, *Myrmecodia pendens* ekstraktının *E. faecalis* bakterisine karşı antibiyofilm etkisini incelemişlerdir. 48 saatlik *E. faecalis* biyofilmlerine karşı 100 mg mL⁻¹ konsantrasyonda uygulamanın 1 dakika içerisinde, 25 mg mL⁻¹ konsantrasyonda uygulamanın 30 dakika içerisinde biyofilmleri ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir. Elde edilen ekstraktın içeriğinde taninler, saponinler, alkaloidler, fenolikler, flavonoidlerin bulunduğunu tespit ederek biyofilm ortadan kaldırma etkisinin ekstraktın fitokimyasal içeriğinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir [Kuswandani et al., 2021].

Tez çalışması kapsamında FM ekstraktının anti quorum-algılama etkisi *C. violaceum* bakterisine karşı agar kuyu difüzyonu yöntemi ile incelenmiştir. *C. violaceum* bakterisine karşı farklı konsantrasyonlarda (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 ve 1:32) ekstrakt uygulaması yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonunda sırasıyla 17, 13, 10, 8, 6, 6 mm (kuyu çapı 6 mm) renksiz opak zon çapları oluşumları gözlemlenmiştir. Oluşan inhibisyon zon çaplarında iki farklı zon oluşumu görülmüştür; i) bakteriyel üremenin ve viyolasein pigmentinin görülmediği zon, ii) bakteriyel üremenin görüldüğü ve viyolasein pigmentinin görülmediği zon. Sonuç olarak FM ekstraktının QA inhibe edici etkisinin olduğu ve bu etkinin *C. violaceum* bakterisi üzerindeki bakterisidal etkisinden bağımsız bir şekilde gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

C. violaceum bakterisinin mor renkli viyolasein pigmentinin üretimi quorum-algılama (QA) tarafından düzenlenir ve viyolasein üretiminin inhibisyonu QA inhibisyonunu göstermektedir [McClean et al., 1997]. Mevcut literatürde bitki ekstraktlarının ve bitkilerden elde edilen bileşiklerin *C. violaceum* bakterisine karşı anti-QA etkisi üzerinde araştırmalar bulunmaktadır. Choo ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada vanilya ekstraktının anti-QA etkisini incelemişlerdir. % 75 metanol kullanarak elde ettikleri vanilya ekstraktının uygulamasının viyolasein pigmentinin üretimini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir [Choo et al., 2006]. Vasavi ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada, *Syzygium cumini* L. ve *Pimenta dioica* L. ekstraktlarının *C. violaceum* bakterisine karşı anti-QA etkisini incelemişlerdir. İki ekstrakt uygulamasının da viyolasein pigmenti üretimini inhibe ettiğini ve anti-QA etkisi olduğunu belirlemişlerdir [Vasavi et al., 2013].

Hücreler arası iletişim ile virülansın dolayısı ile QA mekanizmasının inhibe edilmesi bakterinin çevreye adaptasyonunu azaltabilir, biyofilm oluşumunu ve olgunlaşmasını engelleyebilir [Rasko and Sperandio, 2010]. QA inhibitörlerinin biyofilmle mücadelede kullanılması, bakteriler üzerinde geleneksel antibiyotiklerin uyguladığı seçici baskıyı azaltarak kısa sürede antibiyotiklere dirençli bakterilerin sayısının artmasının önüne geçebilecek önemli bir stratejidir [Welsh et al., 2015].

Mevcut literatürde fındık yeşil kabuğu ekstraktının antibiyofim veya anti-QA etkisini inceleyen bir çalışma yoktur. Bu çalışma literatürde bir fındık yeşil kabuğu ekstraktı ile yapılan ilk antibiyofilm ve anti-QA çalışması olduğu için literatürdeki bitkisel ekstraktların biyofilm kontrolünde kullanım stratejilerine katkı sağlayacaktır.

Yapılan tez çalışmasında fındık yeşil kabuğundan farklı çözücüler (su, metanol) kullanılarak hazırlanan ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyeli gösterilmiştir. Fındık yeşil kabuğundan metanol çözücüsü aracılığıyla elde edilen ekstraktın antibiyofilm ve anti-quorum-algılama özellikleri sergilediği ve bu nedenle biyofilmle mücadelede kullanılabilecek kimyasal ve toksik temizleyici ajanlara alternatif olarak doğal içerikli, etkili bir antibiyofilm ajanı olma potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Elde edilen antibakteriyel etkili ekstraktlar gıda koruyucu olarak gıda endüstrisinde kullanılabilir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar gıda patojeni bakteriler ve biyofilmleri ile mücadelede literatüre katkı sağlayacaktır. Ayrıca sağlık ve çevre konusunda tehlike oluşturan zararlı antimikrobiyal ajanlara

alternatif olarak gıda atıklarından elde edilen doğal antibakteriyel ajanların kullanımına teşvik edici olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abadi A. T. B., Rizvanov A. A., Haertlé T., Blatt N. L., (2019), “World Health Organization Report: Current Crisis of Antibiotic Resistance”, *BioNanoScience*, 9, 778–788.
- Adams M. R., Hartley A. D., Cox L. J., (1989), “Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads”, *Food Microbiology*, 6(2), 69–77.
- Akbas M. Y., Cag S., (2016), “Use of organic acids for prevention and removal of *Bacillus subtilis* biofilms on food contact surfaces”, *Food Science and Technology International*, 22(7), 587–597.
- Alasalvar C., Karamać M., Amarowicz R., Shahidi F., (2006), “Antioxidant and antiradical activities in extracts of hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut green leafy cover”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4826–4832.
- Altınok Ö., Gürpınar Ö., Eser Ö., (2018), “Bakteriyel Biyofilmler”, *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 1(2), 45–51.
- Andrews J. M., (2001), “Determination of minimum inhibitory concentrations”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5–16.
- Apaydın H., (2021), “Farklı Kavurma Koşullarının Kuruyemişlerin Fiziksel, Kimyasal Özelliklerine ve Mineral Biyoerişebilirliğine Etkisi”, *Doktora Tezi, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi*.
- Atak E., Uslu M. E., (2018), “Fenolik Bileşikler, Ekstraksiyon Metotları ve Analiz Yöntemleri”, *MCBÜ Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, 3(27), 39–48.
- Balaban M., Koc C., Sar T., Akbas M. Y., (2021), “Antibiofilm effects of pomegranate peel extracts against *B. cereus*, *B. subtilis*, and *E. faecalis*”, *International Journal of Food Science and Technology*, 56(10), 4915–4924.
- Balaban M., Koç C., Sar T., Akbas M. Y., (2021), “Screening for Bioactive Compound Rich Pomegranate Peel Extracts and Their Antimicrobial Activities”, *Johnson Matthey Technology Review*, 66(1), 81–89.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S. K., (2016), “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review”, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- Bassler B. L., (2002), “Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria”, *Cell*, 109(4), 421–424.
- Bassler B. L., Wright M., Showalter R. E., Silverman M. R., (1993), “Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence”, *Molecular Microbiology*, 9(4), 773–786.

Bernhoft A., (2010), “Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals”, Issue November 2008 13-14.

Beveridge T. J., (1999), “Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles”, *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.

Biswas B., Rogers K., Mclaughlin F., Daniels D., Yadav A., (2013), “Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria”, *International Journal of Microbiology*, 2013.

Blainski A., Lopes G. C., De Mello J. C. P., (2013), “Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L.”, *Molecules*, 18(6), 6852–6865.

Bottone A., Cerulli A., Durso G., Masullo M., Montoro P., Napolitano A., Piacente S., (2019), “Plant Specialized Metabolites in Hazelnut (*Corylus avellana*) Kernel and Byproducts: An Update on Chemistry, Biological Activity, and Analytical Aspects”, *Planta Medica*, 85(11–12), 840–855.

Brackman G., Coenye T., (2015), “Quorum Sensing Inhibitors as Anti-Biofilm Agents”, *Current Pharmaceutical Design*, 21(1), 5–11.

Breed R. S., Dotterer W. D., (1916), “The number of colonies allowable on satisfactory agar plates”, *Public Health*, 1898, 321–331.

Cabo S., Aires A., Carvalho R., Pascual-Seva N., Silva A. P., Gonçalves B., (2020), “*Corylus avellana* L. Husks an Underutilized Waste but a Valuable Source of Polyphenols”, *Waste and Biomass Valorization*, 12(7), 3629–3644.

Cerulli A., Lauro G., Masullo M., Cantone V., Olas B., Kontek B., Nazzaro F., Bifulco G., Piacente S., (2017), “Cyclic Diarylheptanoids from *Corylus avellana* Green Leafy Covers: Determination of Their Absolute Configurations and Evaluation of Their Antioxidant and Antimicrobial Activities”, *Journal of Natural Products*, 80(6), 1703–1713.

Chang C. C., Yang M. H., Wen H. M., Chern J. C., (2002), “Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods”, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.

Che Sulaiman I. S., Basri M., Fard Masoumi H. R., Chee W. J., Ashari S. E., Ismail M., (2017), “Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology”, *Chemistry Central Journal*, 11(1), 1–11.

Choo J. H., Rukayadi Y., Hwang J., (2006), “Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract”, *Letters in Applied Microbiology*, 42, 637–641.

Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P., (1999), “Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections”, *Science*, 284(5418), 1318–1322.

Costerton J. W., Lewandowski Z., Coldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M., (1995), "Microbial biofilms", *Annu. Rev. Microbiol.*, 49:711-45, 110–114.

Cowan M. M., (1999), "Plant products as antimicrobial agents", *Cosmetic and Drug Microbiology*, 12(4), 205–231.

Demir T., Akpınar Ö., (2020), "Bitkilerde Bulunan Fitokimyasalların Biyolojik Aktiviteleri", *Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology*, 8(11), 2300–2306.

Dosti B., Guzel-Seydim Z., Greene A. K., (2005), "Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms", *International Journal of Dairy Technology*, 58(1), 19–24.

Dufour D., Leung V., Lévesque C. M., (2012), "Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance", *Endodontic Topics*, 22(1), 2–16.

Erdoğan Ö. T., (2002), "Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine", *Pharmaceutical Biology*, 40(4), 269–273.

Erginkaya Z., Yurdakul N. E., Karakaş A., (2007), "The Properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* as a Starter and Probiotic Cultures", *Gıda*, 32(3), 137–142.

Ergün B. Ç., Çoban T., Onurdağ F. K., Banoglu E., (2011), "Synthesis, Antioxidant and Antimicrobial Evaluation of Simple Aromatic Esters of Ferulic Acid", *Archives of Pharmacal Research*, 34(8), 1251–1261.

Evcimen M., Aslan R., (2017), "Yaygın Kullanıma Sahip Tıbbi Aromatik Bitkilerdeki Bazı Antioksidan Fitokimyasalların Fizyolojik Etkileri", *Kocatepe Veterinary Journal*, 8(October), 65–78.

FAO (2020), "Hazelnuts (with shell); Crops by Region, World List, Production Quantity, 2020", UN Food and Agriculture Organization, Statistics Division (FAOSTAT). 2020.

Fernández-agulló A., Pereira E., Freire M. S., Valentão P., Andrade P. B., González-álvarez J., (2013), "Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts", *Industrial Crops & Products*, 42, 126–132.

Fisher K., Phillips C., (2009), "The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*", *Microbiology*, 155(6), 1749–1757.

Fuqua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P., (1994), "Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators", *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269–275.

- Ghudhaib K. K., Hanna E. R., Jawad A. H., (2010), "Effect of Ellagic Acid on Some Types of Pathogenic Bacteria", *Journal of Al-Nahrain University*, 13(2), 79–85.
- Goodburn C., Wallace C. A., (2013), "The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review", *Food Control*, 32(2), 418–427.
- Govan J. R. W., Deretic V., (1996), "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*", *Microbiological Reviews*, 60(3), 539–574.
- Guglielmi P., Pontecorvi V., Rotondi G., (2020), "Natural compounds and extracts as novel antimicrobial agents", *Expert Opinion on Therapeutic Patents*.
- Gunwantrao B. B., Bhausahab S. K., Ramrao B. S., Subhash K. S., (2016), "Antimicrobial activity and phytochemical analysis of orange (*Citrus aurantium* L.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) peel extract", *Annals of Phytomedicine: An International Journal*, 5(2), 156–160.
- Gutiérrez-Fernández J., García-Armesto M. R., Álvarez-Alonso R., del Valle P., de Arriaga D., Rúa J., (2013), "Antimicrobial activity of binary combinations of natural and synthetic phenolic antioxidants against *Enterococcus faecalis*", *Journal of Dairy Science*, 96(8), 4912–4920.
- Gutiérrez-larraínzar M., Rúa J., Caro I., Castro C. De, Arriaga D. De, García-armesto M. R., (2012), "Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria", *Food Control*, 26(2), 555–563.
- Gutierrez-Venegas G., Gomez-Mora J. A., Meraz-rodríguez M. A., Flores-Sanchez M. A., Ortiz-miranda L. F., (2019), "Effect of flavonoids on antimicrobial activity of microorganisms present in dental plaque", *Heliyon*, 5 (December).
- Guzman J., Padilla L., (2017), "Anti-Quorum Sensing Activity of *Tetracera scandens* and *Aleurites moluccana* Leaf Extracts against *Chromobacterium violaceum*", *Microbiology Research Journal International*, 22(1), 1–10.
- Gülçin I., (2009), "Antioxidant activity of l-adrenaline: A structure-activity insight", *Chemico-Biological Interactions*, 179(2–3), 71–80.
- Gülmez D., (2014), "Antimikrobiyal Direnci Belirlemede Fenotipik Yöntemler veya Klasik Yöntemler", 28(Ek 2), 221–228.
- Gürkan T., Külahcı M. B., Çıtak S., (2021), "Determination of various virulence properties and biofilm formation antibiotic resistance of enterococcus", 2021(28), 924–932.
- Güzel M., Akpınar Ö., (2019), "Meyve ve Sebze Kabuklarının Fitokimyasal ve Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi", *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9, 768–780.

Heftmann F., (1992),” Chromatography: Fundamentals and Application of Chromatographic and Electrophoretic Techniques”, 5th Edn., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Herald P. J., Davidson P. M., (1983), “Antibacterial Activity of Selected Hydroxycinnamic”, Journal of Food Science, 48.

Herodež Š. S., Hadolin M., Škerget M., Knez Ž., (2003), “Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves”, Food Chemistry, 80(2), 275–282.

Huang Y., Xiao Y. H., Burton-Freeman B. M., Edirisinghe I., (2016), “Chemical changes of bioactive phytochemicals during thermal processing”, Reference Module in Food Science.

Ingle K. P., Deshmukh A. G., Padole D. A., Dudhare M. S., Moharil M. P., Khelurkar V. C., (2017), “Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts”, Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(1), 32–36.

Kahraman M., (1985), “Sığır Mastitisi Üzerinde Araştırmalar. 2. Streptokoklara Bağlı Mastitis”, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 117–120.

Kalkan S., Halkman K., (2006), “*Bacillus cereus* ve İçme Sütünde Oluşturduğu Sorunlar”, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 04(01), 1–11.

Karabulut H., Gülay M. Ş., (2016), “Antioksidanlar”, MAE Vet Fak Derg, 1(1).

Kasnak C., Palamutoğlu R., (2015), “Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri”, Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3(5), 226–234.

Khatkar A., Nanda A., Kumar P., Narasimhan B., (2013), “Synthesis and antimicrobial evaluation of ferulic acid derivatives”, Res Chem Intermed, 41, 299–309.

Kothari V., Sharma S., Padia D., (2017), “Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*”, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 10(8), 810–818.

Kuchma S. L., O’Toole G., (2000), “Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression”, Current Opinion in Biotechnology, 429–433.

Kurtça M., (2020), “Bartın İlinde Yetiştirilen Fındığın (*Corylus avellana* L.) Zurufunun (Yeşil Yapraklı Kabuk) Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi”, Ziraat Mühendisliği, 372, 25–33.

Kuswandani F., Satari M. H., Maskoen A. M., (2021), “Antibiofilm Efficacy of *Myrmecodia Pendens* Methanol Extract and NaOCl Against *Enterococcus Faecalis*

ATCC 29212”, *Journal of International Dental and Medical Research*, 14(4), 1373–1378.

Kutlu N., Yeşilören G., İşci A., Şakıyan Ö., (2017), “Konvansiyonel Ekstraksiyona Alternatif: Yeşil Teknolojiler”, *Gıda / the Journal of Food*, 42(5), 514–526.

Lamuela-Raventós R. M., (2017), “Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity”, *Recent Trends and Applications*, 107–115.

Lee E. J., Nomura N., Patil B. S., Yoo K. S., (2014), “Measurement of total phenolic content in wine using an automatic Folin-Ciocalteu assay method”, *International Journal of Food Science and Technology*, 49(11), 2364–2372.

Lichstein H. C., Van De Sand V. F., (1945), “Violacein, an Antibiotic Pigment Produced by *Chromobacterium violaceum*”, *Oxford Journals*, 76(1), 47–51.

Logan N. A., Vos P. D., (2015), “*Bacillus*”, *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*.

McClellan K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Camara M., Daykin M., John H., Swift S., Bycroft B. W., Stewart G. S. A. B., Williams P., (1997), “Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones”, *Microbiology*, 143, 3703–3711.

Meireles A., Giaouris E., Simões M., (2016), “Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry”, *Food Research International*, 82, 71–85.

Miller S. I., (2016), “Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules”, *American Society for Microbiology*, 1–3.

Mir M. A., Bashir N., Alfaify A., Oteef M. D. Y., (2020), “GC-MS analysis of myrtus communis extract and its antibacterial activity against gram-positive bacteria”, *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 1–9.

Mishra K., Ojha H., Chaudhury N. K., (2012), “Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results”, *Food Chemistry*, 130(4), 1036–1043.

Montella R., Coisson J. D., Travaglia F., Locatelli M., Malfa P., Martelli A., Arlorio M., (2013), “Bioactive compounds from hazelnut skin (*Corylus avellana* L.): Effects on *Lactobacillus plantarum* P17630 and *Lactobacillus crispatus* P17631”, *Journal of Functional Foods*, 5(1), 306–315.

Murathan Z. T., Kaya A., Erbil N., Arslan M., Dıraz E., Karaman Ş., (2020), “Comparison of Bioactive Components, Antimicrobial and Antimutagenic Features of Organically and Conventionally Grown Almond Hulls”, *Erwerbs-Obstbau*, 62(4), 463–472.

Naz S., Siddiqi R., Ahmad S., Rasool S. A., Sayeed S. A., (2007), “Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*”, *Journal of Food Science*, 72(9).

Nostro A., Guerrini A., Marino A., Tacchini M., Di Giulio M., Grandini A., Akin M., Cellini L., Bisignano G., Saraçoğlu H. T., (2016), “In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria”, *International Journal of Food Microbiology*, 238, 33–39.

Oğuzkan S. B., Uğraş S., Can M., Uzun A., Ülger S., Üzmez Ş., (2016), “Fındık (*Corylus avellana* L.) Yeşil Kabuk ve Yaprak Ekstraktlarında Biyolojik Aktivite Tayini”, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 19(4), 373–378.

Patterson M. J., (1996), “*Streptococcus*”, *Medical Microbiology* 4th edition.

Perry E., Sibbett G. S., (1998), “Harvesting and Storing Your Home Orchard’s Nut Crop: Almonds, Walnuts, Pecans, Pistachios, & Chestnuts. Harvesting and Storing Your Home Orchard’s Nut Crop: Almonds, Walnuts, Pecans, Pistachios, & Chestnuts”, 1–9.

Pushparaj Selvadoss P., Nellore J., Balaraman Ravindran M., Sekar U., Tippabathani J., (2018), “Enhancement of antimicrobial activity by liposomal oleic acid-loaded antibiotics for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*”, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(2), 268–273.

Qayyum S., Sharma D., Bisht D., Khan A. U., (2019), “Identification of factors involved in *Enterococcus faecalis* biofilm under quercetin stress”, *Microbial Pathogenesis*, 126(June 2018), 205–211.

Rajkumar S. R. J., MSA M. N., Selvakumar P. M., (2018), “Phytochemicals as a potential source for anti-microbial, anti-oxidant and wound healing- a review”, *MOJ Bioorganic & Organic Chemistry*, 2(2), 61–70.

Rasko D. A., Sperandio V., (2010), “Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease”, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(2), 117–128.

Rohde M., (2019), “The Gram-Positive Bacterial Cell Wall”, *American Society for Microbiology*.

Rufino M. do S. M., Alves R. E., Brito E. S., Morais S. M., Sampaio C. de G., Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F. D., (2007), “Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH”, *Comunicacao Tecnico* 0–3.

Sánchez E., Rivas Morales C., Castillo S., Leos-Rivas C., García-Becerra L., Ortiz Martínez D. M., (2016), “Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.

Schmidt R. H., (1997), “Basic Elements of Equipment Cleaning and Sanitizing in Food Processing and Handling Operations”, University of Florida IFAS Extension.

Shahidi F., Alasalvar C., Liyana-Pathirana C. M., (2007), “Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L) and hazelnut byproducts”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1212–1220.

Shao D., Li J., Li J., Tang R., Liu L., Shi J., Huang Q., Yang H., (2015), “Inhibition of Gallic Acid on the Growth and Biofilm Formation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans*”, *Journal of Food Science*, 80.

Shi X., Zhu X., (2009), “Biofilm formation and food safety in food industries”, *Trends in Food Science and Technology*, 20(9), 407–413.

Singleton V. L., Rossi J. A., (1965), “Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents”, *Am J Enol Vitic.*, 16, 144–158.

Slobodníková L., Fialová S., Rendeková K., Kováč J., Mučaji P., (2016), “Antibiofilm activity of plant polyphenols”, *Molecules*, 21(12), 1–15.

Starmans D. A. J., Nijhuis H. H., (1996), “Extraction of secondary metabolites from plant material: A review”, *Trends in Food Science and Technology*, 7(6), 191–197.

Stewart P. S., Franklin M. J., (2008), “Physiological heterogeneity in biofilms”, *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199–210.

Sultana B., Anwar F., Ashraf M., (2009), “Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts”, *Molecules*, 14(6), 2167–2180.

Sutherland I. W., (2001), “The biofilm matrix- An immobilized but dynamic microbial environment”, *Trends in Microbiology*, 9(5), 222–227.

Sürek E., Büyükkileci A. O., (2018), “Kritik Altı Su ile Fındık Atıklarından Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyonu”, *Gıda / the Journal of Food*, 43, 211–221.

Şimşek A., Alantaş R., (1999), “Fındığın Bileşimi ve İnsan Beslenmesi Açısından Önemi”, *Gıda*, 24(3), 209–216.

Temel A., Eraç B., (2018), “Bacterial Biofilms: Detection Methods and Role in Antibiotic Resistance”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 48(1), 1–13.

TEPGE (2021), Fındık Ocak 2022-Tarım Ürünleri Piyasa Raporu, Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü.

Turnbull P. C., Kramer J. M., Melling J., (1996), “*Bacillus*”, *Medical microbiology* (Chapter 15).

Tyagi B., Dubey A., Verma A. K., Tiwari S., (2015), “Antibacterial activity of phenolics compounds against pathogenic bacteria”, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, November-December 2015, 16–18.

Ünal L. E., (2006), “Türkiye Florasında Doğal Olarak Yetişen Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi”, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Ünlü F., Özgenç O., Arı A., Coşkun S. A., Avcı M., Kasnak C., Palamuto R., (2017), “Boğaz Dışı Klinik Örneklerden İzole Edilen Streptokok Suşları ve Oluşturdıkları Enfeksiyonların Özellikleri”, *Haseki Tıp Bülteni*, 55(4), 292–298.

Vaillancourt K., LeBel G., Yi L., Grenier D., (2018), “In vitro antibacterial activity of plant essential oils against *Staphylococcus hyicus* and *Staphylococcus aureus*, the causative agents of exudative epidermitis in pigs”, *Archives of Microbiology*, 200(7), 1001–1007.

Vasavi H. S., Arun A. B., Rekha P. D., (2013), “Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by *Syzygium cumini* L. and *Pimenta dioica* L.”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(12), 954–959.

Vergara-Salinas J. R., Pérez-Jiménez J., Torres J. L., Agosin E., Pérez-Correa J. R., (2012), “Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*)”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10920–10929.

Watnick P., Kolter R., (2000), “Biofilm, city of microbes”, *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2675–2679.

Welsh M. A., Eibergen N. R., Moore J. D., Blackwell H. E., (2015), “Small molecule disruption of quorum sensing cross-regulation in *Pseudomonas aeruginosa* causes major and unexpected alterations to virulence phenotypes”, *Journal of the American Chemical Society*, 137(4), 1510–1519.

White D. G., Zhao S., Simjee S., Wagner D. D., Mcdermott P. F., (2002), “Antimicrobial resistance of foodborne pathogens”, *Microbes and Infection*, 4 (2002) 405–412.

Willian E., Pereira D. A., Alves E., Miranda M. De, Cardoso R., Martins E., Sousa D., Caroline S., Ferreira P., Zeneida C., Lima G. P. A., Souza A. De, Gonçalves L., Neto L., (2023), “Microbial Pathogenesis Antimicrobial effect of quercetin against *Streptococcus pneumoniae*”, *Microbial Pathogenesis*, 180 (April).

Wirtanen G., Husmark U., Mattila-Sandholm T., (1996), “Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food- processing systems”, *Journal of Food Protection*, 59(7), 727–733.

Yavuz M. T., Öztürk E., Behçet M., Kaya D., (2006), “Hastane kökenli üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen Enterococcus türlerinin insidansı ve antibiyotik direnç profilleri”, Türk Mikrobiyol Cem Derg (2006) 36 (4) 195–199.

Zhang X., Bishop P. L., Kupferle M. J., (1998), “Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers”, Water Science and Technology, 37(4–5), 345–348.

Zoral F. B., Turgay Ö., (2014), “Çeşitli Gıda Atıklarının Toplam Fenolik Madde İçeriğinin, Antioksidan ve Antimikrobiyel Aktivitelerinin Araştırılması”, KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi, 17(2) 2014.

ÖZGEÇMİŞ

Pelin KİRAZ, 2016 yılında başladığı Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü 2020 yılında başarıyla tamamlayarak aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. 2023 yılının Mart ayında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. Lisansüstü eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda devam etmektedir.