

Taze ve Olgunlaştırılmış Taşköprü Sarımsağından (*Allium sativum* L.) Farklı Çözücüler Kullanılarak Elde Edilen Ekstraktların Antimikrobiyal Aktivitelerinin Karşılaştırılması

*Comparison of Antimicrobial Activities of Taşköprü Raw and Aged Garlic (*Allium sativum* L.) Extracts Obtained by Using Different Solvents*

Hüseyin KARAKAYA^{*a}, Fatma Sezer ÖZTÜRK^b, Murat YILMAZTEKİN^c

İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 44280, Malatya

• Geliş tarihi / Received: 09.03.2020

• Düzeltilecek geliş tarihi / Received in revised form: 02.06.2020

• Kabul tarihi / Accepted: 10.06.2020

Öz

Sarımsak (*Allium sativum* L.), insan sağlığı üzerine pek çok yararlı etkisi olduğu bilinen önemli bir besindir. Kastamonu Taşköprü bölgesinde yoğun biçimde sarımsak yetiştiriciliği yapılmakta olup; bölge sarımsakları coğrafi işaret ile de tescillenmiştir. Siyah sarımsak olarak da bilinen olgunlaştırılmış sarımsak, ham ürünün belirli sıcaklık ve nem koşullarında olgunlaştırılması sonucu elde edilmiş bir üründür. Olgunlaştırma işlemi sırasında bazı önemli biyokimyasal değişiklikler meydana gelmekte ve buna bağlı olarak ürünün biyoaktivitesi de değişkenlik gösterebilmektedir. Bu çalışmada farklı polaritelere sahip çözücüler kullanılarak taze ve olgunlaştırılmış Taşköprü sarımsaklarından ekstraktlar elde edilmesi ve bu ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite 4 Gram (+) (*Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus*), 4 Gram (-) (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*) ve 2 maya (*Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans*) olmak üzere toplamda 10 mikroorganizma türü üzerinde oyuk agar difüzyon testine göre belirlenmiştir. Genel olarak, taze sarımsak ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin siyah sarımsak ekstraktlarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu duruma, siyah sarımsak üretimi sırasında uygulanan yüksek sıcaklığa bağlı bazı organosülfür bileşiklerin kaybı sebep olmuş olabilir. Her iki örneğin distile su ve metanol ekstraktlarının Gram (-) bakteriler ve mayalar üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkisi gözlemlenmemiştir. Kloroform ve etil asetat ekstraktlarının ise sadece Gram (+) bakterilerde değil aynı zamanda Gram (-) bakteriler ve mayalar üzerinde de oldukça yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ekstraksiyon aşamasında kullanılan çözücü türünün antimikrobiyal aktivite üzerinde oldukça etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal Aktivite, Ekstrakt, Sarımsak, Taşköprü, Olgunlaştırma

Abstract

Garlic (*Allium sativum* L.) is an important food known with many beneficial health effects. It is intensively cultivated in Kastamonu Taşköprü region and it has been registered by geographical indication. Aged garlic, also known as black garlic, is the final product which produced by aging of raw garlic under certain temperature and humidity conditions. Some important biochemical changes occur during aging process and bioactivity of the product may also vary, correspondingly. In this study, it was aimed to obtain extracts from raw and aged Taşköprü garlic by using solvents with different polarity and to compare the antimicrobial activities of these extracts. Antimicrobial activity was investigated on 10 microorganisms including 4 Gram (+) (*Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*), 4 Gram (-) (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*) and 2 yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*) according to agar well diffusion test. It was determined that raw garlic extracts generally performed higher antimicrobial activity than the black garlic extracts. This may be caused by lost in some organosulfur compounds depending on high temperature practice during black garlic production. Distilled water and methanolic extracts of both samples did not show any antimicrobial effect on Gram (-) bacteria and the yeasts. It was determined that chloroform and ethyl acetate extracts showed quite high antimicrobial activity not only on Gram (+) bacteria but also on Gram (-) bacteria and the yeasts. It has been concluded that solvent type used in extraction is quite effective on antimicrobial activity.

Keywords: Antimicrobial Activity, Extract, Garlic, Taşköprü, Aging

^{*a} Hüseyin KARAKAYA; huseyin.karakaya@inonu.edu.tr, Tel: (0422) 377 47 86, orcid.org/0000-0002-6311-473X

^b orcid.org/0000-0001-6898-6943

^c orcid.org/0000-0002-5667-9169

1. Giriş

Sarımsak (*Allium sativum* L.) gıda ve tıbbi ürün olarak kullanımına başvuru en eski bitkilerden biridir (Kim vd., 2011). 2018 yılı Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü verilerine göre dünya geneli toplam sarımsak üretimi 28.494.130 ton olup; bu alanda toplam üretimin yaklaşık %78'ini karşılayan Çin başı çekmektedir (FAO, 2020). 2019 yılı Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre Türkiye'deki toplam sarımsak üretimi 126.447 ton olup; yurtiçi sarımsak üretiminin önemli bir kısmını Gaziantep ile birlikte Kastamonu ili gerçekleştirmektedir (TÜİK, 2020). Kastamonu Taşköprü sarımsağı coğrafi işaret ile de tescillenmiş bir üründür (TSE, 2010). Sarımsak bileşen ve kalitesinin sıcaklık, toprak yapısı, iklim gibi gelişme koşullarına bağlı olarak değiştiği varsayılmaktadır (Yoo vd., 2014). Başta organosülfidler, saponinler, fenolik bileşikler ve polisakkaritler olmak üzere sahip olduğu çeşitli biyoaktif bileşenler sayesinde sağlık üzerine pek çok faydası bulunan bir besindir (Shang vd., 2019). Yakın zamanda yapılmış biyolojik ve farmakolojik araştırmalar sarımsağın antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antifungal, antikarsinojenik, antimutajenik, lipid ve kolesterol düşürücü, antihipertansif, antihipertrombotik, bağışıklık sistem düzenleyici ve prebiyotik etkileri olduğunu doğrulamaktadır (Dziri vd., 2019).

Taze sarımsağın sahip olduğu karakteristik koku, keskin aroma ve bunların sonucu yarattığı mide bulantısı nedeniyle gıda olarak tüketimi ve tıp alanındaki kullanımı kısıtlanmıştır. Olgunlaştırılmış ya da diğer adıyla siyah sarımsak, bütün taze sarımsağın yaklaşık 70-80°C'de ve kontrollü nem koşulları altında 1-3 ay bekletilmesi ile elde edilen işlenmiş yeni bir gıda ürünüdür (Kang, 2016). Yapısında bulunan γ -glutamil sisteinler olgunlaştırma sürecinde stabil ve kokusuz bir bileşik olan S-allil sisteine (SAS) dönüşmektedir (Kinalska ve Norena, 2014). Proses sonunda hafif ekşimsi ama taze sarımsağa göre daha tatlı bir ürün ortaya çıkmaktadır. Isıl işlem sonucu renk kararırken, yapı jel benzeri yapışkan bir nitelik kazanmaktadır (Zhang vd., 2015). Olgunlaştırma sırasında gerçekleşen enzimatik hidroliz ve enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarına bağlı olarak meydana gelen fizikokimyasal değişiklikler ürünün farmakolojik özelliklerini de etkilemektedir (Kim vd., 2017). Örneğin, siyah sarımsakta SAS miktarı taze sarımsağa göre genel olarak 5-6 kat daha yüksektir (Bae vd., 2014; Zhang vd., 2015; Nguyen vd., 2017). Ayrıca olgunlaştırma ile

birlikte sarımsakların toplam fenolik ve flavonoid içeriğinde de başlangıca göre bir artış olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2015).

Yanlış ve yersiz antibiyotik kullanımı çok çeşitli patojen bakterilerde antibiyotik direnci oluşmasına sebep olmuştur. Dahası son 10 yılda klinik kullanım için geliştirilen yeni antibiyotik sayısı birkaç taneyi geçmemektedir. Antibiyotik direnci konusu belki de Dünya Sağlık Örgütü'nün tıp biliminde yüzleşmesi gerektiği en büyük sorunu oluşturmaktadır (Wang vd., 2020). Özellikle hem Gram (+) hem de Gram (-) bakteri kaynaklı gıda zehirlenmeleri gerek tüketici gerekse de endüstri açısından endişe yaratmaktadır. Patojenlerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi gıda muhafazasında doğal antibakteriyel ürünlere olan ilgiyi arttırmaktadır (Kallel vd., 2014). Sarımsağın antimikrobiyal etkisi çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Eja vd., 2007; Durairaj vd., 2009; Chen vd., 2018). *In vitro* etkisi penisilin, streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin gibi antibiyotikler ve flukonazol gibi antifungallarla kıyaslanabilir ölçüdedir (Suleiman ve Abdallah, 2014). Ayrıca Yetgin vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada Taşköprü sarımsağının Çin sarımsaklarına göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilediği ortaya konmuştur.

Taze ve siyah sarımsakların antimikrobiyal aktivitelerini karşılaştıran pek çok çalışma bulunmasına rağmen farklı çözücülerle ekstraksiyonun antimikrobiyal aktivite üzerine etkisini inceleyen araştırma sayısı oldukça kısıtlıdır. Bildiğimiz kadarıyla henüz, taze Taşköprü sarımsaklarının olgunlaştırılmış formlarıyla antimikrobiyal aktivitesini kıyaslayan bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışmada Taşköprü sarımsaklarından 4 farklı çözücü (distile su, metanol, etil asetat ve kloroform) ile sarımsak ekstraktlarının elde edilmesi ve ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi üzerine kullanılan çözücü türünün etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca taze ve siyah Taşköprü sarımsak ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri kıyaslanarak; ortaya çıkan farklılıkların muhtemel sebepleri de irdelenmiştir.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Bitki Materyali

Çalışmaya konu olan taze sarımsaklar Kastamonu ili Taşköprü ilçesinden 2019 yılı içerisinde hasat edilmiştir. Taze sarımsaklar bölgedeki yerel üreticilerden temin edilmiş olup; siyah

sarımsaklar ise Taşköprü bölgesinden hasat edilmiş sarımsağı işleyen Dente (Türkiye) firmasından temin edilmiştir.

2.2. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon işlemi Yetgin vd. (2018) tarafından belirtilen yöntemde küçük modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle sarımsak örneklerinin dış kabukları soyularak sarımsak dişleri ortaya çıkarılmıştır. Sarımsak dişleri bıçakla küçük parçalar haline getirildikten sonra havanda dövülerek ezilmiştir. Ekstraksiyon işlemi metanol, etil asetat, kloroform (Sigma, ABD) ve distile su olmak üzere 4 farklı çözücü ile gerçekleştirilmiştir. 100 ml çözücü içeren 250 mL'lik erlenler içerisine 20 gr ezilmiş sarımsak ilave edilmiştir. Karışım, orbital çalkalayıcıda (Certomat-Sartorius, Almanya) 25°C'de 180 d/d çalkalama hızında 48 saat maserasyona bırakılmıştır. Ekstraksiyon sonunda karışımlar Whatman no.1 filtreden geçirilerek darası alınmış cam balonlar içerisine aktarılmıştır. Filtrat içerisindeki çözücü fazı rotary evaporatör (Buchi, İsviçre) ile vakum altında 45°C'de buharlaştırılarak uzaklaştırılmıştır. Çözücü kalıntısı bırakmamak için balon içerisine azot gazı uygulanmıştır. Balonlar, yüzeyindeki nemi kaybederek sabit tartıma gelinceye kadar vakumlu fırında 45°C'de bekletilmiş ve içerisindeki kalıntı miktarı tartılmıştır. Ekstrakt konsantrasyonu 100 mg/mL olacak şekilde kalıntı üzerine %10 dimetil sülfoksit (DMSO; Merck, Almanya) içeren distile su ilave edilmiştir. Ekstrakt kalıntısı tamamen çözünene kadar balonlar ultrasonik su banyosunda (Sonorex-Bandelin, Almanya) 45°C'de bekletilmiştir. Ekstraktlar 0.20 µm'lik steril filtreden geçirilerek steril deney tüpleri içerisine alınmış ve kullanımlarına kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

2.3. Mikroorganizma Türleri ve Türlerin Aktifleştirilmesi

Sarımsak ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için 4 Gram (+) bakteri, 4 Gram (-) bakteri ve 2 maya türü olmak üzere 10 farklı mikroorganizma türü kullanılmıştır. Gram (+) bakteri türleri olarak *Bacillus subtilis* (DSMZ 1971), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ve *Staphylococcus aureus* (RSKK 1021/06008); Gram (-) bakteri türleri olarak ise *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071) ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı tarafından

izole edilmiş *Klebsiella pneumoniae* kullanılmıştır. Maya türleri olarak ise *Saccharomyces cerevisiae* (PYCC 2503) ve *Candida albicans* (ATCC 90028) standart suşları kullanılmıştır.

Türlerin aktifleştirilmesinde bakteriler için Brain Heart Infusion Broth (Lab M, İngiltere); mayalar için Saboraud Dextrose Broth (Lab M, İngiltere) kullanılmıştır. *B. subtilis* ve *P. aeruginosa* 30°C'de; diğer bakteri türleri ise 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Maya türleri 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Antimikrobiyal test öncesi bakteri kültürleri 1x10⁶ kob/mL; maya kültürleri 1x10⁵ kob/mL olacak şekilde %0.85'lik steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seyreltilmiştir.

2.4. Oyuk Agar Difüzyon Testi

Sarımsak ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi Okeke vd. (2001) tarafından belirtilen oyuk agar difüzyon testinde küçük modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Steril petri (90 mm) içerisine yaklaşık 3 mm kalınlığında Mueller-Hinton Agar (MHA; Himedia, Hindistan) ve Saboraud Dextrose Agar (SDA; Lab M, İngiltere) dökülmüştür. FTS ile seyreltmesi yapılan kültürlerden 200 µl petri üzerine inoküle edilmiş ve cam eküvyon çubuğu ile yayma yapılarak ekimler gerçekleştirilmiştir. Agar yüzeyleri kuruyana kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Steril bir delgi yardımıyla agar üzerinde 8 mm çapında oyuklar açılmıştır. Her bir oyuk içerisine 100 mg/ml ekstrakt içeren DMSO çözeltisinden 50 µl bırakılmıştır. Ekstraktın difüzyonu için tüm petri 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından *B. subtilis* ve *P. aeruginosa* 30°C'de 24 saat, diğer bakteri kültürleri 37°C'de 24 saat ve maya kültürleri ise 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol için oyuklara aynı ekstraksiyon basamakları uygulanmış ancak ekstrakt içermeyen 50 µl %10 DMSO çözeltisi ilave edilmiştir. Pozitif kontrol denemelerinde ise oyuklara %10 DMSO içerisinde hazırlanmış 1 mg/mL konsantrasyonda antimikrobiyal çözelti uygulanmıştır. Bakteri kültürlerine antibiyotik olarak ampisilin ve gentamisin sülfat (Sigma, ABD); maya kültürlerine ise antifungal olarak itrakonazol (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Denemeler 2 farklı petride 2 tekerrür halinde gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 1 mm hassasiyet ile en az 2 ölçüm sonunda elde edilen sonuçlar ortalama mm inhibisyon çapı olarak ifade edilmiştir.

3. Bulgular

Taze Taşköprü sarımsak ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerine ilişkin sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Metanol ve distile su ekstraktları test mikroorganizmaları arasında yalnızca *B. subtilis* ve *S. aureus* üzerinde etkili olmuştur. Etil asetat ve kloroform ekstraktlarının ise geniş bir spektrumda antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. İnhibisyon gözlenen türler arasında Gram (+) türlerin, Gram (-) türlere

kıyasla taze sarımsak ekstraktlarına karşı daha hassas olduğu sonucuna varılmıştır.

Özellikle etil asetat ve kloroform ekstraktlarının antifungal aktivitesinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. *S. cerevisiae* ve *C. albicans* petrilerinde taze sarımsaklara ait etil asetat ve kloroform ekstraktları 50 mm'nin üzerinde bir inhibisyon çapı meydana getirirken; 1 mg/mL itrakonazol uygulandığında yalnızca *C. albicans* üzerinde 10 mm inhibisyon çapı elde edilmiştir.

Tablo 1. Taze sarımsak ekstraktlarına ait antimikrobiyal aktivite sonuçları (mm inhibisyon çapı)

Gruplar	Mikroorganizmalar	Ekstraktlar*				Pozitif Kontrol**			Negatif Kontrol
		Me	Ds	Ea	Kl	Gm	Ap	İk	%10 DMSO
Gram (+) bakteriler	<i>B. subtilis</i>	22	12	42	50	46	63	TE****	İG
	<i>L. monocytogenes</i>	İG***	İG	32	34	38	37.5	TE	İG
	<i>E. faecalis</i>	İG	İG	28	29	18	40	TE	İG
	<i>S. aureus</i>	22.5	14.5	54	48	36	42.5	TE	İG
Gram (-) bakteriler	<i>E. coli</i>	İG	İG	31.5	32	26	21	TE	İG
	<i>S. enteritidis</i>	İG	İG	38	41	31	31	TE	İG
	<i>P. aeruginosa</i>	İG	İG	İG	İG	31	İG	TE	İG
	<i>K. pneumoniae</i>	İG	İG	25	25	26	İG	TE	İG
Mayalar	<i>S. cerevisiae</i>	İG	İG	64	68	TE	TE	İG	İG
	<i>C. albicans</i>	İG	İG	54	56	TE	TE	10	İG

* Me: Metanol, Ds: Distile su, Ea: Etil asetat, Kl: Kloroform

** Gm: Gentamisin, Ap: Ampisilin, İk: İtrakonazol

*** İG: İnhibisyon gözlenmedi, 8 mm'den daha küçük inhibisyon çaplarında antimikrobiyal aktivite bulunmadı olarak kabul edilmiştir.

**** TE: Test edilmedi, Bakteriler üzerinde antifungal, mayalar üzerinde antibiyotik ajanlar test edilmemiştir.

Siyah sarımsak örneklerine ait metanol ve distile su ekstraktları yalnızca *B. subtilis* üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Tablo 2). Test edilen bakteri türleri arasında *B. subtilis*'in oluşan inhibisyon çapları da göz önüne alındığında gerek taze gerek siyah sarımsak ekstraktlarına karşı en duyarlı bakteri türü olduğu tespit edilmiştir. Gram (-) bakteri üremesi siyah sarımsakların hem etil asetat hem de kloroform ekstraktları ile inhibe edilebilirken; Gram (+) türler olan *L. monocytogenes* ve *E. faecalis* üzerinde yalnızca etil asetat ekstraktları etkili olmuştur. Özellikle *P. aeruginosa* üzerinde taze sarımsak ekstraktları inhibisyon oluşturmazken siyah sarımsak ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Mayalar için ise siyah sarımsak kloroform ekstraktlarının taze sarımsak ekstraktlarına kıyasla daha düşük antifungal aktivite sergilediği görülmüştür.

Genel olarak *P. aeruginosa* dışında tüm test mikroorganizmalarında taze sarımsak ekstraktları siyah sarımsak ekstraktlarına göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. Örneğin *E. coli* üzerinde taze sarımsak etil asetat ve kloroform ekstraktları sırasıyla 31.5 ve 32 mm inhibisyon çapı oluştururken; siyah sarımsak ekstraktları 13 ve 25 mm inhibisyon çapı oluşturmuştur (Şekil 1). Ekstrakt içermeyen negatif kontrol denemelerinde herhangi bir inhibisyon gözlenmemiştir. Buradan hareketle gözlemlenen inhibisyon çaplarının tamamen sarımsaktan gelen aktif bileşenlerden kaynaklandığı sonucuna varılmaktadır. Ayrıca çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* suşlarının ampisiline karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. 1 mg/mL düzeyinde itrakonazol *C. albicans* üzerinde 10 mm inhibisyon çapı oluştururken *S. cerevisiae*'da inhibisyon gözlemlenmemiştir.

Tablo 2. Siyah (olgunlaştırılmış) sarımsak ekstraktlarına ait antimikrobiyal aktivite sonuçları (mm inhibisyon çapı)

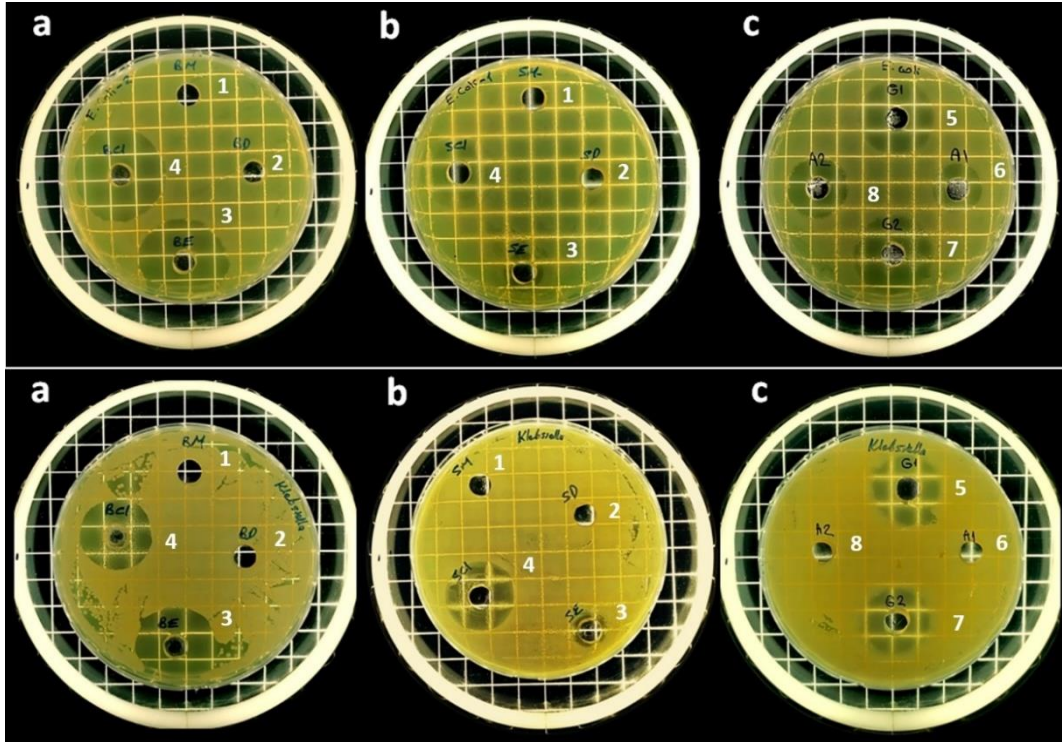
Gruplar	Mikroorganizmalar	Ekstraktlar*				Pozitif Kontrol**			Negatif Kontrol
		Me	Ds	Ea	Kl	Gm	Ap	İk	%10 DMSO
Gram (+) bakteriler	<i>B. subtilis</i>	19	10	26	40	46	63	TE****	İG
	<i>L. monocytogenes</i>	İG	İG	14	İG	38	37.5	TE	İG
	<i>E. faecalis</i>	İG	İG	15	İG	18	40	TE	İG
	<i>S. aureus</i>	İG	İG	28	20	36	42.5	TE	İG
Gram (-) bakteriler	<i>E. coli</i>	İG	İG	13	25	26	21	TE	İG
	<i>S. enteritidis</i>	İG	İG	14	30	31	31	TE	İG
	<i>P. aeruginosa</i>	İG	İG	14	17	31	İG	TE	İG
	<i>K. pneumoniae</i>	İG	İG	10	23	26	İG	TE	İG
Mayalar	<i>S. cerevisiae</i>	İG	İG	9	21	TE	TE	İG	İG
	<i>C. albicans</i>	İG	İG	İG	17	TE	TE	10	İG

* Me: Metanol, Ds: Distile su, Ea: Etil asetat, Kl: Kloroform

** Gm: Gentamisin, Ap: Ampisilin, İk: İtrakonazol

*** İG: İnhibisyon gözlenmedi, 8 mm'den daha küçük inhibisyon çaplarında antimikrobiyal aktivite bulunmadı olarak kabul edilmiştir.

**** TE: Test edilmedi, Bakteriler üzerinde antifungal, mayalar üzerinde antibiyotik ajanlar test edilmemiştir.

**Şekil 1.** Sarımsak ekstraktları ve standart antibiyotik maddelerin *E. coli* (üstte) ile *K. pneumoniae* (altta) üzerine etkisi. (a) Taze sarımsak ekstraktları (b) Siyah sarımsak ekstraktları. (c) Ampisilin ve gentamisin. (1) Metanol ekstraktı. (2) Distile su ekstraktı. (3) Etil asetat ekstraktı. (4) Kloroform ekstraktı. (5) Gentamisin (0.5 mg/mL). (6) Ampisilin (0.5 mg/mL). (7) Gentamisin (1 mg/mL). (8). Ampisilin (1 mg/mL).

4. Tartışma

Sarımsak, yapısında pek çok organosülfid bileşiği içermekte olup; tiyosülfinat gruplarının %80'den fazlasını ise alliin bileşiği oluşturmaktadır. Sarımsak işlenirken alliin amino asidi allinaz enzimi vasıtasıyla hızlıca çok da stabil olmayan allisine dönüştürülür (Kinalski ve Norena, 2014). Sarımsağın antimikrobiyal aktivite göstermesinde

başta allisin olmak üzere tiyosülfinat bileşikler önemli rol oynamaktadır (Bayan vd., 2014; Durairaj vd., 2009). Allisinin *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Proteus* ve *Streptococcal* türleri gibi geniş çapta bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu tespit edilmiştir (Siddique vd., 2019). Bileşiğin antimikrobiyal etki mekanizmasındaki temel faktör çeşitli enzimlerin tiyol grupları ile

reaksiyona girmesinden ileri gelmektedir (Suleiman ve Abdallah, 2014; Siddique vd., 2019). Allisin RNA sentezini tamamen; DNA ve protein sentezini de kısmen inhibe ederek aktivite göstermektedir (Eja vd., 2007). Ajoen de allisin gibi antimikrobiyal etkili bir diğer bileşiktir. Gram (-) bakterilerden ziyade özellikle Gram (+) bakteriler ve mayalar üzerinde daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Kyung, 2012). Ajoenin geniş spektrumlu antifungal özellikleri başta *C. albicans* olmak üzere maya enfeksiyonlarını önlemede oldukça etkilidir (Suleiman ve Abdallah, 2014). Yapısındaki disülfid grupları antimikrobiyal etki göstermesinde elzemdir. Özellikle moleküldeki kükürt atomu sayısının üç veya dörde kadar çıkması bileşiğin antifungal aktivitesini de arttırmaktadır (Kyung, 2012).

Aynı çözücü kullanılarak elde edilmiş sarımsak ekstraktları farklı mikroorganizma grupları üzerinde farklı inhibisyon çapları oluşturmuştur. Özellikle Gram (+) bakteri türlerinin Gram (-) türlere kıyasla sarımsak ekstraktlarına karşı daha duyarlı olmasına hücre duvar yapısındaki farklılığın sebep olduğu düşünülmektedir. Hücre duvarı yapısındaki polisakkarit ve lipit oranları başta allisin olmak üzere sarımsak bileşenlerinin geçirgenliği üzerinde etkilidir (Eja vd., 2007). Gram (+) bakteriler dış katmanda çok da güçlü olmayan bir peptidoglikan tabakasına sahip olup antimikrobiyal ajanlara karşı daha hassastırlar (Yetgin vd., 2018). Gram (-) bakteriler ise Gram (+) türlerden farklı olarak ilave bir dış membran ve periplazmik boşluğa sahiptir. Bu ilave membran lipopolisakkarit yapısından oluşmakta ve antibakteriyel maddelerin geçişine karşı hücreye daha fazla direnç sağlamaktadır (Moşanu vd., 2018). Yüksek oranda fosfolipit içermesi hücre geçirgenliğini azaltan bir etmendir (Moşanu vd., 2018; Yetgin vd., 2018). Geçmiş çalışmalarda sarımsak ekstraktlarının hücre membranında yırtılma ve bütünlüğünde bozulmaya sebebiyet verdiği tespit edilmiştir. Sitoplazmik membranın bozulmasıyla hücre içeriğinde kayıp olmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (Chen vd., 2018). Allisin, *C. albicans* hücre duvarını tahrip ederek antifungal aktivite de göstermektedir (Yetgin vd., 2018).

Allisinin parçalanması sonucu diallil sülfid (DAS), diallil disülfid (DADS), diallil trisülfid (DATS), dithiin ve ajoen gibi diğer tiyosülfinat gruplarının oluştuğu düşünülmektedir (Zhang vd., 2015). Bileşikteki disülfid bağ sayısı arttıkça (sırasıyla 0, 1, 2, 3 ve 4) bileşiğin antimikrobiyal aktivitesinde de artış meydana gelmektedir (Tsao ve Yin,

2001). Sarımsak yağını oluşturan bu bileşiklerin oluşumu sulu ekstraktların antimikrobiyal aktivite göstermemesine neden olmaktadır (Kyung, 2012). Sarımsakların kloroform ve etil asetat ekstraktları hemen hemen tüm test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterirken; benzer bir sonuç metanol ve su ekstraktlarında elde edilememiştir. Bu duruma sarımsak bileşimde yer alan antimikrobiyal etkili bileşenlerin lipofilik karakterde olmasının sebep olduğu düşünülmektedir. Jabar ve Al-Mossawi (2007) çeşitli bakteriler üzerinde doğrudan sarımsak suyu kullanıldığında, sulu ekstraktlara göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite elde edildiğini gözlemlemişlerdir. Victor ve Igeleke (2012) *E.coli*, *S. aureus*, *S. typhi* ve *P. aeruginosa* ile yaptıkları sarımsak antimikrobiyal aktivite testinde 11.32 mg/mL kloroform ekstraktının 22.98 mg/mL metanol ekstraktından fazla inhibisyon çapı oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise taze sarımsağın metanol ve su ekstraktlarında *K. pneumoniae*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* için antimikrobiyal aktivite gözlemlenmezken; etil asetat ve kloroform ekstraktlarının yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Bakht vd., 2011). Benzer şekilde metanolik taze sarımsak ekstraktının *C. albicans* üzerinde bir antifungal etkisi tespit edilememiştir. Bu duruma sarımsak biyoaktif bileşenlerinin metanolde yeterince çözünmemesinin sebep olduğu düşünülmüştür (Suleiman ve Abdallah, 2014). Bu bağlamda elde edilen sonuçlar literatür ile yüksek oranda uyumluluk göstermektedir.

Araştırma sonuçları incelendiğine taze Taşköprü sarımsak ekstraktlarının, siyah sarımsak ekstraktlarına göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği söylenebilir (Tablo 1 ve Tablo 2). Olgunlaştırmada uzun süreli yüksek sıcaklık uygulaması ile birlikte pek çok uçucu bileşenin uzaklaştığı ve bu nedenle siyah sarımsak ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin azaldığı düşünülmektedir. Geçmiş çalışmalar taze sarımsak yağının yoğun olarak DAS, DADS, DAT ve DATS içerdiğini ifade etmektedir (Tsao ve Yin, 2001). Ancak taze sarımsakta tespit edilen bazı uçucu sülfür bileşenleri siyah sarımsakta tespit edilememektedir. Ayrıca DADS, DATS ve diallil tetrasülfidin (DATES) taze sarımsak uçucu bileşenleri arasındaki oranları sırasıyla %21, %21.3 ve %0.21 iken; bu değerler siyah sarımsakta sırasıyla %0.84, %0.86 ve %0.11 seviyelerine düşmektedir (Calle vd., 2017). Ekstraktta tiyosülfinat bileşikleri bulunmadığında antimikrobiyal etkinin de ortadan kalktığı bildirilmektedir (Durairaj vd., 2009). Jung ve Sohn (2014) tarafından yapılan çalışmada taze

sarımsaktan elde edilmiş sulu ekstraktlar pek çok patojenik mikroorganizma türü üzerinde antimikrobiyal etki gösterirken; aksine siyah sarımsaklara ait sulu ekstraktların antimikrobiyal etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada test edilen mikroorganizmalar arasında tek istisnayı *P. aeruginosa* oluşturmuştur. Taze sarımsak ekstraktları ile inhibe edilemeyen *P. aeruginosa* siyah sarımsakların kloroform ve etil asetat ekstraktları ile inhibe edilebilmiştir. Siyah sarımsak üretimi sırasında yüksek sıcaklık etkisiyle açığa çıkan parçalanma ürünlerinin veya konsantre olduğu için miktarı artan bazı sülfütlü bileşiklerin *P. aeruginosa* gelişimini inhibe edildiği varsayılmaktadır. Örneğin, olgunlaştırma işlemiyle sarımsaktaki allil metil sülfid miktarı yaklaşık 5 katına çıkmaktadır (Calle vd., 2017). Yine siyah sarımsakta SAS miktarının taze sarımsağa göre 5-6 kat daha yüksek olduğu bilinmektedir (Nguyen vd., 2017).

Güney Kore'den temin edilen taze ve olgunlaştırılmış sarımsaklara ait distile su ve etanol ekstraktlarının *B. cereus* üremesinde bir inhibisyon yaratmadığı ancak kloroform ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. *S. enteritidis* ve *L. monocytogenes* üzerinde ise taze ve olgunlaştırılmış sarımsakların ne distile su ne de etanol ve kloroform ekstraktlarının herhangi bir antimikrobiyal etkisi görülmemiştir (Jang vd., 2018). Çalışmamızda kullanılan hem taze hem de siyah sarımsaklara ait tüm ekstrakt tipleri *B. subtilis* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterirken; *S. enteritidis* üremesi ise etil asetat ve kloroform ekstraktları ile inhibe edilebilmiştir. Yetgin vd. (2018) Taşköprü bölgesinde yetişen sarımsakların antimikrobiyal aktivitesinin Çin sarımsaklarından fazla olduğu sonucuna varmış olup; coğrafi farklılıkların aktif bileşen içeriğini etkileyebileceğini ifade etmişlerdir.

Ampisilin, hücre duvarı polisakaritlerinin çapraz bağlanmasını düzenleyen transpeptidasyon enzimlerini inhibe ederek hücre duvarı sentezini engellemektedir (Eja vd., 2007). Daha önce, bazı *P. aeruginosa* suşlarının ampisilin direncine sahip olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2020). Çalışmada kullanılan *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* suşlarının sarımsak ekstraktları ile inhibe edilebilmesine karşın; ampisiline karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmaların β -laktamaz aktivitesi sayesinde ampisiline karşı direnç göstermiş olabileceği düşünülmektedir. Çünkü β -laktam grubu antibiyotiklere direnç kazanmanın allisine karşı direnç kazanmaktan çok daha kolay olduğu belirtilmektedir (Jabar ve Al-

Mossawi, 2007). Gentamisin ise ribozomal RNA'ya bağlanarak okunma doğruluğunu düşürmekte ve ribozomun translokasyonunu inhibe etmektedir (Yoshizawa vd., 1998). Etki mekanizmasındaki farklılıktan ötürü *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* suşları gentamisin ile inhibe edilebilmiştir. Antifungal ajan olan itrakonazol, funguslarda ergosterol sentezini sekteye uğratarak aktivite göstermektedir. Ergosterol fungal membranın asıl bileşeni olup membran geçirgenliğini ve membrana bağlı enzimlerin aktivitesini doğrudan etkilemektedir (De Backer vd., 2001). İtrakonazolün lipofilik özellikte olması çeşitli matrislerdeki absorpsiyonun düşük ve değişken olmasına neden olmaktadır. *In vitro* çalışmalar *Candida* türlerinin itrakonazole karşı duyarlı olduğunu (Martin, 1999); ancak *S. cerevisiae*'nin ise nispeten daha dirençli olduğunu göstermektedir (Zerva vd., 1996). Çalışmada elde edilen sonuçlar literatür bilgilerini destekler niteliktedir.

5. Sonuç

Son yıllarda yoğun antibiyotik ve antifungal tüketimine bağlı olarak patojenlerin direnç kazandığı antimikrobiyal ajan sayısı günden güne artış göstermektedir. Bu nedenle patojen türler üzerine antimikrobiyal etkili doğal bileşen arayışları hız kesmeden devam etmektedir. Sarımsak çok eski çağlardan beri alternatif tıpta faydalanılan gıdalardan birisi olup, son yıllarda da piyasadaki ürün çeşitliliğini arttırmış durumdadır. Bunlardan birisi olan siyah sarımsak nispeten daha az kokulu, yoğun fenolik ve S-allil sistein içeriğine sahip önemli bir sarımsak ürünüdür. Araştırma sonuçları Taşköprü sarımsak ekstraktlarının dikkate değer antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu açıdan, Taşköprü sarımsaklarının gıda ve tıp alanında patojenlerle mücadelede umut vaat eden bir gıda ve antimikrobiyal bileşen kaynağı olduğu söylenebilir. Ayrıca taze Taşköprü sarımsağının, olgunlaştırılmış siyah formuna göre antimikrobiyal aktivitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada antimikrobiyal özellikteki bileşenlerin eldesinde çözücü seçiminin oldukça önemli bir parametre olduğu sonucuna varılmıştır. Genel olarak kloroform ve etil asetat gibi polaritesi daha düşük çözücülerle elde edilen ekstraktlar metanol ve su gibi polar çözücü ekstraktlarına kıyasla daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermişlerdir. İlerleyen çalışmalarda apolar çözücü ekstraktlarında mevcut olan biyoaktif bileşenler ve etki mekanizmalarının daha detaylı incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Bae, S.E., Cho, S.Y., Won, Y.D., Lee, S.H. ve Park, H.J., 2014. Changes in S-allyl cysteine Contents and Physicochemical Properties of Black Garlic During Heat Treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 397-402. doi: 10.1016/j.lwt.2013.05.006.
- Bakht, J., Tayyab, M., Ali, H., Islam, A. ve Shafi, M., 2011. Effect of Different Solvent Extracted Sample of *Allium sativum* (Linn) on Bacteria and Fungi. *African Journal of Biotechnology*, 10(31), 5910-5915.
- Bayan L., Koulivand, P.H. ve Gorji, A. 2014. Garlic: A Review of Potential Therapeutic Effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(1), 1-14.
- Calle, M.M., Capote, F.P., de Castro, M.D.L., 2017. Headspace-GC-MS Volatile Profile of Black Garlic vs Fresh Garlic: Evolution Along Fermentation and Behavior Under Heating. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 98-105. doi: 10.1016/j.lwt.2017.02.010.
- Chen, C., Liu, C.H., Cai, J., Zhang, W., Qi, W.L., Wang, Z., Liu, Z.B. ve Yang, Y., 2018. Broad-spectrum Antimicrobial Activity, Chemical Composition and Mechanism of Action of Garlic (*Allium sativum*) Extracts. *Food Control*, 86, 117-125. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.11.015.
- De Backer, M.D., Ilyina, T., Ma, X.J., Vandoninck, S., Luyten, W.H.M.L. ve Bossche, H.V., 2001. Genomic Profiling of the Response of *Candida albicans* to Itraconazole Treatment Using a DNA Microarray. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1660-1670. doi: 10.1128/AAC.45.6.1660-1670.2001.
- Durairaj, S., Srinivasan, S. ve Lakshmanaperumalsamy, P., 2009. In vitro Antibacterial Activity and Stability of Garlic Extract at Different pH and Temperature. *Electronic Journal of Biology*, 5(1), 5-10.
- Dziri, S., Casabianca, H., Hanchi, B. ve Hosni, K., 2019. Composition of Garlic Essential Oil (*Allium sativum* L.) as Influenced by Drying Method. *Journal of Essential Oil Research*, 26(2), 91-96. doi: 10.1080/10412905.2013.868329.
- Eja, M.E., Asikong, B.E., Abriba, C., Arikpo, G.E., Anwan, E.E. ve Idoh, KHE., 2007. A Comparative Assessment of the Antimicrobial Effects of Garlic (*Allium sativum*) and Antibiotics on Diarrheagenic Organisms. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 38(2), 343-348.
- FAO, 2020. Food and Agricultural Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. 31 Mayıs 2020.
- Jabar, M.A. ve Al-Mossawi, A., 2007. Susceptibility of Some Multiple Resistant Bacteria to Garlic Extract. *African Journal of Biotechnology*, 6(6), 771-776.
- Jang, H.J., Lee, H.J., Yoon, D.K., Ji, D.S., Kim, J.H. ve Lee, C.H., 2018. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Fresh Garlic and Aged Garlic By-products Extracted with Different Solvents. *Food Science and Biotechnology*, 27(1), 219-225. doi: 10.1007/s10068-017-0246-4.
- Jung, C. ve Sohn, H.Y., 2014. Antioxidation, Antimicrobial and Antithrombosis Activities of Aged Black Garlic (*Allium sativum* L.). *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 42(3), 285-292 (in Korean). doi: 10.4014/kjmb.1407.07002.
- Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Belghith, L., Bouaziz, F., Ghorbel, R. ve Chaabouni, S.E., 2014. Garlic (*Allium sativum* L.) Husk Waste As A Potential Source of Phenolic Compounds: Influence of Extracting Solvents on Its Antimicrobial and Antioxidant Properties. *Industrial Crops and Products*, 62, 34-41. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.07.047.
- Kang, O.J., 2016. Physicochemical Characteristics of Black Garlic After Different Thermal Processing Steps. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21(4), 348-354. doi: 10.3746/pnf.2016.21.4.348.
- Kim, N.Y., Park, M.H., Jang, E.Y. ve Lee, J.H., 2011. Volatile Distribution in Garlic (*Allium sativum* L.) by Solid Phase Microextraction (SPME) with Different Processing Conditions. *Food Science and Biotechnology*, 20(3), 775-782. doi: 10.1007/s10068-011-0108-4.
- Kinalski, T. ve Norena, C.P.Z., 2014. Effect of Blanching Treatments on Antioxidant Activity and Thiosulfinate Degradation of Garlic (*Allium sativum* L.). *Food and Bioprocess Technology*, 7, 2152-2157. doi: 10.1007/s11947-014-1282-1.
- Kyung, H.K., 2012. Antimicrobial Properties of Allium Species. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 142-147. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.004.
- Martin, M.V., 1999. The Use of Fluconazole and Itraconazole in the Treatment of *Candida albicans* Infections: A Review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 429-437.
- Moşanu, A.G., Cojocari, D., Balan, G. ve Sturza, R., 2018. Antimicrobial Activity of Rose Hip and Hawthorn Powders on Pathogenic Bacteria.

- Journal of Engineering Science, 25(4), 100-107. doi: 10.5281/zenodo.2576764.
- Nguyen, N., Giang, M. ve Nguyen. T., 2017. Biological Activities of Black Garlic Fermented with *Lactobacillus plantarum* PN05 and Some Kinds of Black Garlic Presenting Inside Vietnam. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 51(4), 672-678.
- Okeke, M.I., Iroegbu, C.U., Eze, E.N., Okoli, A.S. ve Esimone, C.O., 2001. Evaluation of Extracts of the Root of *Landolphia owerrience* for Antibacterial Activity. Journal of Ethnopharmacology, 78, 119-127.
- Shang, A., Cao, S.Y., Xu, X.Y., Gan, R.Y., Tang, G.Y., Corke, H., Mavumengwana, V. ve Li, H.B., 2019. Bioactive Compounds and Biological Functions of Garlic (*Allium sativum* L.). Foods, 8, 246. doi: 10.3390/foods8070246.
- Siddique, R., Anjaneyulu, K. ve Muralidharan, N.P., 2019. Antimicrobial Efficacy of Garlic-Lemon in Comparison with Sodium Hypochlorite Against *E. faecalis*. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 13(1), ZC55-ZC58. doi: 10.7860/JCDR/2019/37745.12527.
- Suleiman, E.A. ve Abdallah, W.B., 2014. In vitro Activity of Garlic (*Allium sativum*) on Some Pathogenic Fungi. European Journal of Medicinal Plants, 4(10), 1240-1250.
- Tsao, S.M. ve Yin, M.C., 2001. In vitro Antimicrobial Activity of Four Diallyl Sulphides Occuring Naturally in Garlic and Chinese Leak Oils. Journal of Medical Microbiology, 50, 646-649.
- TSE, 2010. Türk Patent Enstitüsü ve Marka Kurumu, Coğrafi İşaretler, Taşköprü Sarımsağı, Dosya No: C2009/010, <https://www.ci.gov.tr/cografii-isaretler/detay/38009>. 8 Şubat 2020.
- TÜİK, 2020. Türkiye İstatistik Kurumu, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/>. 31 Mayıs 2020.
- Victor, I.U. ve Igeleke, C.L., 2012. Antimicrobial Properties of the Extracts of Locally Sold Garlic and Neem Leaf in Benin City, Nigeria. International Journal of Biosciences, 2(4), 21-27.
- Wang, Y., Liang, Y. ve Cock, I.E., 2020. *Rosa canina* L. Fruit Extracts Inhibit the Growth of Bacterial Triggers of Some Autoimmune Inflammatory Diseases and Potentiate the Activity of Conventional Antibiotics. Pharmacognosy Communications, 10(1), 7-17. doi: 10.5530/pc.2020.1.3.
- Yetgin, A., Canlı, K. ve Altuner, E.M., 2018. Comparison of Antimicrobial Activity of *Allium sativum* Cloves from China and Taşköprü, Turkey. Advances in Pharmacological Sciences, 1-5. doi: 10.1155/2018/9302840
- Yoshizawa, S., Fourmy, D. ve Puglisi, J.D., 1998. Structural Origins of Gentamicin Antibiotic Action. The EMBO Journal, 17(22), 6437-6448.
- Yoo, M., Lee, S., Kim, S., Hwang, J.B., Choe, J. ve Shin, D., 2014. Composition of Organosulfur Compounds from Cool- and Warm-type Garlic (*Allium sativum* L.) in Korea. Food Science and Biotechnology, 23(2), 337-344.
- Zerva, L., Hollis, R.J. ve Pfaller, M.A., 1996. In vitro Susceptibility Testing and DNA Typing of *Saccharomyces cerevisiae* Clinical Isolates. Journal of Clinical Microbiology, 34(12), 3031-3034.
- Zhang, Z., Lei, M., Liu, R., Gao, Y., Xu, M. ve Zhang, M., 2015. Evaluation of Alliin, Saccharide Contents and Antioxidant Activities of Black Garlic During Thermal Processing. Journal of Food Biochemistry, 39, 39-47. doi: 10.1111/jfbc.12102.