

Siyah Havuç Posasının Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi

Tülay DURAN¹, Zuhâl SAHİN^{1*}, Fatih SONMEZ¹

¹ Sakarya Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Pamukova Meslek Yüksekokulu, 54900, Sakarya, TÜRKİYE

*tduran@subu.edu.tr

Özet – Siyah havuç (*Daucus carota* L. ssp.sativus var. atrorubens Alef.) rengini de veren yüksek düzeyde stabil antosiyanine ve fenolik asitlere, bu nedenle antioksidan, antitümör, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Siyah havuç posası ise daha yüksek polifenol ve biyoyararlanımı daha yüksek antosiyanin içerir, endüstriyel atık olması açısından da gıda endüstrisinde doğal renklendirici olarak çeşitli gıdalarda kullanılmasının yanı sıra doğal antimikrobiyal madde olarak da değerlendirilebilir. Bu çalışmada kuru siyah havuç posasının metanol ile ekstraktı yapılmış ve *Bacillus spp*, *E. coli* Tip 1, *E. coli* O157, *Salmonella spp.*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S.aureus*, *C.sakazakii*'ye karşı disk difüzyon yöntemi (15µl ve 20 µl) uygulanarak, minimal inhibitör konsantrasyonu (mik) ve minimal bakterisidal konsantrasyonu (mbk) belirlenerek antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar siyah havuç posasının metanol ekstraktlarının *Bacillus spp*, ve *S.aureus* 'a karşı antimikrobiyal etkisinin olduğunu, disk difüzyon yönteminde konsantrasyon arttıkça inhibisyon zon çapının arttığını göstermiştir. *S.aureus* için 15 µl ekstraktta 10,77 ± 0,92 mm, 20 µl ekstraktta 11,78 ± 0,13 mm, *Bacillus spp*. için 15 µl ekstraktta 10,13 ± 0,42 mm, 20 µl ekstraktta 10,70 ± 0,35 mm çapında inhibisyon zonlarının oluştuğu gözlenmiştir. Minimal inhibitör konsantrasyonu (mik) *Bacillus spp*, ve *S.aureus* için sırasıyla 3,125 mg/ml ve 6,25 mg/ml, minimal bakterisidal konsantrasyonu (mbk) ise sırasıyla 50 mg/ml ve 250 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler – Siyah Havuç, *Daucus Carota* L., Disk Difüzyon, Mik, Mbk, Antimikrobiyal Aktivite

I. GİRİŞ

Siyah havuç (*Daucus carota* L. ssp.sativus var. atrorubens Alef.) geleneksel olarak dünyada Afganistan, Mısır, Pakistan ve Hindistan'da, Türkiye'de en fazla Konya ve Adana'da yetiştirilen, rengi açısından antosiyanin grubuna dahil bir bitkidir [1], [2].

Siyah havuç, yüksek düzeyde stabil antosiyanin içeriğine (175 mg kg 1 taze kütle), klorojenik, kafeik, sinapik, ferulik ve kumarik asitler gibi fenolik asitlere ve yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir [3] - [5]. Siyah havucun fenolik asitler ve antosiyanin açısından zengin olması duyuşal özelliklerin yanı sıra antitümör, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkileri bakımından sağlık açısından da önemlidir [6].

Siyah havuç, mor-siyah renk veren antosiyaninleri sebebiyle meyve suları ve konsantreleri başta olmak üzere yoğurt, lokum gibi bir çok gıdanın doğal olarak renklendirilmesinde kullanılmaktadır [7] - [9]. Doğal renklendiricilere artan talep siyah havuç konsantresi üretimini ve proses sonrası oluşan siyah havuç posası miktarını arttırmıştır [10] -[13]. Siyah havuçtan meyve suyu üretiminde verim oranına (%45 ile %64 arasında) bağlı olarak yüksek düzeyde siyah havuç posası ortaya çıkar [9], [14]. Siyah havuç posası, genellikle ya hayvan yemi olarak değerlendirilir ya da atık olarak uzaklaştırılarak belirli bir maliyete ve çevre kirliliğine neden olur [2].

Siyah havuç posası diyet lif, doğal renk maddesi ve doğal antioksidan madde kaynağı olarak kullanılmaktadır [15] - [17]. Ayrıca siyah havuç

posasında siyah havuçla karşılaştırıldığında daha yüksek polifenol ve biyoyararlanımı daha yüksek antosiyaninler mevcuttur [15], [18].

Bu çalışmada kurutulmuş siyah havuç posasının metanol ekstraktlarının 9 farklı mikroorganizmaya karşı disk difüzyon yöntemi uygulanarak antimikrobiyal etkisi, minimal inhibisyon konsantrasyonu (mik) ve minimal bakterisidal konsantrasyonu (mbk) incelenmiştir.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

Örneklerin ve Bakteri Kültürlerinin Temini

Siyah havuç posası kurutulmuş olarak DÖHLER GRUP A.Ş.' den temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan mikroorganizma kültürleri Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği laboratuvarından temin edilmiştir. Araştırmada *Bacillus spp*, *E. coli Tip 1*, *E. coli O157*, *Salmonella spp.*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *S.aureus*, *C.sakazakii* gıda izolatları kullanılmıştır.

Ekstraksiyon

Örneklerden bir miktar alımarak %70'lik methanol ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar süzülerek 40°C de evaporatörde buharlaştırılmıştır [19]. Ekstraktlar su ile çözündürüldükten sonra membran filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve kullanılana kadar + 4 derecede muhafaza edilmiştir.

Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Etki Belirlenmesi

Disk difüzyon yöntemi Clinical and Laboratory Standards Institute standartlarına göre yapılmıştır [20].

Standart bakteri suşları sıvı besi ortamında (Tryptic Soy Broth) aktifleştirildikten sonra katı besi ortamında (Tryptic Soy Agar) tek koloni oluşturulmuştur. Benzer koloniler 4-5 ml'lik buyyonda süspanse edilerek spektrofotometrede ölçülerek MacFarland 0.5 yoğunluğuna ayarlanmıştır. Süspansiyondan Mueller Hinton Agar besi ortamına 100 µl yayma yöntemi ile ekim yapılmıştır. 6 mm çapındaki steril boş diskler besi ortamına yerleştirilmiş ve 15 ve 20 µl ekstraktlar steril şartlarda emdirilmiştir. 35°C' de 18-24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında

disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları dijital kumpasla ölçülmüştür.

Pozitif kontrol olarak antibiyotik diski (Co-Trimoxazole), negatif kontrol olarak steril saf su kullanılmıştır. Çalışmalar 3 paralelli yapılmış, sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

Minimal İnhibitör Konsantrasyonun (mik) ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonun (mbk) Belirlenmesi

Minimal inhibitör konsantrasyon (mik) saptanmasında standartlarda belirtilen 96-kuyucuklu mikropklarda mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır [21]. Ekstraktlar, katyonu ayarlanmış Mueller Hinton Broth (KAMHB) ile seyreltilerek seri dilüsyonlar yapılmış ve her bir kuyucuğa 100 µl koyulmuştur.

Tryptic Soy Broth' ta aktifleştirilen standart bakteri suşları ile Tryptic Soy Agar' da tek koloni oluşturulmuş ve benzer kolonilerden 4-5 ml'lik serum fizyolojikte süspanse edilerek spektrofotometrede ölçülerek MacFarland 0.5 yoğunluğuna ayarlanmıştır. Seri dilüsyonlar bulunan kuyucuklara 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde inokulum eklenmiş, kontrol olarak bir kuyucuğa inokulum koyulmamıştır.

Ekim yapılmış 96-kuyucuklu mikropklaklar 35°C'de 16-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda çıplak gözle farkedilen inhibisyonu gösteren en düşük konsantrasyon mik değeri olarak belirlenmiştir.

Minimal Bakterisidal Konsantrasyonun (mbk) belirlenmesi için mik değeri ve üzerindeki konsantrasyonlardaki dilüsyonlardan Mueller Hinton Agar besiyerine ekim yapılmış ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üremenin görülmediği en düşük konsantrasyon mbk değeri olarak belirlenmiştir.

III. BULGULAR

Siyah havuç posasının metanol ekstraktlarının 15µl ve 20 µl'lik sulu solüsyonlarının *S.aureus*, *S.enteritidis*, *S. typhimurium*, *C. Sakazakii*, *Bacillus spp.*, *E.coli O157:H7*, *E.coli Tip 1*, *L.monocytogenes* ve *Salmonella spp.* bakteri kültürlerine karşı uygulanan disk difüzyon yöntemindeki inhibisyon zonları Tablo 1. 'de verilmiştir.

Siyah havuç posasının metanol ekstraktlarının *S.aureus* ve *Bacillus spp.*' ye karşı inhibisyon gösterdiği saptanmıştır. *S.aureus* için 15 µl ekstraktta $10,77 \pm 0,92$ mm, 20 µl ekstraktta $11,78 \pm 0,13$ mm., *Bacillus spp.* için 15 µl ekstraktta $10,13 \pm 0,42$ mm, 20 µl ekstraktta $10,70 \pm 0,35$ mm çapında inhibisyon zonları oluşmuştur. Her iki bakteri kültürü için de ekstrakt miktarı arttıkça inhibisyon etkisi artmıştır.

Siyah havuç posasının metanol ekstraktlarının minimal inhibitör konsantrasyonu (mik) ve minimal bakterisidal konsantrasyonu (mbk), disk difüzyon yönteminde antimikrobiyal etki gözlemlenen mikroorganizmalarda çalışılmıştır. Siyah havuç posasının metanol ekstraktlarının mik/mbk değerleri sırasıyla *S.aureus* için 6,25 / 250 mg/ml, *Bacillus spp.* için 3,125 / 50 mg/ml olarak saptanmıştır.

Tablo 1: Siyah Havuç Posasının Metanol Ekstraktlarının (15 µl ve 20 µl) İnhibisyon Zonları (mm)

Mikroorgan izmalar	15µl	20 µl	su	C-T. (Anttibiyotik)
<i>S. aureus</i>	10,77±0,92	11,78 ± 0,13	-	27,42±0,55
<i>S. enteritidis</i>	-	-	-	27,45±0,24
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	24,14 ±2,63
<i>C. sakazakii</i>	-	-	-	25,59±0,19
<i>Bacillus spp.</i>	10,13 ±0,42	10,70 ± 0,35	-	28,60±1,00
<i>E.coli O157:H7</i>	-	-	-	23,15±0,79
<i>E.coli Tip 1</i>	-	-	-	25,74±0,70
<i>L.monocyto genes</i>	-	-	-	15,73±1,13
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	-	23,37±0,21

Değerler üç paralelin ortalaması ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

C-T.: Co-Trimoxazole (Trimethoprim 1.25 µg / sulphamethoxazole 23,75µg)

IV. TARTIŞMA

Saleem vd. (2018) yaptıkları çalışmada siyah havucun etanol ve aseton ekstraktlarının (0,5,1 ve 2 g/ml), *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*' a karşı antibakteriyel etkisini araştırmışlardır. Etanol ve aseton ekstraktlarının

inibisyon etkisi yalnızca *B. cereus* ve *S. aureus*' a karşı gözlemlenmiştir. En yüksek 2 g/ml konsantrasyonda gözlemlenen zon çapları *B. cereus* ve *S. aureus* için sırasıyla etanol ekstraktları 6 ve 8,5 mm, aseton ekstraktları 11 ve 13,2 mm'dir [21]. Yaptığımız çalışmada da benzer şekilde siyah havuç posasının metanol ekstraktları *Bacillus spp.* ve *S. aureus*' a karşı inhibisyon etki göstermiştir. Minimal inhibitör konsantrasyonu (mik) açısından daha düşük konsantrasyonlarda (*Bacillus spp.* için 6,25mg/ml ve *S. aureus* için 3,125 mg/ml) inhibisyon görülmüştür.

Sonuçlar, diğer bazı çalışmalarla da uyumludur. Sowani ve Thorat (2012), siyah havuçtan kanji içeceğinin *S. aureus*'a karşı etkili olduğunu gözlemlemiştir [22]. Valero vd. (2000), siyah havuç ekstraktlarının *Bacillus cereus*'a karşı etkili olduğunu ortaya koymuştur [23].

Yeniceli (2018) yaptığı çalışmada siyah havuç atığının %50 etanol-HCl, %70 etanol-HCl ve %50 etanol ve metanol-su (4:1) çözeltileri ile elde edilen ekstraktlarının *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *L.monocytogenes*, *Aspergillus brasiliensis* ve *Candida albicans*' a karşı mik değerlerini araştırılmış ve yalnızca *S. aureus* ve *L.monocytogenes*' e karşı inhibisyon gözlenmiştir. En yüksek mik değeri %50 etanol ve metanol-su (4:1) çözeltileri ile elde edilen ekstraktta 256 mg/ml ile *S.aureus*'a karşı olmuştur [24]. Yaptığımız çalışmada siyah havuç posasının metanol ekstraktlarının *S.aureus*'a karşı daha yüksek (6,25 mg/ml) inhibisyon gözlemlenirken, *L.monocytogenes*' e karşı inhibisyon etki gözlenmemiştir.

Bir atık ürün olan siyah havuç posası renklendirici olmasının yanı sıra özellikle *Bacillus* ve *S.aureus* açısından doğal antimikrobiyal olarak da gıda sektöründe değerlendirilebilir.

V. SONUÇLAR

Sonuç olarak endüstriyel siyah havuç posasının metanol ekstraktlarının *S.aureus* ve *Bacillus spp.*' e karşı antimikrobiyal etkisi mevcuttur. En yüksek inhibisyon zon çapları *S.aureus* için 20 µl ekstraktta $11,78 \pm 0,13$ mm., *Bacillus spp.* için 20 µl ekstraktta $10,70 \pm 0,35$ mm olarak tespit edilmiştir

Siyah havuç posasının metanol ekstraktlarının mik/mbk değerleri sırasıyla *S.aureus* için 6,25 / 250 mg/ml, *Bacillus spp.* için 3,125 / 50 mg/ml olarak saptanmıştır.

TEŞEKKÜR

DÖHLER GRUP A.Ş.'ye hammadde temininden dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] M. Özkan, 2009. "Siyah havuç suyu konsantresi üretimi ve depolanması sürecinde fenolik maddeler ve antosiyaninlerdeki değişimler ve bu değişimlerin antioksidan aktivite ile ilişkisi", Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, 2009.
- [2] D. Kammerer, R. Carle, and A. Schieber, "Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* alef.) and evaluation of their color properties", *Eur Food Res Technol*, 219(5): 479-486, 2004.
- [3] C. Alasalvar, M. Al-Farsi, P. Quantick, F. Shahidi, and R. Wiktorowicz, "Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots", *Food Chem*, 89(1), 69-76, 2005.
- [4] G. Espinosa-Acosta, A.L. Ramos-Jacques, G.A. Molina, J. Maya-Cornejo, R. Esparza, A.R. Hernandez-Martinez, I. Sánchez-González, and M. Estevez, "Stability analysis of anthocyanins using alcoholic extracts from black carrot (*Daucus carota* ssp. *Sativus* var. *Atrorubens* alef.)", *Mol*, 23: 2744, 2018.
- [5] Z. Şahin. "Bazı meyve-sebze ve atıklarının toplam fenolik madde, antioksidan özellikleri ve enzimatik esmerleşme üzerine etkilerinin incelenmesi", Kimya Doktora Tezi. T.C.Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, Türkiye, 2022.
- [6] U. Garba, S. Kaur, S. Gurumayum, and P. Rasane, "Effect of hot water blanching time and drying temperature on the thin layer drying kinetics and anthocyanin degradation in black carrot (*Daucus carota* L.) shreds", *Food Technol. Biotech.* 53 (3), 324-330, 2015.
- [7] A. Kırca, "Siyah havuç antosiyaninlerinin bazı meyve ürünlerinde ısıl stabilitesi", Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 2004.
- [8] G. Özen, M. Akbulut, and N.Artık, "Stability of black carrot anthocyanins in the turkish delight (lokum) during storage", *J. Food Process Eng*, 34(4), 1282-1297, 2011.
- [9] S. Polat, G. Guclu, H. Kelebek, M. Keskin, and S.Selli, "Comparative elucidation of colour, volatile and phenolic profiles of black carrot (*Daucus carota* L.) pomace and powders prepared by five different drying methods", *Food Chem*, 369, 130941, 2022
- [10] E. Ağçam, A. Akyıldız, and V. Balasubramaniam, "Optimization of anthocyanins extraction from black carrot pomace with thermosonication", *Food Chem*, 237, 461-470, 2017.
- [11] M. Kumar, A. Dahuja, A. Sachdev, C. Kaur, E. Varghese, S. Saha, and K. V. S. S. Sairam, "Valorisation of black carrot pomace: microwave assisted extraction of bioactive phytochemicals and antioxidant activity using Box-Behnken design", *J. Food Sci. Technol.* ,56 (2):995-1007,2019.
- [12] Sucheta, N.N. Misra, and S.K.Yadav, "Extraction of pectin from black carrot pomace using intermittent microwave, ultrasound and conventional heating: Kinetics, characterization and process economics", *Food Hydrocoll*, 102, 105592, 2020.
- [13] A. Elik, "Siyah havuç posasının radyo frekans kurutma sistemiyle kurutulması ve kalite özellikleri üzerine etkisi", *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (29), 12-20, 2022.
- [14] V. Khandare, S. Walia, M. Singh, and C. Kaur, "Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: processing effects on antioxidant composition and color", *Food Bioprod. Process*, 482-486, 2011.
- [15] S. Kamiloglu, E. Capanoglu, F.D. Bilen, G.B. Gonzales, C. Grootaert, T. Van de Wiele, and J. Van Camp, "Bioaccessibility of polyphenols from plant-processing byproducts of black carrot (*daucus carota* l.)", *J. Agric. Food Chem*, 2450-2458, 2016.
- [16] S. Kamiloglu, G. Ozkan, H. Isik, O. Horoz, J. Van Camp, and E. Capanoglu, "Black carrot pomace as a source of polyphenols for enhancing the nutritional value of cake: an in vitro digestion study with a standardized static model", *LWT - Food Sci. Technol.* 475-481, 2017.
- [17] I. Doymaz, "Drying of black carrot pomace in an infrared dryer: kinetics, modelling and energy efficiency", *Sigma: Journal of Engineering & Natural Sciences/ Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 37 (1), 71-84, 2019.
- [18] M. Abdin, Y.S. Hamed, H.M.S. Akhtar, D. Chen, G. Chen, P. Wan, and X. Zeng, "Antioxidant and anti-inflammatory activities of target anthocyanins diglucosides isolated from *Syzygium cumini* pulp by high speed counter-current chromatography", *J. Food Biochem*, 44(6), 1050-1062, 2020.
- [19] B.M. Silva, P.B. Andrade, P. Valentão, F. Ferreres, R.M. Seabra, and M.A. Ferreira, "Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity", *J Agric Food Chem*, 52(15): 4705-4712, 2004.
- [20] *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-eleventh edition. CLSI document: MO2-A11*, Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [21] *CLSI M7- A7, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 2006.
- [22] M.Q. Saleem, S. Akhtar, M. Imran, M. Riaz, A. Rauf, M.S. Mubarak, S. Bawazeere, S. S. Bawazeer, and M.F.R. Hassanien, "Antibacterial and anticancer characteristics of black carrot (*Daucus Carota*) extracts", *J. Med. Spice Plants*, 22, 40-44, 2018.
- [23] H. M. Sowani, and P.Thorat, "Antimicrobial activity studies of bacteriocin produced by lactobacilli isolates from carrot kanji", *J. Biol. Sci*, 12(1): 6-10, 2012.
- [24] M. Valero, S. Leontidis, P.S. Fernández, A. Martínez, and M.C.Salmerón, " Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30°C". *Food microbiol*, 17(6): 605-612, 2000.

- [25] B. Yeniceli, "Atık sebze ve meyvelerden antosiyanin ekstraksiyonu ve bazı bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisi", Biyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye, 2018.