

*Araştırma Makalesi / Research Article*

**Probiyotik Maya Olarak *Saccharomyces cerevisiae*'nın Gelişimine *Citrus limon* (L.) Burm. f. (Limon)'un Bazı Fitokimyasal Etkileri**

Pınar ERECEVİT<sup>1\*</sup>, Sevda KIRBAĞ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Munzur Üniversitesi, Pertek Sakine Genç Meslek Yüksek Okulu, Gıda İşleme Bölümü, TR 62500-  
Pertek/Tunceli/Türkiye

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 23119-Elazığ/Türkiye

**Özet**

Bu çalışmada; besin olarak tüketilen *Citrus limon* (L.) Burm. f. (limon) ile muamele edilen *Saccharomyces cerevisiae* ekstraktlarının yağ asidi, vitamin, fitosterol, flavonoid ve resveratrol içerikleri ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenerek karşılaştırmalar yapıldı.

Elde edilen sonuçlara göre; limon ekstraktındaki toplam yağ asidi düzeylerinin belirgin, vitamin ve fitosteroller içeriklerinin kısmi seviyelerde olduğu gözlemlendi. *S. cerevisiae* ile hazırlanan limon ekstraktlarının toplam yağ asidi düzeylerinin çok belirgin, vitamin içeriklerinin farklı miktarlarda arttığı, flavonoid içeriklerinin ise farklı oranlarda azaldığı saptandı. Çalışmada limonun değişen oranlarda antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu görüldü. *S. cerevisiae* içeren limon ekstraktlarının ise antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde yağ asidi ekstraktlarının tüm bakteri, maya ve dermatofit funguslarda değişen oranlarda etkili olduğu görülürken, vitamin ekstraktlarının *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5 ve flavonoid ekstraktlarının ise *Bacillus megaterium* DSM 32, *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Trichophyton* sp. dışındaki tüm mikroorganizmalarda az miktarlarda antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptandı.

Sonuç olarak; besinsel lif kaynağı olan limonun, bu çalışmada kullanılan potansiyel probiyotik olarak kabul edilen *S. cerevisiae* için hem enerji kaynağı hemde olumlu yönde etkilerinin olduğu ve limondan elde edilen ekstraktlar içerisinde gelişen bu maya türünün faydalı bitkisel biyolojik bileşiklere değişen oranlarda etki gösterdiği saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** *Saccharomyces cerevisiae*, Yağ Asidi, Vitamin, Fitosterol, Antimikrobiyal Aktivite.

**Determination of Phytochemical Characteristics of *Citrus limon* (L.) Burm. f. (Lemon) on the development of *Saccharomyces cerevisiae* as probiotic yeast**

**Abstract**

In this study; fatty acid, vitamin, phytosterol, flavonoid and resveratrol contents and antimicrobial activities of *Citrus limon* (L.) Burm. f. (lemon) extracts treated with *Saccharomyces cerevisiae* were determined and compared. *C. limon* (L.) Burm. f. (lemon) is consumed as food worldwide both by humans and animals.

According to the results obtained; it was observed that total fatty acid contents in lemon extract were at certain levels and vitamin and phytosterol contents were at moderately significant. It was detected that total fatty acid levels of lemon extracts prepared with *S. cerevisiae* increased at significantly high and vitamin contents on the other hand increased at different rates; however, flavonoid contents decreased at different rates. In the study, it was noticed that Lemon had antioxidant and antimicrobial activities at changing rates.

When antimicrobial activities of lemon extracts containing *S. cerevisiae* were analyzed, it was observed that they had effect at changing rates against all of the bacteria, yeasts and dermatophyte fungi of fatty acid extracts. On the other hand, vitamin and flavonoid extracts demonstrated scarcely any antimicrobial activity against all of the microorganisms except *E. coli*, *K. pneumoniae* and *B. megaterium*, *S. aureus*, *Trichophyton* sp.

In conclusion, it was detected that lemon, which is known as dietary fiber source, had both energy source and positive effects for the development of *S. cerevisiae* used in this study which is also accepted as a potential probiotic. It was observed that this yeast type developing in extracts obtained from lemon affected beneficial phto- bioactive compounds at changing rates.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, Fatty Acid, Phytosterol, Vitamin, Antimicrobial Activity.

\* Sorumlu yazar: [perecevit@munzur.edu.tr](mailto:perecevit@munzur.edu.tr); [pinarerecevit@hotmail.com](mailto:pinarerecevit@hotmail.com)

Geliş Tarihi: 16/12/2016 Kabul Tarihi: 29/09/2017

## 1. Giriş

Probiyotik kültürler, bağırsakta doğal olarak bulunan mikroorganizma popülasyonunu olumlu yönde değiştirerek, insan ya da hayvan sağlığı üzerinde yararlı etkiler yaratan tek veya karışık kültürler olarak tanımlanmaktadır. Mide bağırsakta bulunan mikroorganizmalar ile konakçı arasında bir denge vardır. Bu denge bozulduğu zaman klinik hastalıklar oluşur. Son yıllarda bağışıklık ile sağlıklı yaşam arasındaki ilişki üzerine çalışmalar artmış ve bu çalışmalar sonunda da sindirim sisteminin mikrobiyal dengesi ile sağlıklı beslenme ve yaşam arasında doğrudan bir ilişki olduğu netlik kazanmıştır [1].

Hamur mayası olarak bilinen ve fırıncılık endüstrisinde yaygın olarak kullanılan *S. cerevisiae*, gastroenterit tedavisi için probiyotik olarak, endojen floranın ve immün sistemin düzenlenmesinde kullanıldığı, probiyotiklerin besinsel kaynaklarından kefir tanelerinde fungal mikrobiyota'da bulunduğu, istenmeyen mikroorganizmaların gelişiminin engellenmesi ve enzim üretimi gibi birçok önemli etkilerinin olduğu ifade edilmiştir [2-9]. Aynı zamanda vücudumuz için yararlı olan bu mikroorganizmaların beslenmesi için prebiyotikler gereklidir [10]. Prebiyotik kaynak olarak sindirilemeyen karbonhidratların üzerinde daha çok durulmaktadır [11]. Prebiyotiklerin insan ve hayvan sağlığı üzerine olumlu etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır [12-15].

Doğadaki mikro-organizmaların insan sağlığına olan olumlu etkilerine dikkat çekmek amacıyla, son yıllarda probiyotik- prebiyotik konusu üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada hazım kolaylaştırıcı ve besinsel lif kaynağı olarak bilinen limonun, potansiyel probiyotik olan *S. cerevisiae*'nin gelişimine nasıl etki ettiği araştırılarak bazı fitokimyasal özellikleri karşılaştırılmıştır. Böylece bitkisel olarak beslenmenin canlıların sağlığına yararlı olan probiyotik- prebiyotik ilişkisi üzerine yapacağı olumlu etki bakımından çalışmanın önemi vurgulanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan limon örnekleri Elazığ ilinden temin edildi. Kabuk kısımları ile birlikte ekstrakt edilinceye kadar -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

### 2.1. Şeker Analizi

10 g limon örneği distile su ile homojenize edildi. Daha sonra santrifüj edilip (5000 rpm+4 °C) pellet ile süpernatant kısmı ayrıldı. Toplam filtratın hacmi belirlendikten sonra HPLC cihazı ile analiz edildi ve Shim-Pack HRC NH<sub>2</sub> (150x4.6 mm, 5µ.) kolonu kullanıldı. Mobil faz olarak Asetonitril+Su (v/v) (%75/%25) karışımı kullanıldı [16].

### 2.2. Lipid Ekstraksiyonu

Örnek 50/200 oranında metanol ile hazırlanıp steril cam erlene bırakıldı. Ekstrakt blenderda çözücüler içerisinde parçalanmasıyla elde edildi. Parçalama işleminden sonra santrifüj edilip (5000 rpm+4 °C) elde edilen süpernatandan rotavapor kullanılarak çözücüler ortamdan uzaklaştırıldı. Yaş ağırlığı belirlenen hücre pelletleri 3/2 (v/v) Hekzan-İzopropanol karışımı ile homojenize edildi. 5000 rpm'de 4 C°'de 5dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı yağ asidi ve ADEK vitamin analizi için kullanıldı [17]. Alınan ağırlıklar total yağ asidi miktarının hesaplanmasında kullanıldı.

### 2.3. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Gaz Kromatografik Analizi

Süpernatant kısmından 5 mL örnek alınıp üzerine 5 mL %2'lik metanolik sülfirik asit (2 mL sülfirik asite yavaş yavaş 98 mL metanol eklenerek hazırlanır) ilave edildi. Vortekslelendikten sonra 50° C'de 12 saat bırakıldı ve oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra üzerine 5 mL % 5'lik sodyum klorür (NaCl) çözeltisi ilave edilerek vortekslelendi. Yağ asidi metil esterleri 5 mL hekzan ile ekstrakte edildi. Bu karışım 5 mL % 2'lik KHCO<sub>3</sub> çözeltisi ile muamele edildikten sonra, hekzan fazı azot akımı ile uçuruldu ve 1 mL hekzanda çözülerek yağ asidi metil esterlerine dönüştürüldü. Yağ asidi metil esterleri analizi SHIMADZU GC 17 cihazıyla yapıldı [18, 19].

## 2.4. ADEK Vitaminleri ve Sterol Miktarının HPLC Cihazı ile Analizi

Süpernatant kısmından alınan 5 mL örnek üzerine % 5'lik KOH çözeltisi ilave edilip vortekslendi ve 85 °C'de 15 dk. bekletildi. Sonra oda sıcaklığı düzeyinde soğutuldu ve üzerine 5 mL saf su ilave edildi ve vortekslendi. Lipofilik moleküller 2x5 mL hekzan ile muamele edildikten sonra ortamdaki hekzan uzaklaştırıldı. Sonra 1 mL (%50+%50, v/v) asetonitril/metanol karışımında çözdürülüp HPLC cihazı ile analiz edildi [20, 21].

## 2.5. Fitosterollerin Ekstraksiyonu ve Analizi

Hekzan/izopropil alkol karışımı (3/2 v/v oranında) ile homojenize edilen limon örneği üzerine % 5'lik KOH ilave edildi ve 85 °C'de hidroliz edildi. Ekstraksiyon n-heptan ile muamele edildi.

Analiz, Shimadzu marka HPLC cihazı ile yapıldı. Cihazda pompa olarak LC-10 ADVP UV-visible detectör olarak SPD-10AVP, kolon firması olarak CTO-10ASVP, otosampler olarak SIL-10ADVP, degasser ünitesi olarak DGU-14A ve Class VP software (Shimadzu, Kyota Japan), mobil faz olarak asetonitril/metanol (%60+%40, v/v) karışımı kullanıldı. Mobil faz akış hızı 1ml olarak belirlendi. Analiz için UV dedektör kullanıldı. Kolon olarak da Süpelcosil LC 18 (15x4.6 cm, 5 µm; Sigma, USA) kolonu kullanıldı. A vitamini için dedeksiyon dalga boyu 326 nm, E vitamini için 202 nm, D ve K vitaminleri için 265 nm kullanıldı [20].

## 2.6. Resveratrol ve Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Flavonoidlerin kromatografik analizi için 5 µm iç çapında PREVAIL C18 (15x4.6 mm) ters-faz kolon kullanıldı. Mobil faz olarak %1 asetik asit içeren metanol/su/asetonitril (46/46/8, v/v/v) karışımı kullanıldı. Flavonoid ve resveratrol analizi HPLC cihazında yapıldı ve tüm işlemler 25 °C'de gerçekleştirildi [22].

## 2.7. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

Serbest radikal 25 mg/L DPPH metanolik çözelti hazırlandı. Deney sırasında 3.9 mL DPPH radikalının metanolik çözeltisi üzerine 25, 50, 100 ve 250 µL konsantrasyonlarda bitki örnekleri ilave edilip vortekslendi ve oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 30 dakika inkübe edildi. Absorbans değerleri için 517 nm'de blanka karşı spektrofotometrede okundu [23, 24].

Radikal temizleme aktivitesi % olarak hesaplandı. DPPH radikal temizleme aktivitesi; (%)=[(Kontrolλ-Örnekλ)/(Kontrolλ)]x100 formülü ile hesaplandı.

## 2.8. Antimikrobiyal Aktivite

### 2.8.1. Çalışmada Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Çalışmada probiyotik maya olarak kullanılan; *Saccharomyces cerevisiae* Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edilerek, ekstraktların antimikrobiyal etkilerinin test edilmesinde kullanılan patojen mikroorganizmalardan; *Staphylococcus aureus* COWAN 1, *Bacillus megaterium* DSM 32, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Escherichia coli* ATCC 25922 bakterileri, *Candida albicans* FMC 17, *Candida glabrata* ATCC 66032 mayaları, *Trichophyton* sp., *Epidermophyton* sp. dermatofit fungus türleri de aynı kültür koleksiyonundan sağlandı.

### 2.8.2. Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması ve Ekim

Bakteri suşları; Nutrient Buyyon'a aşılansak 35±1°C'de 24 saat, maya suşları; Yeast Malt Ekstrakt Buyyon'da ve dermatofit funguslar Glukozlu Sabouroud Buyyon'da 25±1°C'de 48 saat süre ile inkübe edildi. Sıvı besiyerinde gelişen kültürler, Mc Farland (0.5) standart tüpüne göre bulanıklık ayarı yapıldıktan sonra buyyon tüplerine aktarıldı. Erlenmayerde steril edilen ve 45-50°C'ye kadar soğutulan Müller Hinton Agar, Yeast Malt Ekstrakt Agar ve Sabouraud Dextrose Agar yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanıp bakteri, maya ve fungusların buyyondaki kültürü ile %1 (kültür

örneklerinin alınacağı halkalı özenin çapı 0.01 mL sıvı alacak şekilde olmalı) oranında aşılansarak ( $10^6$  bakteri/ mL,  $10^4$  maya/ mL,  $10^4$  fungus/ mL) iyice çalkalandıktan sonra 9 cm çapındaki steril petri kutularına 15'er mL konuldu ve besiyerinin homojen bir şekilde dağılması sağlanmış oldu.

### 2.8.3. Oyuk Agar Metodu

Her mikroorganizma için ayrı olarak agar hazırlandı. Bakteriler; müller hinton agara içine ekim, mayalar; yeast malt ekstrakt agara ve dermatofit funguslar; sabouraud dextrose agara yüzeysel ekim yapıldı. Katılaştıran agar üzerine 6 mm çapında oyuk açıldı. Açılan oyuklara bir damla besiyerinden sonra 10 µL flavanoid, vitamin, yağ asidi örnekleri direkt olarak aktarıldı. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C'de 1.5-2 saat bekletildikten sonra bakteri aşılansan plaklar  $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 24 saat, maya ve dermatofit aşılansan plaklar ise  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 3 gün süre ile inkübe edildi. Çalışma 3 paralel olarak yürütülerek ve sonuçlar ortalama değer olarak inhibisyon zonu (mm) şeklinde değerlendirildi [25, 26].

### 2.9. *Saccharomyces cerevisiae*'nın Geliştirilmesi ve *Citrus limon* (limon) Ekstraktı ile Muamele Edilmesi

*S. cerevisiae*'nin gelişimi ve çoğalması için Yeast Malt Ekstrakt Buyyon'a ekimi yapıldı. Spektrofotometre'de 517 nm'de absorbans değerleri okunduktan sonra hazırlanan minimal besiyeri ve (0.019 M NaCl, 0.022 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.049 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.019 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.002 M  $\text{MgSO}_4$ , 0.011 M Glukoz) [27] limon ekstraktınının olduğu ortama steril şartlarda *S. cerevisiae*'nin buyyondaki kültürü ile %1 oranında aşılansarak ( $10^4$  maya/ mL) uygun pH (4.8) ortamı sağlandı. Minimal besiyerinde gelişim gösteren ekstraktlar alınıp canlı hücre sayımı için 6 h., 12 h., 24 h., 36 h., 48 h., 60 h. ve 72 h.'de spektrofotometre de 517 nm'de okunduktan sonra Malt Ekstakt Agar'a ekim yapılarak inkübasyona bırakıldı ve koloni sayımlarına bakıldı. Gelişim durma noktasına geldiği anda örnekler santrifüj edilerek pelletleri toplandı. Bu pelletlerin yağ asidi, vitamin, flavonoid ve resveratrol ile antimikrobiyal aktiviteleri incelendi. Kontrol grubu olarak aynı işlemler sadece minimal besiyeri ortamında geliştirilen *S. cerevisiae* ve limon üzerinde de uygulandı ve kıyaslamalar yapıldı. Çalışmalar 3 paralel halinde yürütüldü.

### 2.10. İstatistik Analizi

SPSS 15.0 software programı istatistik analiz için kullanıldı. ANOVA ve LSD testleri de gruplar ve kontrol grubu (limon ve *S. cerevisiae*) arasındaki karşılaştırmalar için kullanıldı. Sonuçlar mean  $\pm$  SEM olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıkların yorumlanmasında  $p < 0.001$  (çok yüksek istatistiksel anlamlılık),  $p < 0.01$  (kısmen istatistiksel anlamlılık),  $p < 0.05$  (Çok az istatistiksel anlamlılık) kullanıldı.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3. 1.Şeker Analizi Sonuçları

Limon ekstraktının şeker analizi sonuçları incelendiğinde (Tablo 1); maltoz, fruktoz, glukoz miktarının yüksek düzeylerde bulunduğu görüldü.

**Tablo 1.** *Citrus limon* (limon) ekstratının şeker içerikleri

Şeker	LM
Arabinoz	0.0001 $\pm$ 0.00002
Fruktoz	<b>0.0575<math>\pm</math>0.00005</b>
Glukoz	<b>0.0837<math>\pm</math>0.00001</b>
Sakkaroz	0.0294 $\pm$ 0.00001
Maltoz	<b>0.0340<math>\pm</math>0.0001</b>

LM:Limon

### 3.2. Yağ Asidi, Vitamin, Fitosterol, Flavonoid ve Resveratrol İçerikleri

#### 3.2.1. Yağ Asidi

Limon ekstraktlarının yağ asidi içerikleri incelendiğinde sırasıyla (Tablo 2); palmitik asit (16:0), oleik asit (18:1), linoleik asidin (18:2), linolenik asit (18:3) bulunduğu ve 16:0, 18:2'yi yüksek düzeyler de içerdiği gözlemlendi. *S. cerevisiae* ile muamele edilmiş limon ekstraktlarının kontrol grubu limon ve *S. cerevisiae*'ya göre kıyaslandığında; 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 miktarlarının çok önemli seviyede ( $p<0.0001$ ,  $p<0.001$ ), 16:0 miktarlarının çok düşük seviyede arttığı tespit edildi ( $p<0.05$ ). Bu durum probiyotik olarak kabul edilen *S. cerevisiae*'nın limon ekstraktı ile simbiyotik olarak bir arada bulunup, ortamdaki karbon kaynağından etkilenecek yağ asidi sentezinden sorumlu enzimleri aktive ettiğini göstermektedir. Böylece *S. cerevisiae*'nın gelişimini destekleyen bu ortamın yağ asidi içeriğinde yükselmeler gösterdiği sonucuna varıldı. Yapılan çalışmalarda *Citrus sinensis*, *C. paradisi*, *C. limon*, *C. aurantifolia* türlerinde palmitik asit (16:0), palmitoleik asit (16:1), oleik (18:1), linoleik (18:2) ve linolenik (18:3) asitin bulunduğu, toplam yağ asidi içeriğinin ise %92 den fazla olduğu [28], *Citrus sinensis*, *C. paradisi*, *C. limon aurantifolia* ve *C. limettoides* saks ile yapılan çalışmada bu dört türün yağ asidi içeriği incelendiğinde; 16/16:1'in her ekstrakt için farklı seviyelerde olduğu, linoleik asitin bulunduğu belirtilmiştir [29].

**Tablo 2.** *S. cerevisiae* ile muamele edilen *Citrus limon* (limon)'un yağ asidi düzeyleri ( $\mu\text{g/g}$ )

Yağ Asidi	LM+SC	LM	SC
16:0	105.23±1.00 <sup>b</sup>	93.73±0.08	44.19±4.14
16:1	172.43±3.29 <sup>d</sup>	-	<b>264.00±0.38<sup>cd</sup></b>
18:0	98.00±1.09 <sup>d</sup>	46.00±0.08	26.00±2.08
18:1	<b>267.53±5.20<sup>cd</sup></b>	-	124.60±0.05
18:2	<b>785.76±4.01<sup>cd</sup></b>	89.23±0.26	43.16±2.88
18:3	159.00±4.53 <sup>d</sup>	57.63±0.120	43.23±4.34
Total $\mu\text{g/g}$	<b>1532.43±44.07<sup>cd</sup></b>	<b>286.60±0.23</b>	<b>545.49±0.24</b>

LM+SC: Limon+S. cerevisiae, LM: Limon SC: S. cerevisiae, 16:0: palmitik asit, 16:1: palmitoleik asit, 18:0: stearik asit, 18:1: oleik asit, 18:2: linoleik asit, 18:3: linolenik asit, cd:  $p<0.0001$ , d:  $p<0.001$ , c:  $p<0.01$ , b:  $p<0.05$

#### 3.2.2. Fitosterol ve Vitamin Analiz Sonuçları

Limon ekstraktları vitamin ve fitosterol içerikleri bakımından incelendiğinde (Tablo 3); K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, D vitamini  $\delta$ -tokoferol  $\alpha$ -tokoferol, ergosterol, fitosterollerden; stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol'un bulunduğu saptandı. *S. cerevisiae* ile muamele edilen limon ekstraktlarının kontrol grubu limon ve *S. cerevisiae* ile kıyaslandığında D vitamini, retinol ve retinol asetat miktarının çok az ( $p<0.05$ ); K<sub>1</sub>, ergosterol,  $\delta$ -tokoferol'un anlamlı seviyelerde ( $p<0.001$ ); K<sub>2</sub> vitamini,  $\alpha$ -tokoferol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol'un ise çok daha anlamlı seviyelerde ( $p<0.0001$ ) yükseldiği tespit edildi. Buna göre limon ekstraktının, *S. cerevisiae*'nın gelişimini olumlu yönde etkilemesi sonucunda vitamin ve fitosterol üretiminde artışın olduğu düşünülmektedir.

Sadece limon üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada birkaç limon kabuğu ve çekirdeğinden hazırlanan metanol ekstraktlarının antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve fenolik asit ve flavonol içeriklerine karşın yüksek oranlarda flavon ve glukosilat içerdikleri [30], yine başka bir çalışmada; limon meyvesinde C vitamini,  $\beta$ -karoten, flavonoid, limonoid, folik asit ve bitkisel bir polisakarit olan diyet lifi gibi bileşiklerin mevcut olduğu ve bu biyoaktif bileşiklerin koruyucu etkiye sahip oldukları buna bağlı olarak antioksidan aktivite gösterdikleri belirtilmiştir [31].

#### 3.2.3. Flavonoid İçerikleri ve DPPH Radikal Temizleme Etkisi

Limon da rutin, kuarsetin, kamferol, kateşin, naringin, naringenin ve resveratrol'un mevcut olduğu; mirisetin ve morin'in olmadığı ve bu bitkide rutin, kateşin, naringin, kamferol ve naringenin miktarlarının diğer fenolik bileşiklere kıyasla daha yüksek oranlarda bulunduğu belirlendi (Tablo 4). *S.*

*cerevisiae* ile muamele edilen limon ekstraktında ise; limon'a göre (kontrol), rutin, kateşin, naringinin, kamferol, naringenin, kuarsetin ve resveratrolün limona göre farklı seviyelerde azaldığı saptandı ( $p<0.0001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.05$ ). Flavonoidler dahil fenolik bileşikler lipid serbest radikallerini yok ederek yada serbest radikallerde bulunan hidroperoksitlerin ayrışmasını önleyerek antioksidan aktivite gösterdiği için oldukça önemli bitki bileşenleridir [32, 33]. Sonuç olarak fenolik bileşiklerdeki azalma *S. cerevisiae*'nın limondaki bu bileşikleri kullandığının bir belirtisidir.

Yapılan birçok çalışmada limon meyvesinin içerdiği naringin ve limonin bileşiklerinin bulunduğu ayrıca pektin ve diyet lifi bakımından bitkisel bir kaynak olduğu [34], vitamin, flavonoid, karatenoid, mineral ve diyet lifi bakımından zengin olan limon meyvesinin sağlığa faydalı biyoaktif bileşikler olduğu [35], *Citrus myrtifolia* Raf. ekstraktlarının süperoksit ve radikal temizleme aktivitesinin çok etkin düzeylerde olduğu tespit edilmiştir [36].

Limonun DPPH ( $\alpha,\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) serbest radikalini temizleme etkisi incelendiğinde gittikçe artan bir antioksidan etkiye sahip olduğu ve özellikle 100-250  $\mu$ l'lik konsantrasyon da belirgin bir etki gösterdiği bulundu (Şekil 1).

Limonda bulunan limonoid, limonin, nomilin ve glukozid bileşiklerinin 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radikal temizleme aktivitesini düşük seviyelerde olduğu [37], limonda bulunan limonoid, flavonoid, kumarin gibi fenolik bileşiklerin antioksidan özelliği üzerine yapılan bir çalışmada, limonin, limonin glukozid, neorositrin gibi bileşiklerin güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir [38].

**Tablo 3.** *S. cerevisiae* ile muamele edilen *Citrus limon* (limon)'un vitamin ve fitosterol düzeyleri ( $\mu$ g/g)

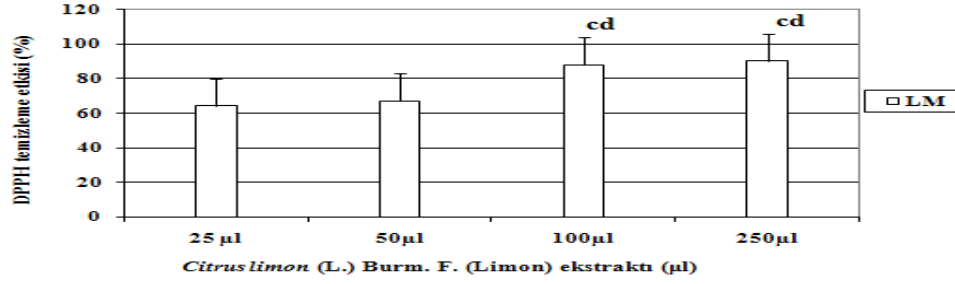
Lipofilik vitaminler ve fitosteroller	LM +SC	LM	SC
Vitamin K <sub>1</sub>	0.025±0.00 <sup>d</sup>	0.0008±0.0004	0.0022±0.0003
Vitamin K <sub>2</sub>	<b>0.0056±0.00</b> <sup>cd</sup>	0.0002±0.0001	0.0020±0.0007
Vitamin D	0.0076±0.001 <sup>c</sup>	<b>0.0064±0.0028</b>	0.0020±0.00007
$\alpha$ Tokoferol	<b>0.24±0.003</b> <sup>cd</sup>	<b>0.0089±0.009</b>	0.040±0.0011
$\delta$ Tokoferol	0.0033±0.00 <sup>d</sup>	0.0001±0.0001	0.0005±0.0001
Retinol	0.0008±0.00 <sup>b</sup>	-	-
Retinol Asetat	0.0001±0.00 <sup>b</sup>	-	0.0002±0.00
$\beta$ -sitositerol	<b>0.87±0.0003</b> <sup>cd</sup>	<b>0.049±0.0067</b>	<b>0.31±0.008</b>
Stigmasterol	<b>0.72±0.003</b> <sup>cd</sup>	<b>0.015±0.0038</b>	<b>0.12±0.013</b>
Ergosterol	0.0164±0.001 <sup>d</sup>	0.0020±0.0001	0.009±0.0006

LM+SC: Limon+S. *cerevisiae*, LM: Limon **cd**: $p<0.0001$ , **d**: $p<0.001$ , **c**: $p<0.01$ , **b**: $p<0.05$

**Tablo 4.** *S. cerevisiae* ile muamele edilen *Citrus limon* (limon)'un flavonoid ve resveratrol düzeyleri ( $\mu$ g/g)

Flavonoidler	LM+SC	LM
Rutin	<b>0.00±0.00</b> <sup>cd</sup>	<b>0.0232±0.004</b> <sup>cd</sup>
Kuarsetin	0.0001±0.00 <sup>c</sup>	0.0002±0.0001
Mirisetin	-	-
Morin	-	-
Kamferol	<b>0.00±0.00</b> <sup>cd</sup>	0.0047±0.0003 <sup>d</sup>
Kateşin	<b>0.002±0.001</b> <sup>cd</sup>	<b>0.0234±0.011</b> <sup>cd</sup>
Naringin	0.042±0.0001 <sup>d</sup>	<b>0.056±0.00025</b> <sup>cd</sup>
Naringenin	<b>0.00±0.00</b> <sup>cd</sup>	0.0057±0.0008 <sup>d</sup>
Resveratrol	<b>0.00±0.00</b> <sup>cd</sup>	0.0010±0.0001 <sup>c</sup>

LM+SC: Limon+S. *cerevisiae*, LM: Limon **cd**: $p<0.0001$ , **d**: $p<0.001$ , **c**: $p<0.01$



Şekil 1. *Citrus limon* (limon) ekstraktlarının DPPH radikali temizleme aktivitesi LM: Limon

### 3.2.3. Antimikrobiyal Aktivite

Çalışmada kullanılan limon meyvesinden elde edilen yağ asidi, vitamin ve flavonoid ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal etkileri Tablo 5'te verildi. Probiyotik maya ile ekstrakte edilmiş limon yağ asidi vitamin ve flavonoid ekstraktlarının antibakteriyel ve antifungal etkileri Tablo 6'da verildi.

Limon meyvesinin (LM) yağ asidi ekstraktlarının çalışmada kullanılan test mikroorganizmalarından *K. pneumoniae*, *S. aureus* dışında tüm bakteri, maya ve fungusların gelişimlerini değişen oranlarda önlediği saptandı. Bu ekstraktların, gram (-) bakterilerden; *E. coli* de (15.6 mm) çok yüksek, gram (+) bakterilerden; *B. megaterium* (27.6 mm), mayalardan; *C. albicans* (12.6 mm), *C. glabrata* da (11.6 mm) kısmi, funguslardan; *Epidermophyton* sp. (23.6 mm), *Trichophyton* sp. (17.6 mm) üzerinde belirgin bir antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Negatif ve pozitif kontrol grubuna ile karşılaştırıldığında; farklı oranlarda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu görüldü (Tablo 5). Probiyotik maya ile ekstrakte edilmiş limon yağ asidi ekstraktının (LM+SC: limon+*S. cerevisiae*), bütün maya ve dermatofit funguslarına karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu görüldü (8.33-11.66 mm/ inhibisyon zonu). Bakteri türlerinden ise *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. megaterium* da etki gösterdiği (9.66 mm, 11.66 mm), buna karşılık *S. aureus* da herhangi bir etki göstermediği tespit edildi (Tablo 6). Ayrıca *S. cerevisiae* yağ asidi ekstraktlarının ise özellikle maya ve dermatofit fungusların gelişimini engellediği belirlendi. Bakterilerden ise sadece *S. aureus* da etki gösterdiği saptandı (Tablo 6).

Limon meyvesindeki vitamin ekstraktlarının bakteri, maya, dermatofit fungusların gelişimlerine etkisi incelendiğinde; *E. coli*, *Epidermophyton* sp., *Trichophyton* sp. de kısmen (13.66 mm, 11.66 mm, 15.66 mm), *K. pneumoniae*, *B. megaterium*, *C. glabrata*'da belirgin (26.0 mm, 18.6 mm, 15.66 mm), *S. aureus*, *C. albicans*'da çok yüksek seviyede (sırasıyla; 28.5 mm, 27.5 mm, 26.5 mm) bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi (Tablo 5). Probiyotik maya ile ekstrakte edilmiş limon vitamin ekstraktlarının; bakterilerden *B. megaterium*, *S. aureus* (9.66 mm, 11.66 mm) ve maya ve dermatofit funguslarının (8 mm-11.66 mm) tümüne düşük oranda etki gösterdiği ancak *E. coli*, *K. pneumoniae* türlerine etki etmediği görüldü (Tablo 6). Ayrıca *S. cerevisiae* vitamin ekstraktlarının ise özellikle maya ve dermatofit fungusların gelişimini engellediği belirlendi. Bakterilerden ise *E. coli* (9.66 mm), *B. megaterium* da (8.0 mm) az; *K. pneumoniae* (11.66 mm) ve *S. aureus* da (15.66 mm) yüksek etki gösterdiği saptandı (Tablo 6).

Limon flavonoid ekstraktları antibakteriyel ve antifungal aktivitelere göre incelendiğinde çok önemli düzeylerde bir etkinin olmadığı tespit edildi (8.66 mm-13.66 mm) (Tablo 5). *S. cerevisiae* ile hazırlanmış limonun flavonoid ekstraktlarının ise bakterilerden *B. megaterium*, *S. aureus* ve *Trichophyton* sp. dışındaki mikroorganizmalara karşı düşük seviyede antimikrobiyal aktivite sergilediği gözlemlendi (8-9 mm) (Tablo 6).

Yapılan bir çalışmada limon meyvesinde yüksek oranlarda bulunan sekonder metabolitlerden; limonoidlerin antikanser, kolesterol düşürücü ve antiviral özelliğe sahip oldukları [39], limonda mevcut olan flavonoidlerden dolayı bir çok biyolojik aktivite dahil olmak üzere, tıbbi etkilerinin olduğu belirtilmiştir [40].

Limon ile yapılan birçok araştırma elde edilen limon ekstraktlarının sonuçlarını destekler niteliktedir. Nitekim *Citrus microcarpa* ekstraktlarından izole edilen 2-Hydroxypropane-1, 2, 3-tricarboxylic asidin çalışmada kullanılan mikroorganizmalara [*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Citrobacter freundii*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalatae*, *Edwardsiella*

*tarda* ve *Yersinia enterocolitica*] karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarla belirtilmiştir [41].

Çalışmamızda *S. cerevisiae* içeren limon ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri incelendiğinde yağ asidi ve vitamin ekstraktlarının kontrol gruplarına (limon ve *S. cerevisiae*) kıyasla, kullanılan bakterilerin bazılarında, maya ve dermatofit fungusların tümünde belirgin ve değişen oranlarda etkili olduğu görülürken, flavonoid ekstraktlarının ise yok denecek kadar az miktarlarda antimikrobiyal aktivite gösterdiği saptandı. Antimikrobiyal aktivite de görülen azalmaların nedeninin yapılarında doğal olarak bulunan biyoaktif bileşiklerin *S. cerevisiae* tarafından tüketilmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca daha önceki araştırmalarında belirttiği gibi mikroorganizmaların kemoterapotik maddelere karşı duyarlılıklarının suştan suşa [42] bitkilerin fitokimyasal özelliklerinin ise türdenden türe farklılık gösterebileceği, bu yüzden kullanılan bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite gösterebileceği çalışmanın sonuçlarını destekler niteliktedir. Buna göre elde edilen bu verilerin yapılan yağ asidi, vitamin ve fitosterol, flavonoid ve resveratrol analizi ile paralel sonuçlar gösterdiği ortaya çıkmıştır.



**Tablo5.** *Citrus limon* (limon)'un yağ asidi, vitamin ve flavonoid ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri (mm)

Mikroorganizmalar	LM			Negatif Kontrol		Pozitif Kontrol
	Yağ Asidi	Vitamin	Flavonoid	Metanol	Hekzan	Standart
<i>E. coli</i>	<b>15.6±0.33<sup>cd</sup></b>	13.66±0.33 <sup>c</sup>	<b>13.6±0.33</b>	-	15.33±0.3	10.3±0.3**
<i>K. pneumoniae</i>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	26.00±0.00 <sup>d</sup>	-	-	14.6±0.3	9.6±0.3**
<i>B. megaterium</i>	<b>27.6±0.33<sup>cd</sup></b>	<b>18.66±0.33<sup>d</sup></b>	10.0±0.00	-	13.0 ±0.6	13.3±0.3**
<i>S. aureus</i>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	<b>36.66±0.33<sup>cd</sup></b>	8.66±0.33	-	12.3±0.3	9.3±0.3**
<i>C. albicans</i>	12.6±0.33 <sup>c</sup>	<b>37.66±0.33<sup>cd</sup></b>	<b>11.66±0.33</b>	-	17.0±0.0	18.0±0.6*
<i>C. glabrata</i>	11.6±0.33 <sup>c</sup>	23.66±0.33 <sup>d</sup>	11.0±0.0	-	11.0 ±0.0	12.6±0.3*
<i>Epidermophyton sp.</i>	<b>23.6±0.33<sup>cd</sup></b>	11.66±0.33 <sup>c</sup>	<b>9.66±0.33</b>	-	9.3±0.3	NT
<i>Trichophyton sp.</i>	<b>17.6±0.33<sup>cd</sup></b>	15.66±0.33 <sup>c</sup>	<b>9.0±0.00</b>	-	17.3±0.3	NT

**Standart:** \*:Nystatin (Antifungal, 30 µg/disk), \*\*:Streptomycin sulphate (antibakteriyal,10 µg/disk), Kontrol (negatif kontrol: metanol ve hekzan):10 µL, NT:Test edilmedi  
**cd:p<0.0001 (çok yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık var), d:p<0.001 (belirgin düzeyde istatistiksel anlamlılık var), c:p<0.01(kısmen istatistiksel anlamlılık var), b:p<0.05 (çok az düzeyde istatistiksel anlamlılık var), a:p >0.05 (istatistiksel anlamlılık yok)**

**Tablo6.** *S. cerevisiae* ile muamele edilen *Citrus limon* (limon)'un yağ asidi, vitamin ve flavonoid ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri (mm)

Mikroorganizmalar	LM+SC			SC	
	Yağ Asidi	Vitamin	Flavonoid	Yağ Asidi	Vitamin
<i>E. coli</i>	9.66±0.33	-	8.0±0.00	-	9.66±0.33
<i>K. pneumoniae</i>	11.66±0.33	-	8.0±0.00	-	<b>11.66±0.33</b>
<i>B. megaterium</i>	11.66±0.33	9.66±0.33	-	-	<b>8.00±0.00</b>
<i>S. aureus</i>	-	11.66±0.33	-	8.00±0.00	<b>15.66±0.33</b>
<i>C. albicans</i>	11.66±0.33	8.00±0.00	9.0±0.00	18.66±0.33	<b>15.66±0.33</b>
<i>C. glabrata</i>	10.66±0.33	11.66±0.33	8.0±0.00	9.66±0.33	<b>15.66±0.33</b>
<i>Epidermophyton sp.</i>	9.66±0.33	<b>10.33±0.33</b>	9.00±0.00	27.66±0.33	<b>20.66±0.33</b>
<i>Trichophyton sp.</i>	8.33±0.00	<b>11.33±0.33</b>	-	9.66±0.33	<b>19.66±0.33</b>

LM+SC: Limon+S. cerevisiae, SC:S. cerevisiae

### 3. Sonuç ve Öneriler

Besinsel liflerin sağlık üzerine olumlu etkileri pek çok araştırmaya konu olmuştur [43,44]. Besinsel lifli bir bitki olan limonun biyoaktif bileşenler ve etkileri üzerine (yağ asidi, vitamin ve fitosterol, flavonoid ve resveratrol, DPPH) çalışmalar yapılmasına karşın, bu lifli gıdanın probiyotik maya olan *S. cerevisiae* gelişimine etkileri ve bu maya üzerindeki etkiyi belirleyen çalışmalara rastlanılmamıştır. Ancak bu yönde pre ve probiyotik ilişkisi bakımından yapılan iki çalışma mevcuttur. Buna göre; *Saccharomyces boulardii* ile hazırlanan *Zea mays L.* (mısır) ekstraktlarının fitokimyasal özelliklerinin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmada *S. boulardii* ile hazırlanan *Z. mays L.* (mısır) bitkisinin yağ asidi, vitamin, fitosterol, flavonoid, resveratrol içerikleri, antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Bitkiden elde edilen ekstraktlarda gelişen *S. boulardii*'nin biyoaktif bileşikleri farklı oranlarda etkilediği tespit edilmiştir [45]. Diğer çalışmada ise lifli besin olarak tüketilen *Avena sativa* (yulaf) ile muamele edilen *Debaryomyces hansenii* ekstraktlarının yağ asidi, vitamin, fitosterol, flavonoid ve resveratrol içerikleri ile antimikrobiyal aktiviteleri belirlenerek karşılaştırmalar yapılmış ve *A. sativa* (yulaf)'nın probiyotik olarak kabul edilen *D. hansenii*'nin gelişimine olumlu yönde etkilerinin olduğu ve bu lifli bitkiden elde edilen ekstraktlar içerisinde gelişen bu maya türünün biyoaktif bileşiklere değişen oranlarda etki gösterdiği saptanmıştır [46].

Sonuç olarak; elde edilen veriler ışığında limon meyvesinin, çalışmamızda kullanılan sağlık açısından yararlı probiyotik maya olarak kabul edilen *S. cerevisiae* gelişimine olumlu yönde etkilerinin olduğu, bu meyveden elde edilen ekstraktın içerisinde gelişen *S. cerevisiae*'nin, biyoaktif bileşiklere değişen oranlarda etki gösterdiği saptandı. Böylece bitkisel olarak beslenmenin, uzun ve sağlıklı yaşam için gerekli olan probiyotikler üzerine yapacağı olumlu etki (bitki-probiyotik ilişkisi) bakımından çalışmanın önemi vurgulandı. Ayrıca; bitkisel lif kaynaklı besinlerle çoğaltılan probiyotik mayalardan elde edilen ekstraktlarında, patojen bakteri ve maya ve dermatofit funguslar üzerine olan etkilerinin saptanmış olması bu konuda yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayacak niteliktedir.

### Teşekkür

Bu çalışma, FÜBAP Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinatörlüğü (1909 nolu proje) tarafından desteklenmiştir. Çalışmalarımız sırasında teknik desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ökkeş Yılmaz'a teşekkürü borç bilirim.

## Kaynaklar

1. Alkan R. 2012. Probiyotik Maya: *Saccharomyces Boulardii*, *Tünav Bilim Dergisi*, 5(4): 13-16.
2. Ouwehand A.C., Niemi P., Salminen J. 1999. The Normal Faecal Microflora does not Affect the Adhesion of Probiotic Bacteria in Vitro, *FEMS Microbiol Letters*, 177 (1): 35-38.
3. Jespersen L. 2003. Occurrence and Taxonomic Characteristics of Strains of *Saccharomyces Cerevisiae* Predominant in African Indigenous Fermented Foods and Beverages, *FEM Yeast Research*, 3 (2): 191-200.
4. Turan İ., İltter T. 2007. Kafkas Dağlarından Günümüze: Kefir, *Güncel Gastroenteroloji*, 11 (2): 65-75.
5. Kaleli İ. 2007. Probiyotiklerin Etki Mekanizması, *Ankem Dergisi*, 21 (2): 238-242.
6. Karademir G., Ünal Y. 2008. Broilerlerde Kefirin Probiyotik Amaçla Kullanılması, *Hayvancılık ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 49 (1): 47-54.
7. Marzouk M.S., Moustafa M.M., Nermeen M.M. 2008. The Influence of Some Probiotics on the Growth Performance and Intestinal Microbial Flora of *O. Niloticus*, 8 th International Symposium on *Tilapia in Aquaculture*, 1059-1071.
8. Uylaşer V. 2009. Boza Mikroflorasını Oluşturan Bazı Mikroorganizmalar ve Probiyotik Etkileri, <http://www.gelenekselgidalar.com/dosyalar2/view.php?file=Vildan+Uyla%FEer.pdf> (Erişim Tarihi: 01.01.2010).
9. Eren Z., Gürol Y., Sönmezoğlu M., Eren H.Ş., Çelik G., Kantarcı G. 2014. Probiyotik Tedavisinden Sonra Yaşlı Bir Hastada Gelişen *Saccharomyces Cerevisiae* Fungemisi, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 48 (2): 351-355.
10. Çoşkun T. 2006. Pro-, Pre- ve Sinbiyotikler, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 49 (2): 128-148.
11. Karakaya S. 2009. [http://food.ege.edu.tr/sunumlar/gida\\_biyokimya.pdf](http://food.ege.edu.tr/sunumlar/gida_biyokimya.pdf) 2009 (Erişim Tarihi: 01.02.2010).
12. Çelik L. 2007. Kanatlı Hayvanların Beslenmesinde Verim Artışı Sağlayıcı ve Ürün Kalitesini İyileştirici Doğal Organik etkili Maddeler, *Yem Magazin*, 47: 51-55.
13. Nehir El S. 2009. Ürün Geliştirmede Optimal Beslenme Yaklaşımı, [http://food.ege.edu.tr/RN\\_GEL\[1\].OPT.BES.YAKLAŞIMIDERSNOTU.pdf](http://food.ege.edu.tr/RN_GEL[1].OPT.BES.YAKLAŞIMIDERSNOTU.pdf) (Erişim Tarihi: 17.02.2009).
14. Yağcı R.V. 2005. Probiyotikler ve Prebiyotikler, *Güncel Gastroenteroloji*, 9 (4): 223-225.
15. Yılmaz M. 2004. Prebiyotik ve Probiyotikler, *Güncel Pediatri*, 2: 142-145.
16. Alltech Chromatography 2004. A Grace Company Catalog 600, Alltech. Associates. Inc. U.S., 497.
17. Hara A., Radin N.S. 1978. Lipid Extraction of Tissues with a Low Toxicity Solvent, *Analytical Biochemistry*, 90 (1): 420-426.
18. Christie W.W. 1992. *Gas Chromatography and Lipids*, The Oily Press Glaskow, Somerset.
19. Tvřzicka E., Vecka M., Stankova B., Zak A. 2002. Analysis of Fatty Acids in Plasma Lipoproteins by Gas Chromatography Flame Ionisation Detection Quantitative Aspects, *Analytica Chimica Acta*, 465 (1-2): 337-350.
20. Katsanidis E., Addis P.B. 1999. Novel HPLC Analysis of Tocopherols and Cholesterol in Tissue, *Free Radical Biology and Medicine*, 27 (11-12): 1137-1140.
21. Lopez-Cervantes J., Sanchez-Machado D.I., Rios-Vazquez N.J. 2006. High-performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Quantification of Retinol,  $\alpha$ -Tocopherol, and Cholesterol in Shrimp Waste Hydrolysate, *Journal of Chromatography A*, 1105 (1-2):135-139.

22. Zu Y., Li C., Fu Y., Zhao C. 2006. Simultaneous Determined of Catechin, Rutin, Quercetin, Kaempferol and Isorhamnetin in the Extract of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaves by RP-HPLC with DAD, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (3): 714-719.
23. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *LWT- Food Science and Technology*, 28 (1): 25-30.
24. Hsu B., Coupar I.M., Ng K. 2006. Antioxidant Activity of Hot Water Extract from the Fruit of the Doum Palm, *Hyphaene Thebaica*, *Food Chemistry*, 98 (2): 317-328.
25. Özçelik S. 1992. *Gıda Mikrobiyolojisi Laboratuvar Kılavuzu*, Fırat Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Yayınları, Elazığ.
26. Collins C.M., Lyne P.M. 1987. *Mikrobiyological Methods*, Butter Morths & Co (Publishers) Ltd., London.
27. Aydın S. 1999. *The Effect of Nitrite on Enhancement of Alpha-amylase Synthesis Afforded by Bacterial Hemoglobin in Genetically Engineered E. Coli*, Illinois Institute of Technology, Chicago.
28. Nagy S., Nordby H.E. 1974. Fatty Acids of Triglycerides from Citrus Juice Sacs, *Phytochemistry*, 13 (1): 153-157.
29. Nordby H.E., Nagy S. 1974. Fatty Acid Composition of Sterol Esters from Citrus Sinensis, C. Paradisi, C. Limon Aurantifolia and C. Limettioides Sacs, *Phytochemistry*, 13 (2): 443-452.
30. Bocco A., Cuvelier M.E, Richard H., Berset C. 1998. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts, *Agricultural Food Chemistry*, 46 (6): 2123-2129.
31. Silalahi J. 2002. Anticancer and Health Protective Properties of Citrus Fruit Components, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 11 (1): 79-84.
32. Montoro P., Braca A., Pizza C., Tommasi N.D. 2005. Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids Isolated from Different Plant Species, *Food Chemistry*, 92 (2): 349-355.
33. Maisuthisakul P., Suttajit M., Pongsawatmanit R. 2007. Assessment of Phenolic Content and Free Radical Scavenging Capacity of Some Thai Indigenous Plants, *Food Chemistry*, 100 (4): 1409-1418.
34. Baker R.A., 1994. Potential Dietary Benefits of Citrus Pectin and Fiber, *Food Technology*, 11: 133-139.
35. Gonzalez-Molina E., Dominguez-Perles R., Moreno D.A., García-Viguera C. 2010. Natural Bioactive Compounds of Citrus Limon for Food and Health, *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 51 (2): 327-345.
36. Barreca D., Bellocco E., Caristi C., Leuzzi U., Gattuso G. 2010. Flavonoid Composition and Antioxidant Activity of Juices from Chinotto (*Citrus Myrtifolia* Raf.) Fruits at Different Ripening Stages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (5): 3031-3036.
37. Breksa A.P., Manners G.D. 2006. Evaluation of the Antioxidant Capacity of Limonin, Nomilin, and Limonin Glucoside, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54 (11): 3827-3831.
38. Yu J., Wang L., Walzem R.L., Miller E.G., Pike L.M., Bhimanagouda S. 2005. Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids and Coumarins, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53 (6): 2009-2014.
39. Manners G. 2007. Citrus Limonoids: Analysis, Bioactivity, and Biomedical Prospects, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (21): 8285-8294.
40. Del Rio J.A., Fuster M.D., Gomez P., Porrás I., Garcia-Lidon A., Ortuno A. 2004. Citrus Limon: A Source of Flavonoids of Pharmaceutical Interest, *Food Chemistry*, 84 (3): 457-461.

41. Lee S.W., Najiah M. 2009. Antimicrobial Property of 2-Hydroxypropane-1, 2, 3-Tricarboxylic Acid Isolated from Citrus Microcarpa Extract, Agricultural Sciences in China, 8 (7): 880-886.
42. Kızıll G., Toker Z., Özen H.Ç., Aytekin C. 2004. The Antimicrobial Activity of Essential Oils of Hypericum Scabrum, H. Scabroides, H. Triquetrifolium, Phytotherapy Research, 18 (4): 339-341.
43. Prosky L. 2000. When is Dietary Fiber Considered a Functional Food?, Biofactors, 12 (1-4): 289-297.
44. Prosky L. 2000. What is Dietary Fiber?, Journal of AOAC International, 83 (4): 985-987.
45. Erecevit P., Kırbağ S., Yılmaz Ö. 2013. Determination of Phytochemical Characteristics of Zea Mays (Corn) Extracted with Saccharomyces Boulardii, Chemistry of Natural Compounds, 49 (1): 12-16.
46. Erecevit P., Kırbağ S., Zengin F. 2013. Determination of Phytochemical Contents of Avena Sativa (Oat) and Its Impact on Debaryomyces Hansenii, Proceedings of the National Academy of Sciences India, Section B: Biological Sciences, 84 (2): 365-371.