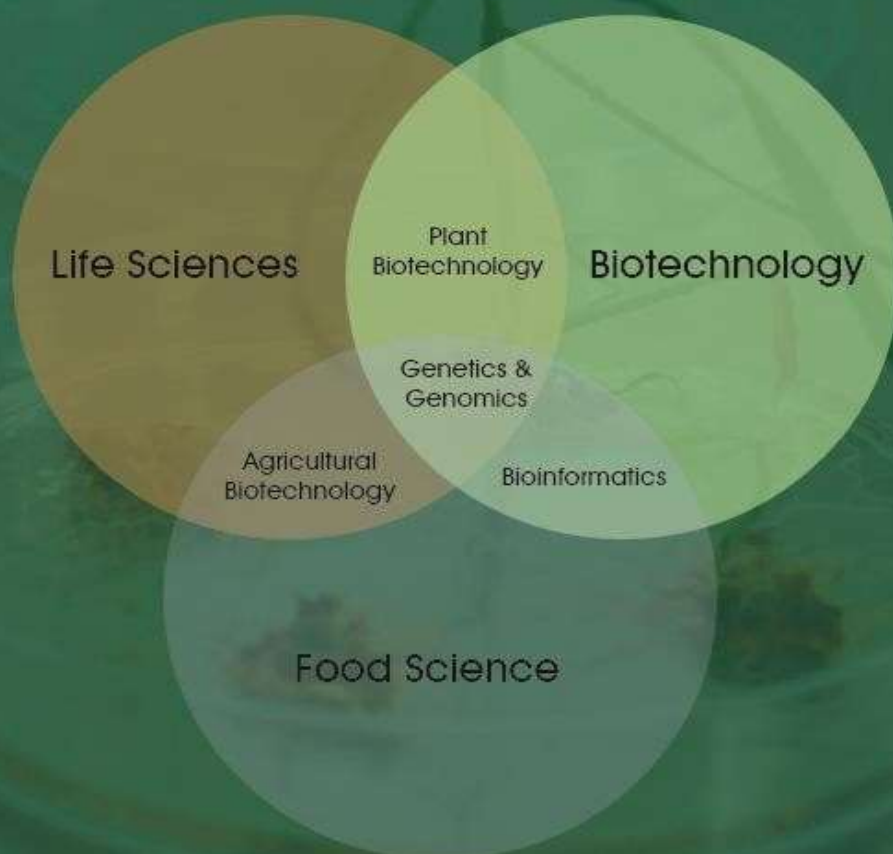


# *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*

e-ISSN:2651-4621



**Editor in Chief / Baş Editör****Asst. Prof. Dr. Yılmaz Kaya**

Ondokuz Mayıs University, Turkey

**Section Editors / Bölüm Editörleri\***

\* sıralama akademik unvan içinde alfabetik sıralamaya göre. \* The ranking is arranged alphabetically within the academic title.

Prof. Dr. Ali ASLAN, PhD, Van Yuzuncuyıl University

Prof. Dr. Ercan BURSAL, PhD, Muş Alparslan University

Prof. Dr. Hasan AKAN, PhD, Harran University

Prof. Dr. Nermin GOZUKİRMİZİ, PhD Istinye University

Prof. Dr. Tengku Haziyaamin TENGKU ABDUL HAMİD, PhD, International Islamic University Malaysia

Assoc. Prof. Dr. Ayhan HORUZ, PhD Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Hasan Murat AKSOY, PhD, Ondokuz Mayıs University

**Editorial Board / Editör Kurulu**

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN, PhD, Yıldız Technical University

Prof. Dr. Muhammet KURULAY, PhD, Yıldız Technical University

Assoc. Prof. Dr. Gulbubu KURMANBEKOVA, Kyrgyz-Turkish Manas University

Assoc. Prof. Dr. İsmail ERPER, PhD, Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Muhammad Arshad JAVED, PhD, Universiti Teknologi Malaysia

Assoc. Prof. Dr. Roswanira AB. WAHAB, PhD, Universiti Teknologi Malaysia

Assoc. Prof. Dr. Sevgi MARAKLI, PhD, Amasya University

Asst. Prof. Dr. Abdussamat GÜZEL, PhD, Inonu University

Asst. Prof. Dr. Ali Yuksek, PhD, Ondokuz Mayıs University

Asst. Prof. Dr. Cihan İNAN, PhD, Karadeniz Technical University

Asst. Prof. Dr. Ertan ERMİŞ, PhD, Istanbul Sabahattin Zaim University

Asst. Prof. Dr. Feyza TUFAN, PhD, Halic University

Asst. Prof. Dr. Harun ÖZER, PhD, Ondokuz Mayıs University

Asst. Prof. Dr. Kasım TAKIM, PhD, Harran University

Asst. Prof. Dr. Mohamed EDBEİB, PhD, Baniwalid University, Libya

Asst. Prof. Dr. Muhammed YÜCEER, PhD, Canakkale Onsekiz Mart University,

Dr. Aliyu ADAMU, PhD, Kaduna State University

Dr. Lect. Abdulgani DEVLET, PhD, Bilecik Seyh Edebali University

Dr. Nedim UZUN, PhD, Taksim Education and Research Hospital, Turkey

Dr. Res. Asst. Kiran NAWA, PhD, University of Arizona

**Advisory Board / Danışma Kurulu**

Prof. Dr. Ahmet OKUMUŞ, PhD, Aydın Adnan Menderes University

Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN, PhD, Yıldız Technical University

Prof. Dr. Fahrul Zaman HUYOP, PhD, Universiti Teknologi Malaysia

Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT, PhD, Marmara University

Assoc. Prof. Dr. Funda ARSLANOĞLU, PhD, Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Sibel YILMAZ, PhD, Yeni Yuzyil University

Assoc. Prof. Dr. Zarina Bt ZAINUDDİN, PhD, International Islamic University Malaysia

**Managing Editor / Yönetici Editör**

Yunus Emre ARVAS, PhD Cand., Yıldız Technical University

### **Yönetim Ofisi/ Management Office**

Yildiz Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering.  
ESENLER/ISTANBUL

### **Yasal Sorumluluk**

Yazıların yasal ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.  
Tüm hakları saklıdır. Derginin hiçbir bölümü, yazılı ön izin olmaksızın ve dergi adına referans gösterilmeden herhangi bir formatta çoğaltılamaz veya kullanılamaz.

### **Legal Responsibility**

The legal responsibility of the articles belongs to the authors. All rights reserved. No part of this journal may be reproduced or used in any form without the prior written permission and a reference to name of the journal.

### **Editörden;**

#### **Değerli okurlar ve yazarlar,**

“International Journal of Life Sciences and Biotechnology” olarak dergimizin altıncı sayısını yayın hayatına sunmaktan mutluluk ve onur duyuyoruz. “International Journal of Life Sciences and Biotechnology” dergisi araştırma- geliştirme ve uygulama ilkeleri baz alınarak yayınlanan uluslararası hakemli açık erişimli akademik bir elektronik dergidir.

“International Journal of Life Sciences and Biotechnology” dergisi Yaşam Bilimleri, Biyoloji, Biyoteknoloji, Biyomühendislik, Ziraat Bilimleri, Gıda Biyoteknolojisi ve Genetik alanlarındaki ilgili araştırmacılara, kurum ve kuruluşlara teorik ve pratik uygulamalarda katkı sağlamayı, tarafsızlık ve bilim etiği ilkelerine bağlı kalarak çözüm temelli, yenilikçi ve katma değeri olan çalışmalara odaklanan, günceli ve geleceği tartışan çalışmaların yayınlanmasını hedeflemektedir.

Bu düşüncelerle 2020 yılı ikinci sayısını yayınladığımız “International Journal of Life Sciences and Biotechnology” dergisini, makaleleri ile onurlandıran akademisyenlere, Fikir / Görüş / Öneri / Katkı ve Eleştirileri ile değerlendirme süreçlerine katkılarından dolayı hakem ve yayın kurullarında yer alan kıymetli bilim insanlarına yürekten teşekkür ediyoruz. Bir sonraki sayıda görüşmek ümidiyle...

**15.08.2020**

**Editör**

**Dr. Öğrt. Üyesi Yılmaz KAYA**

## **From The Editor;**

**Dear Readers and Authors,**

As “International Journal of Life Sciences and Biotechnology”, we are pleased and honored to present the fifth issue of the journal. "International Journal of Life Sciences and Biotechnology" is an international double peer-reviewed open access academic journal published on the basis of research- development and code of practice.

The aims of this journal are to contribute in theoretical and practical applications in relevant researchers of Life Sciences, Biology, Biotechnology, Bioengineering, Agricultural Sciences, Food Biotechnology and Genetics institutions and organizations in Turkey, and to publish solution based papers depending on the principle of impartiality and scientific ethics principles, focusing on innovative and added value work, discussing the current and future.

With these thoughts, We are especially thankful to academicians honoring with the articles, valuable scientists involved in editorial boards and reviewers for their contributions to the evaluation processes with through their opinions/ideas/contributions/criticisms in second issue of 2020 "International Journal of Life Sciences and Biotechnology". Hope to see you in the next issue...

**15.08.2020**

**Editor in Chief**

**Assit. Prof. Dr. Yilmaz KAYA**

## **Sayının Hakemleri / Reviewers of the Issue\***

\* sıralama akademik unvan içinde alfabetik sıralamaya göre. \* The ranking is arranged alphabetically within the academic title.

- Assoc. Prof. Dr. Behcet INAL, PhD, Siirt University, Turkey  
Assoc. Prof. Dr. Fatih TORNUK, PhD, Yildiz Technical University, Turkey  
Assoc. Prof. Dr. İsmaila Yada SUDİ, PhD, Adamawa State University Mubi, Nigeria  
Assoc. Prof. Dr. Sevgi MARAKLI, PhD, Amasya University, Turkey  
Assit. Prof. Dr. Abdussamat GÜZEL, PhD, Inonu University, Turkey  
Assit. Prof. Dr. Ayşen ÇOLAK, PhD, Usak University, Turkey  
Assit. Prof. Dr. Bilgin TAŞKIN, PhD, Van Yuzuncu Yil University, Turkey  
Assit. Prof. Dr. Burcu KENANOĞLU, PhD, Usak University, Turkey  
Assit. Prof. Dr. Sadettin ÇELİK, PhD, Bingöl University, Turkey  
Dr. Aliyu ADAMU, PhD, Kaduna State University, Nigeria  
Dr. Amir NAJAH, PhD, Al-Mustaqbal University Collage, Iraq  
Dr. Nathamol PARASANTHONG, PhD, Management and Science University, Malaysia  
Dr. Nurcamal OMURZAKOVA, PhD, Kyrgyz-Turkish Manas University, Kyrgyzstan  
Dr. Rshahad SHAHAD, PhD, Management and Science University, Malaysia  
Dr. Safak ANDIC, PhD, Central Research Institute of Food and Feed Control, Turkey  
Dr. Res. Assit. Deniz UYGUNOZ, PhD, Yildiz Technical University, Turkey  
Dr. Res. Assit. Duygu Elif YİLMAZ, PhD, Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany  
Dr. Res. Assit. Latife Betül GÜL, PhD, Ondokuz Mayıs University, Turkey  
Dr. Res. Assit. Muhammed M. ABED, PhD, University of Anbar, Iraq  
Dr. Res. Assit Muhammet DOĞAN, PhD, Karamanoglu Mehmetbey University, Turkey  
Dr. Res. Assit. Sezen TOKSOY KÖSEOĞLU, PhD, Sakarya University, Turkey  
Dr. Lect. Esmael Kelil HAJI, PhD, Dilla University, Ethiopia

## İçindekiler/ Contents

### Research Articles/ Araştırma Makaleleri

#### ***in vitro* Study of Antidiabetic Effect of Abrus precatorius Methanol Leaves Extract against Glucose Absorption**

Hafedh Ahmed Al-moalemi<sup>1</sup>, Wahid Ali Hamood Altowayti , Siti Pauliena, Mohd. Bohari ..... 117-126

#### **Uşak İli Sert Çekirdekli Meyve Üreticilerinin Fitopatolojik Sorunlara Yaklaşımlarının Belirlenmesi**

Altınay Şimşek, Havva Dinler, Sinan Duru ..... 127-147

#### **Toxicity and phytochemical analysis of petroleum-ether, ethanolic and aqueous extracts of *Ceratotherca sesamoides***

Manasseh Silas, Ameh D. A, Chintem D.G.Williams, I. Yada Sudi ..... 148-155

#### **Total Phenolic and Flavonoid Content of *Elaeis guineensis* Leaves Treated with Different Amount of Nitrogen-Potassium Fertilizer**

Hazrina Hasan, Fazilah Abd Manan..... 156-163

#### **Orthologous Revelation between *Elaeis guineensis*, *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum***

Nurul Hidayah Samsulrizal, Muhammad Danial Hazuki<sup>1</sup>, Nur Sabrina, Ahmad Azmi, Zatty Syamimi Adura Mat Said, Nurniwalis Abdul Wahab, Zubaidah Ramli..... 164-179

#### **An investigation on the probiotic properties of *Lactobacillus fermentum***

Serap Çetinkaya, Samet Kocabay, Ali Fazıl Yenidünya..... 180-190

#### **Antimicrobial Activity of *Musa acuminata* Peel Extract against Gram-Positive Bacteria**

Yashini Subramaniam, Nurzafirah Mazlan, Halijah Hassan, Juju N. Jaafar, Thung Tze Young, Siti Marwanis Anua, Safaa N. Saud ..... 191-196

### Review Articles / Derleme Makaleler

#### **Effects and Quantity Ranges Of Some Auxins On Embryogenic Callus Induction From Upland Rice Cultivars: An Overview**

Sulaiman Mohammed..... 197-204

#### **Bitkilerde Aktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres / Active Oxygen Species and Oxidative Stress in Plants**

Ali Doğru..... 205-226

#### **Biyoteknolojik Tekniklerle Mikrobiyal Vitamin Üretimi / Production of Microbial Vitamins by Biotechnological Techniques**

Ülküye Dudu Gül ..... 227-240

Al-moalemi, H.A., W.A.H. Altowayti, and S.P.M. Bohari, in vitro Study of Antidiabetic Effect of *Abrus precatorius* Methanol Leaves Extract against Glucose Absorption. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(2): p. 117-126. DOI: 10.38001/ijlsb.701093

## *in vitro* Study of Antidiabetic Effect of *Abrus precatorius* Methanol Leaves Extract against Glucose Absorption

Hafedh Ahmed Al-moalemi<sup>1\*</sup> , Wahid Ali Hamood Altowayti<sup>1</sup> , Siti Pauliena Mohd. Bohari<sup>1\*</sup> 

### ABSTRACT

Diabetes mellitus is a common chronic systemic disorder characterised by hyperglycaemia as a standard feature. A traditional plant known as *Abrus precatorius* (AP) has been used for the treatment of type II diabetes mellitus in Malaysia. The potential of the 80% methanol leaves extract of *A. precatorius* has been tested for its  $\alpha$ -glucosidase inhibition using  $\alpha$ -glucosidase inhibitory assay and glucose diffusion activity using an *in vitro* model. It was observed that the methanol leaves extract of *A. precatorius* exhibited a high  $\alpha$ -glucosidase inhibition at the concentrations of 25 and 50 mg/mL (65.4% and 84.6%), respectively, but low inhibition at the concentration of 6.25 to 12.5 mg/mL (25% and 28.2%) when compared to control. And it slightly affected the glucose diffusion at the concentration of 50 mg/mL (9.5%) within 24 h compared to the control group. These indicated that the methanol leaves extract of *A. precatorius* is capable of inhibiting  $\alpha$ -glucosidase activity, besides halting glucose diffusion activity by delaying the glucose absorption in the gut.

### ARTICLE HISTORY

Received

14 March 2020

Accepted

22 April 2020

### KEYWORDS

*Abrus precatorius*, diabetes mellitus, acarbose, alpha-glucosidase, glucose diffusion.

## Introduction

Diabetes mellitus is a common chronic disease characterised by high blood glucose levels with carbohydrate, protein, and fat metabolic disorders [1, 2]. In 2017, the International Diabetes Federation (IDF) estimated that 451 million people (aged 18–99 years) worldwide had diabetes. These trends was, and it is expected to reach 693 million by 2045 [3]. Diabetes mellitus can be classified as type I diabetes, type II diabetes, gestational diabetes mellitus (GDM), and other specific types of diabetes due to other causes (e.g., drug-or chemical-induced diabetes, diseases of the exocrine pancreas, and monogenic diabetes syndromes) [4]. Among these, type II diabetes causes abnormal absorption of glucose into the blood that

<sup>1</sup> Department of Biosciences, Faculty of Science, Universiti Teknologi Malaysia, Johor, Malaysia

\* Corresponding Author: Siti Pauliena Mohd. Bohari, E-mail: [pauliena@fbb.utm.my](mailto:pauliena@fbb.utm.my) telephone number: 07-55 34320

causes blood glucose level to rise and results in severe complications of various organ systems like the heart, brain, liver, kidney, and retina [5, 6].

One of the most efficient ways to control type II diabetes is to reduce glucose absorption by inhibiting carbohydrate digestion. Carbohydrate digestion occurs in the gastrointestinal tract and involves two enzymes, intestinal  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic  $\alpha$ -amylase to release absorbable glucose [7]. The  $\alpha$ -glucosidase breaks down disaccharides or make monosaccharides through the digestion of carbohydrates by  $\alpha$ -amylase (glucose) [8, 9]. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition may help delay carbohydrate digestion in the intestine, thereby controlling type II diabetes [10].

Acarbose is the most common commercially available drug that acts as the inhibitor to  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase in the brush border of the small intestine, hence, ensures the delay of glucose absorption and effectively decreases postprandial blood glucose level elevation [11]. Besides acarbose, voglibose and miglitol are other drugs of the similar kind in the market [12]. However, long-term use of these compounds causes gastrointestinal side effects such as abdominal distention, diarrhoea, and abdominal pain [13]. Therefore, plants and herbs are gaining vast attention as the alternative source of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, primarily due to its characteristics and cost [14]. Several dietary supplements of plant origin have been tested and exhibited potential therapeutic activities in diabetes treatment and its complications [15]. In this study, we proposed the activity of *A. precatorius* leaves methanol extract against  $\alpha$ -glucosidase inhibition and retardation of glucose diffusion via *in vitro* study.

## **Materials and Methods**

### **Chemicals and reagents**

The chemicals and reagents used in the study such as methanol, sodium chloride, sodium carbonate, potassium dihydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, and D-glucose were purchased from Qrec (ASIA; Bio-Diagnostic Sdn. Bhd. Petaling Jaya, Selangor, Malaysia). Other chemicals like p-nitrophenyl alpha-D-glucopyranoside and  $\alpha$ -glucosidase, were from Sigma-Aldrich Group (Subang Jaya, Selangor, Malaysia), and glucose kit from Spinreact S.A (Sant Esteve de Bas, Girona, Spain).



### **Plant materials**

The *A. precatorius* (*Akar Saga*) plant was obtained from Nursery Pak Ali (Skudai, Johor Bahru, Malaysia). Green, mature, and intact leaves were harvested from the plant and washed with tap water and dried in a shady place with enough ventilation for 3–5 days. The dried leaves were ground by a standard blender to get a fine powder. The leaves powder was kept in a sealed container in a dry and cool place to be used throughout the study period [16].

### **Preparation of *A. precatorius* leaves extract**

About 25 g of the leaves powder was soaked in 80% methanol for three days. Then, the mixture was filtered by filter paper No 1 (Advantec, Medigene Sdn Bhd, Selangor, Malaysia). The filtered methanol extract was evaporated using a rotary evaporator (EYELA-Tokyo Rikakikai Company, Tokyo, Japan) and dried using a freeze dryer (Martin Christ Company, Osterode am Harz, Germany) to obtain dark crude *A. precatorius* extract [16, 17]. The percentage yield of the crude methanol extract obtained was 1.86 grams, and kept at 4 °C for further use.

### **Alpha-glucosidase inhibition assay**

The activity of  $\alpha$ -glucosidase was determined using kinetic endpoint assay in a 96-well plate (NEST, Jiangsu, China). The absorbance was measured using an Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments Inc, Winooski Vermont, USA). Approximately 20  $\mu$ L different concentrations of *A. precatorius* extract were mixed with 50  $\mu$ L of 50 mM phosphate buffer, followed by 10  $\mu$ L of  $\alpha$ -glucosidase from *S. cerevisiae* (1 U/mL). These samples were further incubated for 5 min at 37 °C [16]. A 20  $\mu$ L of p-nitrophenyl alpha-D-glucopyranoside (PNP-G) was then added to the mixture as the substrate. The inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase was assessed using p-nitrophenyl alpha-D-glucopyranoside (PNPG) as the substrate based on the formation of the yellow p-nitrophenol colour [18]. The reaction was incubated in an incubator (Panasonic-Biomedical Company, Japan) for 30 min at 37 °C. Subsequently, 50  $\mu$ L of a sodium carbonate solution was added to stop the reaction. Acarbose, a synthetic  $\alpha$ -glucosidase inhibitor (used for type II diabetes patient), was employed as a positive control. This drug is a synthetic drug used by type II diabetic patients to inhibit  $\alpha$ -glucosidase within the small intestine [16, 19]. The absorbance was recorded at

405 nm, and the percentage inhibition was calculated according to the following formula [20]:

$$\% \text{ inhibition} = [(absorbance \text{ of control} - absorbance \text{ of extract}) / absorbance \text{ of control}] \times 100$$

### **Effects of *A. precatorius* methanol leaves extract on glucose movement**

In this experiment, a simple *in vitro* dialysis tube model was used to assess the potential of the *A. precatorius* methanol leaves extract to retard the diffusion of glucose in the small intestinal tract [21]. The movement in this system is not by true diffusion, but it is assisted by the convective activity of intestinal concentrations [22, 23]. This model requires the use of a dialysis tube (150 mm × 25 mm) soaked in sodium chloride (NaCl) before use [24]. Then, one end of the tube was tightly tied with a rubber band. A volume of 1 mL *A. precatorius* leaves extract was added to a dialysis tube and mixed with 1 mL of 0.15 M NaCl containing 0.22 M D-glucose. The other end of the dialysis tube was also tied and put in a 50 mL centrifuge tube containing 0.15 M NaCl placed in a shaker incubator (Hottech Instruments Corp, New Taipei City, Taiwan) at room temperature [25]. The effect of methanol leaves extract *A. precatorius* leaves on glucose diffusion was investigated at varying concentrations (6.25, 12.5, 25, and 50 mg/mL) and at different time intervals (0, 4, 8, 12, 16, 20, and 24 h), with distilled water as the control. The percentage of glucose that moved into the external solution was analysed by the glucose oxidase kit [26, 27].

### **Statistical analysis**

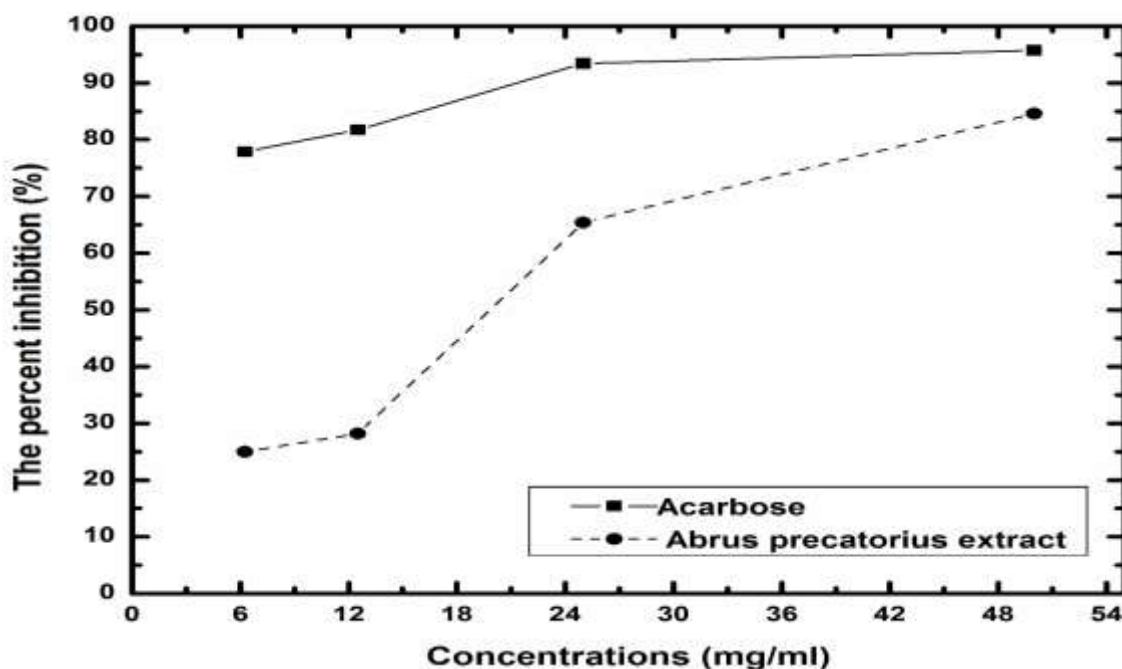
The results of three replicate experiments were collected and expressed as mean ± standard deviation (SD), and the diagrams were obtained using the Origin70 program.

## **Result and Discussion**

### ***In vitro* α-glucosidase inhibition study**

In the present study, the acarbose showed the lowest and highest inhibitory effects of 77.9% and 95.7% at the concentrations of 6.25 and 50 mg/mL, respectively (Figure 1). On the other hand, the methanol leaves extract of *A. precatorius* displayed the lowest and highest inhibitory activity of 25% and 84.6% at the concentration of 6.25 and 50 mg/mL, respectively. The results show that the inhibitory activity of *A. precatorius* leaves extract and acarbose are increased proportionately to the increase in their concentrations, (Figure 1).

Acarbose exhibited better inhibitory effects against glucose diffusion compared to *A. precatorius* methanol leaves extract. The control of postprandial hyperglycaemia is critical in the management of diabetes to reduce its complications [28]. Postprandial hyperglycaemia strongly depends on the amount of monosaccharide absorbed by the small intestine [29]. The control of postprandial hyperglycaemia can be achieved by retarding the absorption of glucose through the inhibition of  $\alpha$ -glycosidase, which cleaves oligosaccharide to monosaccharide in the small intestine [30]. However, acarbose and other synthetic drugs have undesirable toxic side-effects compared to traditional medicines, leading to an increased interest in the use of traditional medicines [31, 32]. Two different studies indicated that long-term use of acarbose cause side effects like flatulence, stomach distention, and diarrhoea [33, 34].



**Fig 1** The percent inhibition of  $\alpha$ -glucosidase enzyme by methanol leaves extract of *A. precatorius* and acarbose at various concentrations. Each value is the mean  $\pm$  SD of three replicate analyses

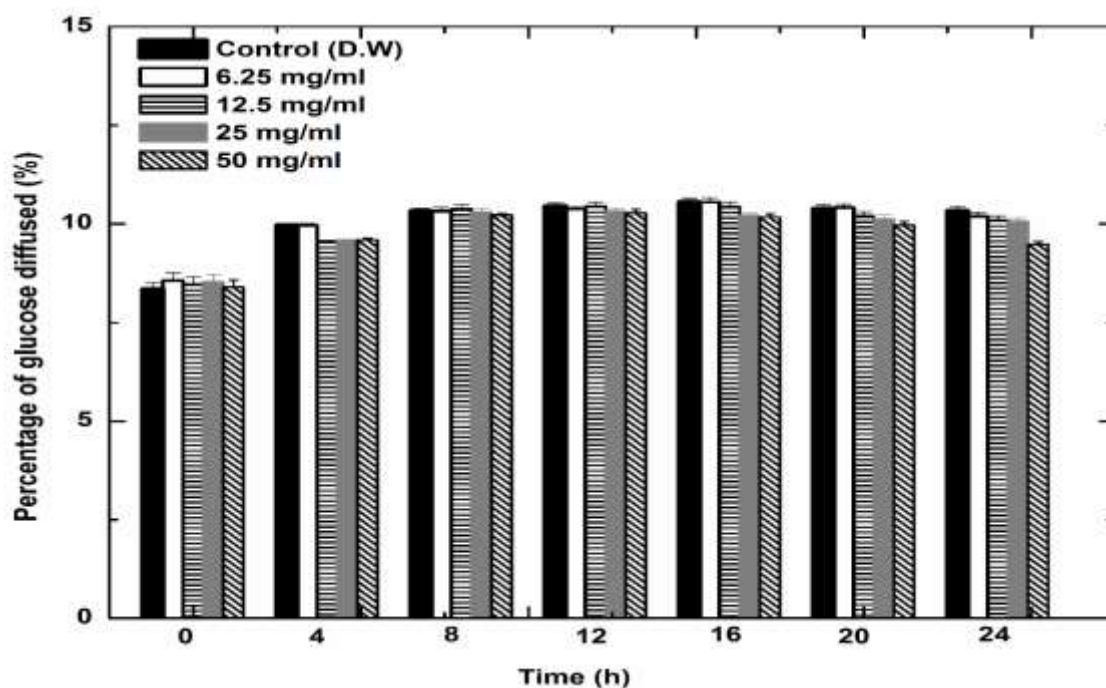
Although present study showed that acarbose represents better result than the *A. precatorius* methanol leaves extract, this *A. precatorius* showed a promising effect by exhibiting an increasing pattern of glucose diffusion inhibition closely resembling those characterised for acarbose. *A. precatorius* methanolic leaves extract showed good inhibitory activity of 65.4%

and 84.6% at the concentration of 25 and 50 mg/mL, respectively, when compared to the positive control (Figure 1). This could be a promising treatment in the management of postprandial hyperglycaemia to avoid undesirable toxic side-effects of synthetic drugs. In another study using aqueous extract the inhibitory activities of aqueous extract of twelve medicinal plants for  $\alpha$ -glucosidase enzyme were investigated; and out of the twelve medicinal plants, the aqueous extract of *A. precatorius* leaves showed potent inhibition of 76.8% [35]. Thus, the present study established that the *A. precatorius* methanol leaves extract is more potent than the aqueous leaves extract of *A. precatorius*. Therefore, further studies are required to identify the potential bioactive compounds that act as  $\alpha$ -glucosidase enzyme inhibitors.

#### **The effects of *A. precatorius* methanol leaves extract on glucose diffusion via *in vitro* study**

The present study shows that the effect of methanol leaves extract of *A. precatorius* at various concentrations was very close to the control reading ( Figure 2). This study indicates that methanol leaves extract of *A. precatorius* did not show any effect on glucose diffusion. Nonetheless, a slight inhibition effect on glucose diffusion was observed at the concentrations of 12.5, 25, and 50 mg/mL after 16 h when compared to the control. Besides, the methanol leaves extract exhibits a higher effect (9.5%) of the 50 mg/mL concentration within 24 h compared to other concentrations. Thus, concentrations higher than 50 mg/mL may show a greater inhibitory effect on glucose diffusion. Generally, the study demonstrated that methanol leaves extract of *A. precatorius* did not show effect on glucose diffusion in these concentrations. However, previous studies showed that there is a relationship between the viscosity of the soluble polysaccharide constituents of plants and their ability to inhibit glucose absorption [21, 24, 26]. Further study is needed to investigate the role of the viscosity of suspensions of *A. precatorius* methanol leaves extract on glucose diffusion or absorption. Similar results were reported by another study that used the same method to assess the potential of the ethanolic and aqueous extracts of *Teucrium polium* to retard the movement and diffusion of glucose from a sealed dialysis tube into the external solution [23]. The results showed that *T. polium* did not show any entrapment ability in decreasing glucose movement into the external solution [23]. It is noteworthy that the methanol leaves extract of *A.*

*precatorius* might show inhibitory effect on glucose diffusion at the concentration of 50 mg/mL, while *T. polium* did not show any inhibitory effect on glucose diffusion. This observation suggested that the antidiabetic action of *T. polium* is not be related to glucose diffusion and may depend on other mechanisms of inhibition of carbohydrate hydrolysing enzymes, increased insulin production from pancreatic  $\beta$ -cells, or decreased insulin resistance. Therefore, the antidiabetic activity of the methanol leaves extract of *A. precatorius* might be due to  $\alpha$ -glucosidase inhibition, which appeared to be more potent than retarding the diffusion of glucose in the small intestinal tract or might also involve different mechanism as an antidiabetic agent.



**Fig 2** The effect of methanol leaves extract of *A. precatorius* at varying concentrations on the diffusion of glucose out of dialysis tube through 24 h incubation period. Each value is the mean  $\pm$  standard deviation of four replicate analyses.

In another study, an aqueous extract of the whole plant for ten plants (*Agaricus campestris*, *Agrimony eupatoria*, *Coriandrum sativum*, *Eucalyptus globulus*, *Juniperus communis*, *Medicago sativa*, *Persea americana*, *Sambucus nigra*, *Urtica dioica*, and *Viscum album*) with antihyperglycemic properties have been tested to evaluate their potential effects on gastrointestinal glucose diffusion [21]. *P.americana* and *A.eupatoria* decreased glucose

diffusion in vitro by more than 50%. Aqueous extracts of *V.album*, *J.communis*, *A.campestris*, *E.globulus*, *M.sativa*, and *C.sativum* decreased the activity of glucose diffusion significantly but were less effective than *P.americana* and *A.eupatoria*. Meanwhile, *S.nigra* and *U.diocia* extracts did not significantly decrease glucose diffusion [21]. The study indicated that the plants have antihyperglycemic properties, and some of them can inhibit glucose diffusion. Whereas, other plants did not show any ability to inhibit glucose diffusion. It is noteworthy that the antidiabetic plants have different mechanisms, which assist in treating diabetes and its complications. These include glycosidase (glucosidase) inhibitor mechanism,  $\alpha$ -amylase inhibitor mechanism, inhibition of hepatic glucose metabolising enzyme mechanism, antioxidant mechanism, inhibition of glycosylation of haemoglobin mechanism and modulation of glucose absorption from the gut [36].

## Conclusion

Based on the results, *A. precatorius* methanol leaves extract showed good inhibitory activity for the  $\alpha$ -glucosidase enzyme. On the other hand, it did not show any effect on glucose diffusion, except a slight effect at the highest concentration of 50 mg/mL within 24 h. In our opinion, the ability of *A. precatorius* plant to inhibit the activity of the intestinal  $\alpha$ -glucosidase enzyme is one of the reasons that can explain the traditional healer's use of *A. precatorius* leaves for the treatment of type II diabetes. The 80% methanol leaves extract of *A. precatorius* showed excellent inhibitory activity for the  $\alpha$ -glucosidase enzyme. Therefore, further studies are recommended to isolate and test the potential compounds responsible for inhibitory activity of the  $\alpha$ -glucosidase enzyme.

## Acknowledgments

The authors thank Universiti Teknologi Malaysia for the financial support under the Research University Grant (Q.J130000.3554.07G36).

## References

1. West, I., Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine*, 2000. 17(3): p. 171-180.
2. Sridhar, S., S. Kumari, and A. T Paul, Diabetic complications: A natural product perspective. *Pharmaceutical Crops*, 2014. 5(1).
3. Ogurtsova, K., et al., IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes research and clinical practice*, 2017. 128: p. 40-50.

4. Association, A.D., 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2018. *Diabetes care*, 2018. 41(Supplement 1): p. S13-S27.
5. Soumya, D. and B. Srilatha, Late stage complications of diabetes and insulin resistance. *J Diabetes Metab*, 2011. 2(9): p. 1000167.
6. Penumala, M., et al., Phytochemical profiling and in vitro screening for anticholinesterase, antioxidant, antiglucosidase and neuroprotective effect of three traditional medicinal plants for Alzheimer's Disease and Diabetes Mellitus dual therapy. *BMC complementary and alternative medicine*, 2018. 18(1): p. 77.
7. Jones, K., et al., Mapping the intestinal alpha-glucogenic enzyme specificities of starch digesting maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2011. 19(13): p. 3929-3934.
8. Lieberman, M. and A.D. Marks, *Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach*. 2009: Lippincott Williams & Wilkins.
9. Sinha, D., et al., Recent status on carbohydrate metabolizing enzyme inhibitors in regulation of diabetes: a mechanism based review. *Journal of applied pharmaceutical research*, 2015. 3(2): p. 1-7.
10. Heacock, P.M., et al., Effects of a medical food containing an herbal  $\alpha$ -glucosidase inhibitor on postprandial glycemia and insulinemia in healthy adults. *Journal of the American Dietetic Association*, 2005. 105(1): p. 65-71.
11. Wu, H., et al., Comparative assessment of the efficacy and safety of acarbose and metformin combined with premixed insulin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Medicine*, 2017. 96(35).
12. Thongnum, K. and S. Chanthai, Inhibitory reactivity of capsaicin with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase related to antidiabetes using molecular docking and quantum calculation methods. *Oriental Journal of Chemistry*, 2018. 34(5): p. 2211.
13. Figueiredo-González, M., et al.,  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose? *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2016. 118: p. 322-327.
14. Kee, K.T., et al., Screening culinary herbs for antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities. *International Journal of Food Science & Technology*, 2013. 48(9): p. 1884-1891.
15. Mohamed, E.A.H., et al., Potent  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of standardized 50% ethanolic extracts and sinensetin from *Orthosiphon stamineus* Benth as anti-diabetic mechanism. *BMC complementary and alternative medicine*, 2012. 12(1): p. 176.
16. Shadhan, R.M. and S.P.M. Bohari, Effects of *Hibiscus sabdariffa* Linn. fruit extracts on  $\alpha$ -glucosidase enzyme, glucose diffusion and wound healing activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017. 7(5): p. 466-472.
17. Bohari, M., et al., Glucose uptake: stimulatory activity of *Gynura procumbens* in 3T3-F442A adipocytes. *Malaysian Medicinal Plant: Chemistry and Biological Activity*, 2006.
18. Rege, A. and A.S. Chowdhary, Evaluation of Alpha-Amylase and Alpha-Glucosidase Inhibitory Activities of *Ocimum sanctum* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review & Research*, 2014. 25(1).
19. Joshi, S.R., et al., Therapeutic potential of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus: an evidence-based review. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2015. 16(13): p. 1959-1981.
20. Dong, H.-Q., et al., Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry*, 2012. 130(2): p. 261-266.
21. Gallagher, A., et al., The effects of traditional antidiabetic plants on in vitro glucose diffusion. *Nutrition research*, 2003. 23(3): p. 413-424.
22. Edwards, C., I. Johnson, and N. Read, Do viscous polysaccharides slow absorption by inhibiting diffusion or convection? *European Journal of Clinical Nutrition*, 1988. 42(4): p. 307-312.

23. Qujeq, D. and A. Babazadeh, The entrapment ability of aqueous and ethanolic extract of *Teucrium polium*: glucose diffusion into the external solution. *International journal of molecular and cellular medicine*, 2013. 2(2): p. 93.
24. Picot, C., A.H. Subratty, and M.F. Mahomoodally, Inhibitory potential of five traditionally used native antidiabetic medicinal plants on  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, glucose entrapment, and amylolysis kinetics in vitro. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2014. 2014.
25. Saini, P. and M. Gangwar, Enzyme and free radical inhibitory potentials of ethyl acetate extract of endophytic actinomycete from *Syzygium cumini*. 2017.
26. Edwards, C., et al., Viscosity of food gums determined in vitro related to their hypoglycemic actions. *The American journal of clinical nutrition*, 1987. 46(1): p. 72-77.
27. Basha, S.K. and V.S. Kumari, In vitro antidiabetic activity of *Psidium guajava* leaves extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2012. 2: p. S98-S100.
28. Ortiz-Andrade, R., et al.,  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity of the methanolic extract from *Tournefortia hartwegiana*: An anti-hyperglycemic agent. *Journal of ethnopharmacology*, 2007. 109(1): p. 48-53.
29. Hanefeld, M. and F. Schaper, The role of alpha-glucosidase inhibitors (acarbose), in *Pharmacotherapy of Diabetes: New Developments*. 2007, Springer. p. 143-152.
30. Shim, Y.-J., et al., Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. *Journal of ethnopharmacology*, 2003. 85(2): p. 283-287.
31. Bastaki, A., *Diabetes mellitus and its treatment*. *International journal of Diabetes and Metabolism*, 2005. 13(3): p. 111.
32. Chaudhuri, A. and S. Sharma, Evaluation of antidiabetic activity of polyherbal formulation in streptozotocin-induced diabetic rats. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 2016. 4(5): p. 01-06.
33. Chiasson, J.-L., et al., Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *The Lancet*, 2002. 359(9323): p. 2072-2077.
34. Sekar, V., et al., Mangiferin from *Mangifera indica* fruits reduces post-prandial glucose level by inhibiting  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase activity. *South African journal of botany*, 2019. 120: p. 129-134.
35. Alagesan, K., et al., Identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Psidium guajava* leaves and *Syzygium cumini* Linn. seeds. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 2012. 3(2): p. 316-322.
36. Ogbonnia, S. and C. Anyakora. *Chemistry and Biological Evaluation of Nigerian Plants with Anti-Diabetic Properties*. in ACS symposium series. 2009. Oxford University Press.



Şimşek, A., H. Dinler, and S. Duru, Uşak İli Sert Çekirdekli Meyve Üreticilerinin Fitopatolojik Sorunlara Yaklaşımlarının Belirlenmesi. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(2): p. 127-147. DOI: 10.38001/ijlsb.703382

## Uşak İli Sert Çekirdekli Meyve Üreticilerinin Fitopatolojik Sorunlara Yaklaşımlarının Belirlenmesi

Altınay Şimşek<sup>1</sup> , Havva Dinler<sup>2\*</sup> , Sinan Duru<sup>3</sup> 

### ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Uşak ili sert çekirdekli meyve (çoğunlukla kiraz ve vişne) üretiminde üreticilerin karşılaştıkları fitopatolojik sorunlar, tarımsal ilaç kullanımında üreticinin eğilimleri ve çevreyle olan ilişkilerini belirlemektir. Araştırma alanını Uşak ili Merkez, Sivaslı, Banaz ve Eşme ilçe merkezleri, bunlara bağlı köy ve mahalleler oluşturmuştur. Araştırmada kullanılan veriler 100 sert çekirdekli meyve üreticisinden yüz yüze anket yöntemiyle elde edilmiştir. Anket verileri 2019 yılı üretim sezonunu kapsamaktadır. Çiftçi kayıt sisteminden (ÇKS) üretimin yoğun olduğu yerlerden rastgele seçilen 100 üreticiye 33 soru yöneltilmiş ve verilen cevaplar değerlendirilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, ilaçlamaya karar vermede kişinin kendi bilgileri ile ilaçlama yaptığını ortaya koymaktadır. Araştırmaya katılan üreticilerin % 39'u ilkokul mezunu, % 47'si 31 yıldan daha uzun süredir yetiştiricilik yapmakta, %40'ı 1-10 dekar arasında yetiştiricilik yapmaktadır. Ayrıca üreticilerin % 69'u kiraz yetiştiriciliği ile uğraşmaktadır. Yetiştiricilerin % 58'i ara tarım yapmakta, en fazla domates, biber ve patlıcan yetiştiriciliği yapmaktadır. Yetiştiricilerin % 54'ü düzenli olarak ilaçlama yapmaktadır. Bitki koruma ürünleri ile ilgili kurs alan üretici % 8'i aşmamaktadır. Pestisit kullanımı çevreyi kirlettiği algısı mevcut olup, ancak mücadeleyi daha önemli bulan üreticiler % 45'i oluşturmaktadır. Araştırmada üreticilerin sorulara verdikleri yanıtlar ile oluşturulan gruplar arasındaki istatistiki ilişkiyi tespit etmek için ki-kare analizi uygulanmıştır. Buna göre üreticilerin bir hastalık, zararlı ve yabancı otu gördüğünde ilaçlama yapma durumu bağımlı değişken olurken, sosyo-demografik yapısı, tarımsal üretim ve tarımsal ilaç kullanım özellikleri bağımsız değişken olup, bu gruplar arasındaki olası istatistiki ilişki ki-kare analizi ile test edilmiştir.

### MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş  
18 Mart 2020  
Kabul  
22 Nisan 2020

### ANAHTAR KELİMELER

Uşak,  
sert çekirdekli meyveler,  
fitopatolojik problemler

<sup>1</sup> Uşak Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Uşak- Türkiye

<sup>2</sup> Uşak Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Uşak- Türkiye

<sup>3</sup> Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı, Adana- Türkiye

\* Sorumlu yazar: Havva Dinler, [havva.dinler@usak.edu.tr](mailto:havva.dinler@usak.edu.tr)

# Determination of Approaches of the Stone Fruit Producers to the Phytopathological Problems of Uşak Province

## ABSTRACT

The purpose of this study is to determine the phytopathological problems of stone fruit (mostly cherry, sour cherry) producers, producers's tendencies in the use of pesticides and their relations with the environments in Usak province. The research field is composed of Uşak city center, Sivaslı, Banaz and Eşme district centers, villages and neighborhoods connected to them. The data used in this study have been obtained from 100 stone fruit producers through face-to-face survey method. The survey data include 2019 production season. 33 questions were asked to 100 producers randomly selected from the places where production is intense on farmers register system and the answers were evaluated. Study results reveal that people decide on applying pesticides based their own knowledge. 39% of the producers in the study is primary school graduate, 47 % of them has been cultivating more than 31 years, %40 of them has been cultivating on 1-10 decares of area. In addition, 69% of the producers are engaged with cherry cultivation. 58 % of the producers engage with intermediate agriculture and they cultivate tomatoes, peppers and aubergines most. 54 % of the producers applies pesticides regularly. The producer who takes courses on plant protection products does not exceed 8%. Although there is a perception that use of pesticide pollutes the environment, producers who find the agricultural struggle more important constitute 45 %. Chi-square analysis was implemented in the study in order to identify the statistical relationship between the answers of producers to the questions and the established groups. Accordingly, while the producers' use of pesticides when they see a disease, pest and weed is the dependent variable, their socio-demographic structure, agricultural production and pesticide use characteristics are the independent variables and the possible statistical relationship between these groups was tested by chi-square analysis.

## ARTICLE HISTORY

Received

18 March 2020

Accepted

22 April 2020

## KEY WORDS

Uşak, stone fruits, phytopathological problems

## Giriş

Tarımsal üretimde hızla artan dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılayabilmek amacıyla birim alandan elde edilen ürün miktarı ve kalitesi arttırılmaya çalışılmaktadır. Dolayısıyla üretim alanlarının sınırlı olması ve her geçen gün tarıma uygun alanlarının yüzölçümünün gittikçe azalması durumun önemi daha da ortaya koymaktadır. Bu amaçla üretimde kullanılan modern tekniklerin yanında ürün miktarının ve kalitesinin arttırılmasına yönelik tarım ilaçlarının da kullanılması üreticilere önemli maliyetler getirmektedir.

Ayrıca ürünün korunmasında bitki koruma uygulamaları açısından üreticilerin; karşılaşılan hastalık ve zararlıların tanınması yapıldıktan sonra kültür bitkisinin bu hastalık ve zararlılardan korunması amacıyla alınması gereken tüm önlemlerin belirlenip, uygulanmasını sağlamak tarımsal mücadelede bitki koruma sorunlarının giderilmesinde büyük önem taşımaktadır [1]. Dolayısıyla tarımsal üretimin ve kalitesinin arttırılmasında bütün modern tekniklerin kullanılması, verimli çeşitlerin seçilmesi ve yetiştiricilikte tüm bakım (sulama, budama, toprak işleme vs.) ve bitki besleme işlemlerinin yapılmasının

yanında hastalık, zararlı ve yabancı otlar nedeniyle ürün kayıplarının en aza indirilmesi bilinçli bir tarımsal mücadele ile olmalıdır. Bu etmenlere karşı önlem alınması gerektiği ve mücadele edilmediği takdirde ürün kayıplarının % 100'e kadar ulaşabileceği ve bu neden ile mücadelenin zorunlu olduğu ifade edilmiştir [2]. Etkili bir mücadelede ilk akla gelen uygulama kolaylığı ve hızlı sonuç alınması nedeniyle kimyasal mücadele olmaktadır [1] ;[2]. Hatta kimyasal mücadelede zirai ilaçlar kullanılmadığı zaman üründe % 45-65 oranında kayıplar meydana geldiği belirtilmektedir [3]. Tarım ilaçlarının bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı hem çevre, insan ve hayvan sağlığını olumsuz etkilemekte hem de havaya, suya ve toprağa karışarak doğal yaşamı da olumsuz etkilemekte ve tüketilen gıda maddelerinde de kalıntı sorunu ortaya çıkarmaktadır. Tarımsal üretimde hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı kullanılan bu kimyasalların doğal dengeyi ve ekolojik koşulları bozacak düzeyde uygulanması sonucu tarım alanlarının üretime elverişli olma özelliklerini kaybettikleri belirtilmiştir [4]. Tüm bunların yanında ana zararlılarda direnç oluşurken, ekonomik zarara yol açmayan diğer zararlılar ana zararlı durumuna geçmekte, yararlıların popülasyonun azalması nedeniyle doğal denge bozulmakta ve bitkilerde fitotoksitesi görülmektedir [3].

Sert çekirdekli meyveler Rosales takımı, Rosaceae (gülgiller) familyası, Prunoideae alt familyası içerisinde yer almaktadırlar [5]. Dünya genelinde ılıman iklim kuşaklarındaki ülkelerde ekonomik değer bakımından önemli yer tutmaktadırlar. *Prunoideae* alt familyasında; kayısı (*Prunus armenica* L.), kiraz (*P. avium* L.), vişne (*P.cerasus* L.) şeftali (*P. persica* L.), erik (*P.domestica* L.) ve badem [*P. amygdalus* Batsch = *P. dulcis* (Miller) D.A. Webb] gibi bazı önemli meyve türleri bulunmaktadır. FAO (Food and Agricultural Organization) 2018 yılı verilerine göre; dünyada 57.2 milyon hektar alanda 33.9 milyon ton sert çekirdekli meyve üretimi yapılmakta olup, ülkemizde ise toplam 2913 hektar alanda, 15.462 ton sert çekirdekli meyve üretimi yapılmaktadır [6]. Uşak İli 2019 yılı üretim alanı yaklaşık 15.000 dekar olup, üretim miktarı 8000 ton olarak kaydedilmiştir. Uşak İli'nde ceviz (3.300 ton), elma (4242 ton), kiraz (2770 ton), badem (1850 ton) ve vişne (1717 ton) en fazla yetiştiriciliği yapılan meyve ağaçları arasında yer almaktadır [7].

Ülkemizde 2017 yılında toplam 296 milyon dolarlık sert çekirdekli meyve ihracatı yapılmıştır [8]. Kullanım alanları sofralık, taze ve kuru olarak tüketilmeleri yanında gıda sanayii ve kozmetik sanayiinde önemli yere sahiptirler [9]. Ülke ekonomisine faydaları

fazla olan sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan birçok hastalık zararlı ve yabancı otlar bulunmaktadır [10]; [11]; [12].

Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan çeşitli ürünlerde bitki koruma yöntemleri ve fitopatolojik problemler ile ilgili çeşitli anket çalışmaları yapılmıştır [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20], [21], [22]. Etkili bir tarımsal mücadelede önemli olan öncelikle üreticilerin gerekli bilgi ve donanımına sahip olmalarıdır. Bilinçsiz şekilde yapılan tarımsal mücadele sonucu ciddi sorunlar ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde de yanlış bilinen tarımsal mücadele denilince akla sadece tek yönlü uygulanan kimyasal mücadele olmaktadır. Aydın'da yapılan anket çalışmasında üreticilerin % 86.02'sinin [23], Antalya'da ise % 92'sinin [2] ortaya çıkan zararlılarla savaşında kimyasal mücadele yöntemini tercih ederek tarım ilacı kullanıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca tek yönlü kimyasal mücadele yapılmasının zararlılarda direnç oluşturması, üründe kalıntı ve çevre kirliliğine neden olması gibi sorunlara neden olduğu da ifade edilmiştir [24]. Isparta'da kiraz üreticilerinin ilindeki tarımsal ürünlerde kimyasal ilaç kullanım amacını değerlendirilmesi açısından bir çalışma yapılmıştır [25]. Gençsoylu ve Başpınar (2004) ise 400 üretici ile Büyük Menderes havzasında yapılan anket çalışması ile pamuk yetiştirilen alanlarda zirai ilaç kullanımını konusunu araştırmışlardır [26].

Uşak ilinde sert çekirdekli meyve bahçelerinde üreticilerin yaşadığı sorunlara yönelik yapılmış herhangi bir araştırma tespit edilememiştir. Bu nedenle 2019 yılı, Uşak İli Eşme, Banaz, Merkez ve Sivaslı ilçelerinde, sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapan çiftçilere yönelik anket çalışmasında; üreticilerinin sosyo-ekonomik durumları, bitki koruma sorunları ve yapmış oldukları kimyasal mücadele uygulamaları, insan ve çevre sağlığı açısından çiftçilerin bilinçliliğinin ölçülmesi irdelenerek, sorunlarıyla ilgili bilgilerin toplanması ve bunlara yönelik çözüm önerilerinin sunulması amaçlanmıştır.

Anketlerin tamamı yüz yüze görüşülerek yapılmış olup anket verilerin analizinde; üreticilerin vermiş olduğu cevaplara göre tanımlayıcı istatistikler (aritmetik ortalama, frekans tabloları, yüzde (%)) hesaplamaları) kullanılmıştır.

## **Materyal ve Metot**

Araştırmanın materyalini 2019 yılında Uşak ilinde sert çekirdekli meyve üretim alanlarının yoğun olarak yapıldığı yerler olan Merkez, Eşme, Banaz ve Sivaslı ilçelerinde yürütülmüştür. Her ilçeden il genelinde yapılan üretim yoğunluğa göre üreticiler ile bire bir görüşülerek anket formları doldurulmuştur. Çalışmanın ana materyalini yoğunlukla

kiraz yetiştiriciliği yapan üreticiler (yürütülen tez çalışması kapsamında) oluşturmuştur ve sorular bu üreticilere yöneltilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1** Uşak İli ve ilçeleri 2019 yılı kiraz ve vişne üretim alanı ve üretim miktarı

	Banaz		Eşme		Merkez		Sivahlı	
	Üretim Alanı (da)	Üretim Miktarı (Ton)	Üretim Alanı (da)	Üretim Miktarı (Ton)	Üretim Alanı (da)	Üretim Miktarı (Ton)	Üretim Alanı (da)	Üretim Miktarı (Ton)
<b>Kiraz</b>	964	720	1200	726	150	475	1900	753
<b>Vişne</b>	1350	1100	57	61	100	324	510	96

Bölgede faaliyet gösteren sert çekirdekli meyve üretimi yapan üreticilerden basit tesadüfi örnekleme yöntemiyle % 95 güven aralığı ve % 5 hata payı sınırları çerçevesinde hesaplama ile 100 üretici ile anket yapılması hesaplanmıştır [27]. Basit tesadüfi örnekleme yöntemiyle evrendeki her elemanın örnekleme seçilme olasılığı eşit olmakta, örnekleme seçilen bir birimin diğerini etkilememekte ve evren büyük ve karışık olduğundan örnekleme seçim süreci zor olmamaktadır [28].

$$n = \frac{N * s^2 * t^2}{(N-1) * d^2 + s^2 * t^2}$$

$$(N-1) * d^2 + s^2 * t^2$$

n= Örnek hacmi

N= Evren

s<sup>2</sup>= Varyans (s=Standart Sapma)

t= % 95 güven sınırında bulunan t değeri (1.95)

d= Kabul Edilebilir Hata Payı (% 5 sapma)

Üreticilere araştırmanın amacı hakkında bilgi verildikten sonra yapılan anketler sonucunda veriler toplanmış, bilgiler değerlendirilmiş ve verilerle uygun istatistiksel analizler yapılmıştır. Anket sorularının ilk kısmı üreticilerin sosyodemografik (adı soyadı, yaşı, cinsiyeti, il-ilçesi, köyü ve öğrenim durumu) bilgilerini içeren açık uçlu sorulardan oluşmaktadır. Anketin ana kısmı sert çekirdekli meyve üreticilerinin fitopatolojik sorunlara yaklaşımlarına yönelik 33 adet kategorik (çoktan seçmeli) sorudan oluşmaktadır. Anket çalışması sonucunda elde edilen veriler istatistik paket programında

(SPSS 23 for Windows) değerlendirilmiştir. Buna göre üreticiler; sorulara verdikleri cevaplar ve bu cevaplar arasındaki istatistiki ilişki ki-kare analizi [29] ile test edilmiştir. Çalışmada; üreticilerin hastalık, zararlı veya yabancı otu gördüğünde ilaçlama yapma durumu bağımlı değişken olurken, sosyo-demografik, tarımsal üretim ve tarımsal ilaç kullanım özellikleri bağımsız değişken olarak belirlenmiş ve anket soruları kategorik olduğundan dolayı en uygun istatistiksel analiz olarak ki-kare testi uygulanarak aralarındaki ilişki/fark ortaya konmuştur. Bağımsız değişkene ilişkin veriler üreticilerin hastalık, zararlı veya yabancı otu gördüğünde ilaçlama yapma durumuna göre crosstab (çapraz tablo) değerleri hesaplanarak tablo halinde verilmiştir. Ki-kare testi iki veya daha fazla kategorik değişkenli grup arasındaki fark olup olmadığını inceleyen istatistiksel bir analiz yöntemidir. Ki-kare testinde araştırma değişkenin kategoriler arasında dağılımı veya gözlenen-beklenen değerler arasında anlamlı bir fark olup olmadığı ölçümüdür [30]. Ki-kare değerinin sürekli dağılım göstermesi sebebiyle 0 ile  $+\infty$  arasında değer almakta olup, homojenlik, uygunluk, varyans tahmini ve kontenjan katsayısının hesabında da kullanılmaktadır [31].

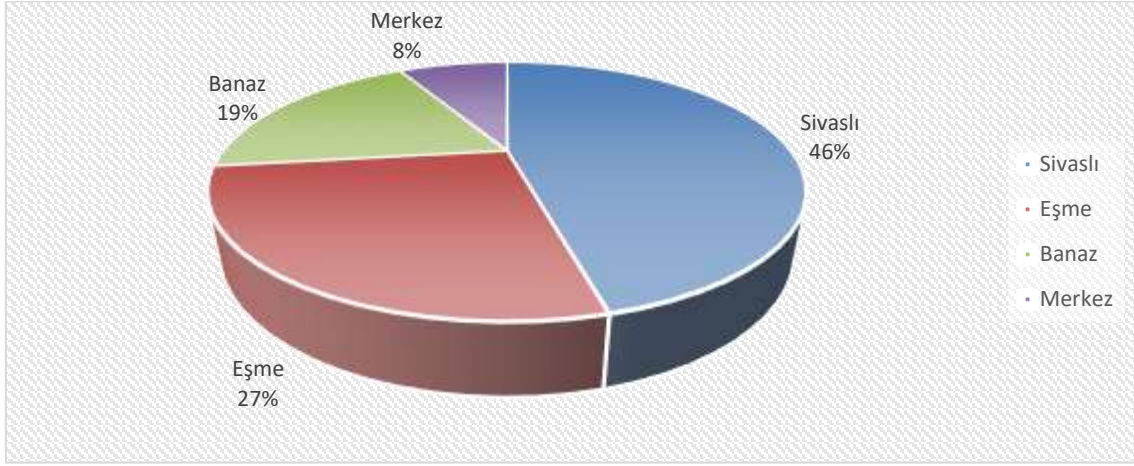
## **Bulgular ve Tartışma**

Tarımsal üretim sürecinde üreticilerimiz yetiştirilen ürünün birim alandan üretim miktarının ve kalitenin artırılmasında önemli sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu sorunları tespit edip ve elde edilen veriler dikkate alınarak çözüm yolları oluşturmak amacıyla çoktan seçmeli 33 soruluk anket çalışması ele alınmıştır. Çalışmanın ana materyalini oluşturan üreticiler yapılan tez çalışması ile paralel olarak, yoğunlukla kiraz yetiştiriciliği yapan üreticilere sorular yöneltilmiştir. Ankete katılan üreticilerin sosyo-demografik değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistikleri Tablo 2’ de verilmiştir. Ankete katılan üreticilerin tamamı erkek (n=100) üreticiler olup, yaş ortalaması 53.90 ve ortalama eğitim süreleri ise 8.52 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2** Sosyo-demografik değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistikler

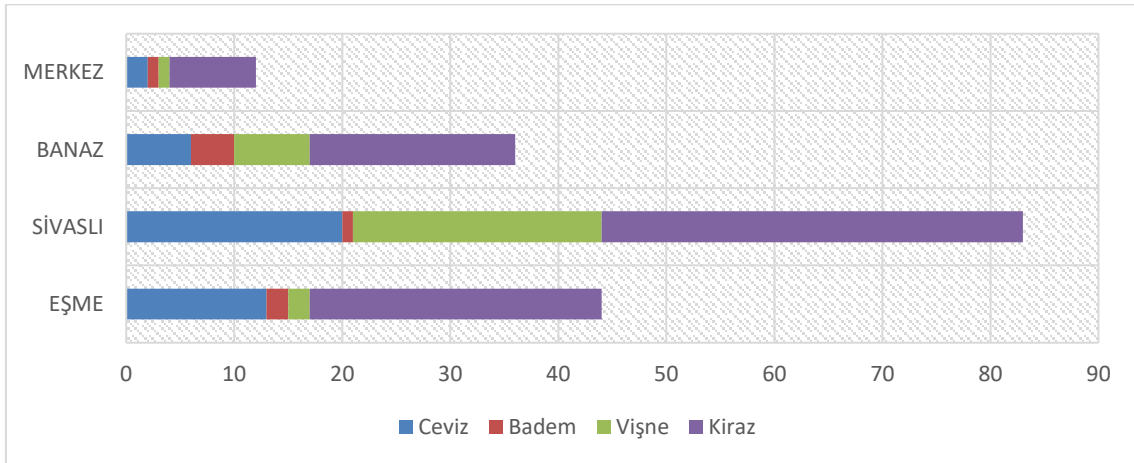
<b>Değişkenler</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maksimum</b>	<b>Standart Sapma</b>
Yaş	53.90	23	82	12.144
Cinsiyet	1.00	1	1	0.000
Eğitim Süresi	8.52	0	17	4.091

Uşak İl'inde Sivaslı (2400 da), Eşme (1943 da), Banaz (964 da) ve Merkez (500 da) ilçelerinde kiraz yetiştiriciliği yoğun olarak yapılmaktadır [7].



Şekil 1 Ankete katılan üreticilerin katılım oranları (%)

Ankete katılan üreticiler Uşak İli Sivaslı, Eşme, Banaz ve Merkez İlçesi'nin farklı köy ve mahallelerinde ikamet etmektedirler. Katılım yoğunluğunun en fazla % 46 ile Sivaslı'da olduğu bunu sırası ile % 27 Eşme, % 19 Banaz ve % 8 Merkez ilçe takip etmektedir (Tablo 3, Şekil 1). Anket yapılan yetiştiriciden % 69'u kiraz, % 25'i vişne ve % 6'sı badem yetiştirmektedir (Şekil 2).



Şekil 2 Ankete katılan üreticiler (ilçe) ve yetiştirdikleri sert çekirdekli meyveler (%)

Araştırmada üreticilerin sosyo-demografik özellikleri ile hastalık, zararlı veya yabancı ot gördüğünde ilaçlama yapma durumu arasında istatistiksel bir fark olup olmadığını belirlemek amacıyla tek örneklem ki-kare testi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda üreticilerin sosyo-demografik özelliklerinden sadece ikamet ettiği ilçeye göre ilaçlama yapma durumu arasındaki ilişki istatistiksel açıdan önemli ( $\chi^2(3)=8.580$ ,  $p=0.035$ ) olduğu

belirlenmiştir. Sosyo-demografik özellikler açısından istatistiksel olarak sadece ikamet ettiği ilçeye göre anlamlı bir biçimde farklılaştığından Sivaslı (n=46) ve Eşme (n=27) ilçelerinde ikamet eden üreticilerin bir hastalık, zararlı veya yabancı otu görür görmez ilaçlama yapmaya daha yatkın olduğu söylenebilir. Dolayısıyla üretim miktarı ve ekonomik olarak getirisi diğer ilçelere göre fazla olması nedeniyle ilçede üreticilerin yetiştiricilikte bitki koruma sorunlarına farkındalığı ve hassasiyetinin daha yüksek olduğu kanısını oluşturmaktadır (Tablo 3).

**Tablo 3** Üreticilerin sosyo-demografik özelliklerine göre dağılımı

Değişkenler	Hastalık, zararlı veya yabancı otu gördüğünde ilaçlama yapma			$\chi^2$	p
	Evet	Hayır	Toplam		
Üreticinin Bulunduğu İlçe					
<b>Sivaslı</b>	27	19	46	8.580	0.035*
<b>Eşme</b>	16	11	27		
<b>Banaz</b>	5	14	19		
<b>Merkez</b>	2	6	8		
Toplam	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
Öğrenim Durumu					
<b>Okuryazar</b>	1	3	4	4.541	0.474
<b>İlkokul</b>	21	18	39		
<b>Ortaokul</b>	5	7	12		
<b>Lise</b>	13	16	29		
<b>Üniversite**</b>	10	6	16		
Toplam	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
Meyve Üretim Alanı (da)					
<b>1-10</b>	17	23	40	2.014	0.365
<b>10-25</b>	19	18	37		
<b>25 üstü</b>	14	9	23		
Toplam	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
Çiftçilik Süresi (Yıl)					
<b>1-5</b>	1	5	6	2.898	0.408
<b>6-10</b>	11	11	22		
<b>11-20</b>	13	12	25		
<b>31 üstü</b>	25	22	47		
Toplam	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		

\*p≤0.05 (istatistiksel olarak önemlidir)

\*\*1 Kişi Lisansüstü mezundur

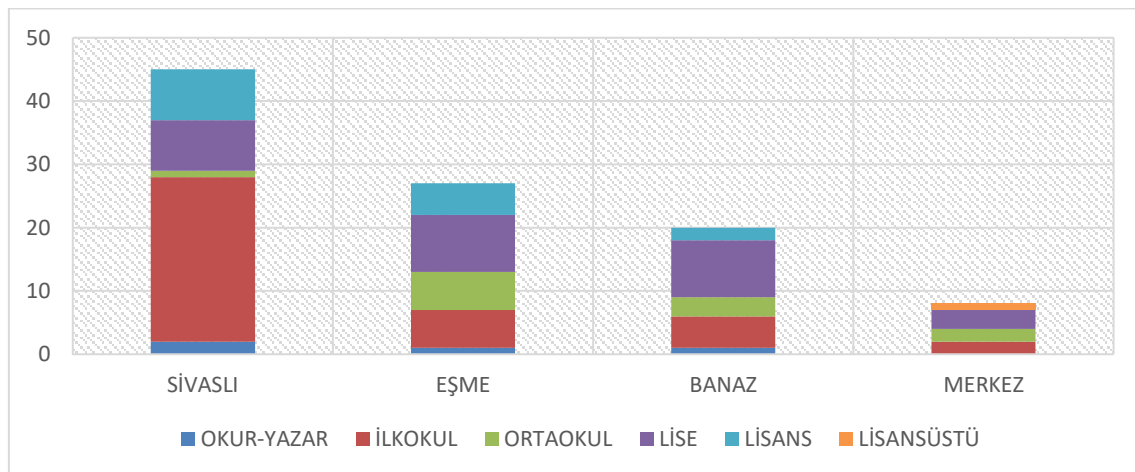


Görür görmez ilaçlama yapmayan üreticiler (% 49) ise, bunun nedeni olarak masraflı olduğu için atmadığını belirtirken (% 25), bazı üreticiler hastalığı önemsiz ve az gördüğü için (% 21) ilaçlama yapmıyor olduğunu belirtmişlerdir. Geriye kalanlar üreticilerin ise (% 5) diğer nedenlerden dolayı görür görmez ilaçlama yapmamaktadır.

Güneydoğu Anadolu bölgesinde yapılan çalışmada ise, üreticilerin hastalık veya zararlıyı görür görmez ilaçlama yapanlar (% 34) ve yapmayanlar (% 66) olarak belirlemişlerdir [32].

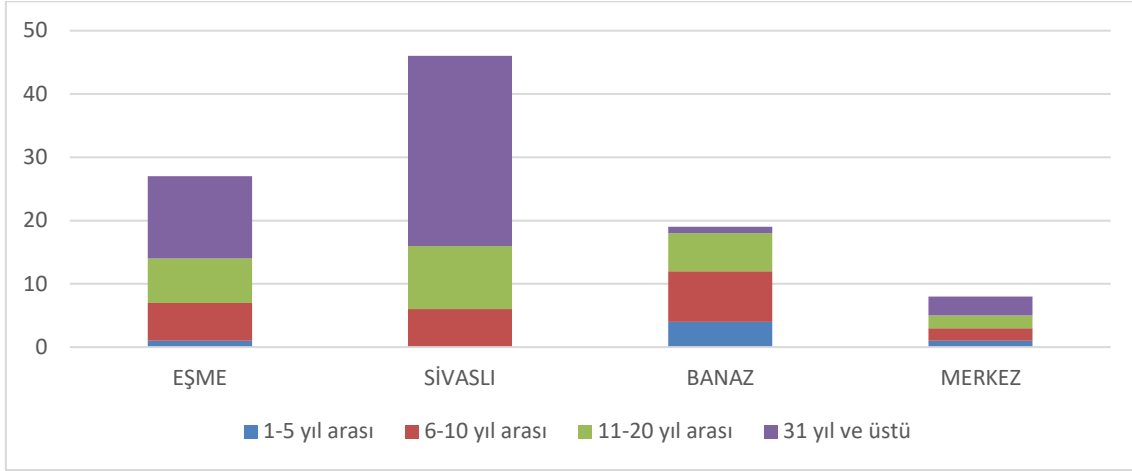
Tanrıvermiş (2000) Sakarya Havzası'nda yapmış olduğu anket sonucuna göre üreticilerin % 79'u tarım arazilerinde hastalık ve zararlı görmeden zirai ilaç kullandıklarını belirtmiştir [33]. Emeli ve Ulusoy (2006), Seyhan ve Yüreğir havzasında yaptıkları çalışmada; üreticilerin hastalık ve zararlıların daha fazla çoğalmadan yok etmek amacıyla hastalık veya zararlıyı gözlemlemeden ilaçlama yapmakta (% 65) olduğu, ancak zararlıyı görür görmez ilaçlama yapanların oranının üreticilerde % 38 civarında olduğunu ifade etmişlerdir [22]. Karataş ve Alaoğlu (2011) yaptıkları bir çalışmada, üreticilerin % 56'sı hastalık veya zararlıyı görür görmez ilaçlama yapmadığını belirtmişlerdir [34]. Ancak hastalık veya zararlının daha fazla çoğalmadan yok etmek amacıyla görür görmez ilaçlama yapanların oranının % 56 olduğunu saptamışlardır.

Ankete katılan meyve üreticilerininin % 39'u ilkokul, % 12'si ortaokul, % 29'u lise, % 15'i lisans ve % 1'i lisansüstü mezundur. Ayrıca % 4'ü de okur-yazar durumunda oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3 Uşak İli ve ilçelerinde sert çekirdekli meyve üreticilerininin eğitim durumları

Katılım sağlayan üreticilerin % 47 si 31 yıldan daha fazla, % 25'i 11-20 yıl, % 22'si 6-10 yıl, % 6'sı ise 1-5 yıldır yetiştiricilik yapmaktadır (Tablo 3, Şekil 4).



**Şekil 4** Ankete katılan üreticilerin Uşak İli ve ilçelere göre çiftçilik süreleri

Arazi büyüklüğü bakımından % 22'si 25 dekar üstünde, % 37'si 10 ile 25 dekar arasında ve % 40'ı 1 ile 10 dekar arasında yetiştiricilik yapmaktadır (Tablo 3).

Üreticilerin tarımsal üretim özelliklerine göre hastalık, zararlı veya yabancı otu gördüğünde ilaçlama yapma durumunun değişimi Tablo 3'de verilmiştir. Araştırmada üreticilerin tarımsal üretim özellikleri ile ilaçlamaya karar verme durumu ile arasında istatistiksel bir fark olup olmadığını belirlemek amacıyla tek örneklem ki-kare testi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda üreticilerin tarımsal üretim özelliklerinden meyve ağaç aralıkları ( $\chi^2(3)=8.979$ ,  $p=0.030$ ), ara tarım yapıp yapmama durumu ( $\chi^2(1)=4.105$ ,  $p=0.043$ ) ve ara tarım ürünü olarak domates yetiştiriciliği yapması durumunun ( $\chi^2(1)=4.762$ ,  $p=0.029$ ) istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur. Buna göre üreticilerin meyve ağaç dikim aralıkları arttığında, ara tarım yapmayanlar ( $n=42$ ) ve eğer ara tarımı domates dışında yapıyorsa ( $n=70$ ) bir hastalığı, zararlıyı veya yabancı otu görür görmez ilaçlama yapmaya daha yatkın olduğu söylenebilir (Tablo 4).

**Tablo 4** Üreticilerin tarımsal üretim özelliklerine göre dağılımı

Değişkenler	Hastalık, zararlı veya yabancı otu gördüğünde ilaçlama yapma				
	Evet	Hayır	Toplam	$\chi^2$	p
Meyve Ağaç Aralıkları (m)					
<b>6*6</b>	15	25	40		
<b>7*7</b>	20	21	41		
<b>8*8</b>	6	2	8	8.979	0.030*

<b>Diğer</b>	9	2	11		
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
<b>Çiftçilerin Sulama Şekli</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Toplam</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>p</b>
<b>Damla sulama</b>	36	32	68	9.307	0.054
<b>Karık sulama</b>	1	7	8		
<b>Salma Sulama</b>	8	6	14		
<b>Kuru Tarım</b>	5	2	7		
<b>Yağmurlama</b>	-	3	3		
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
<b>Ara Tarım</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Toplam</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>p</b>
<b>Evet</b>	24	34	58	4.105	0.043*
<b>Hayır</b>	26	16	42		
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
<b>Ara Tarımda Domates Yetiştiriciliği</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Toplam</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b>p</b>
<b>Evet</b>	29	29	58	4.762	0.029*
<b>Hayır</b>	1	41	42		
<b>Toplam</b>	<b>30</b>	<b>70</b>	<b>100</b>		

\*p<0.05 (istatistiksel olarak önemlidir)

Ankete katılan üreticiler bahçe plantasyonunda 7×7 (% 41), 6×6 aralığı (% 40) ve 8×8 dikim aralığını (% 8) tercih ederken, ve %11'i diğer dikim aralığı şeklinde cevap vermişlerdir. Üreticiler meyve bahçelerinde sulama şekli olarak damlama sulama (% 68), salma sulama (% 14), karık sulama (% 8) ve yağmurlama sulama (%3) yapmakta olup, ancak kuru tarım (% 7) cevabını verenlerde kaydedilmiştir. Ara tarım yapan çiftçiler % 58 (Tablo 4) iken, ara tarımda en fazla sebze çeşitleri (domates, biber ve patlıcan) (% 10) ve haşhaş (% 10) ayrıca nohut (% 5) ve diğer ürünlerin (keten, çörekotu, arpa, yonca, fasulye, mısır, susam, yer fıstığı, kavun, karpuz) üretimini yaptıklarını belirtmişlerdir (Tablo 5). Sert çekirdekli meyve üreticilerinin % 42'si (Tablo 4) ise ara tarım yapmamaktadır.

**Tablo 5** Üreticilerin Ara Tarım Ürünlerine Göre Dağılımı

<b>Ara tarım ürünü</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Domates	30	26.55
Haşhaş	21	18.58
Biber	20	17.70

Patlıcan	15	13.27
Salatalık	5	4.42
Nohut	4	3.88
Buğday	4	3.88
Diğer	14	12.39
Toplam	113*	100.00

\*Birden fazla cevap verilmiştir.

Araştırmada üreticilerin tarımsal ilaç kullanım özellikleri ile hastalık, zararlı veya yabancı ot gördüğünde ilaçlama yapma durumu arasında istatistiksel bir fark olup olmadığını belirlemek amacıyla tek örneklem ki-kare testi yapılmıştır (Tablo 6). Yapılan analiz sonucunda üreticilerin tarımsal ilaç kullanım özelliklerinden sadece ilaçlama zamanı (sabah, öğle ya da akşam) ve hastalık, zararlı veya yabancı otu gördüğünde ilaçlama yapma durumu istatistiksel açıdan önemli bulunduğu ( $\chi^2(1)=6.383$ ,  $p=0.012$ ) gözlenmiştir. İlaçlamayı en fazla sabah saatlerinde (% 52) yapan üreticilerin yanı sıra akşam saatlerinde (% 38) bir kısım ise öğle saatlerinde (% 4) ilaçlama yapmakta olduğu gözlenmiştir. Buna göre düzenli olarak ilaçlama yapan üreticilerin zaman göstermeksizin ilaçlama yapanlara göre ilaçlamaya karar vermede daha bilinçli olduğu görülmüştür (Tablo 6).

**Tablo 6** Üreticilerin tarımsal ilaç kullanım özelliklerine göre dağılımı

Değişkenler	Hastalık, zararlı veya yabancı otu gördüğünde ilaçlama yapma			$\chi^2$	p
	Evet	Hayır	Toplam		
Düzenli Aralıklarla İlaçlama					
<b>Evet</b>	48	43	91	3.053	0.081
<b>Hayır</b>	2	7	9		
Toplam	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
İlaçlama Sayısı					
<b>1</b>	-	3	3	6.476	0.091
<b>2</b>	8	13	21		
<b>3</b>	18	10	28		
<b>4 ve üzeri</b>	24	24	48		
Toplam	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
İlaçlama Zamanı					
<b>Düzenli</b> (sabah, öğle ve akşamüzeri)	50	44	94		

<b>Düzensiz</b> (zaman gözetmeksizin)	-	6	6	6.383	0.012*
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
<b>İlaçlama Kursu Alma</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Toplam</b>	$\chi^2$	<b>p</b>
<b>Evet</b>	4	3	7		
<b>Hayır</b>	46	47	93	0.154	0.695
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
<b>Tarım İlacı Kullanma</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Toplam</b>	$\chi^2$	<b>p</b>
<b>Evet</b>	46	49	95		
<b>Hayır</b>	4	1	5	1.895	0.169
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
<b>Birden Fazla İlaç Karıştırma</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Toplam</b>	$\chi^2$	<b>p</b>
<b>Evet</b>	30	31	61		
<b>Hayır</b>	20	19	29	0.042	0.838
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		
<b>Kullanılan İlaç Etkisi</b>	<b>Evet</b>	<b>Hayır</b>	<b>Toplam</b>	$\chi^2$	<b>p</b>
<b>Evet</b>	37	36	73		
<b>Hayır</b>	13	14	27	0.051	0.822
<b>Toplam</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>100</b>		

\*p<0.05 (istatistiksel olarak önemlidir)

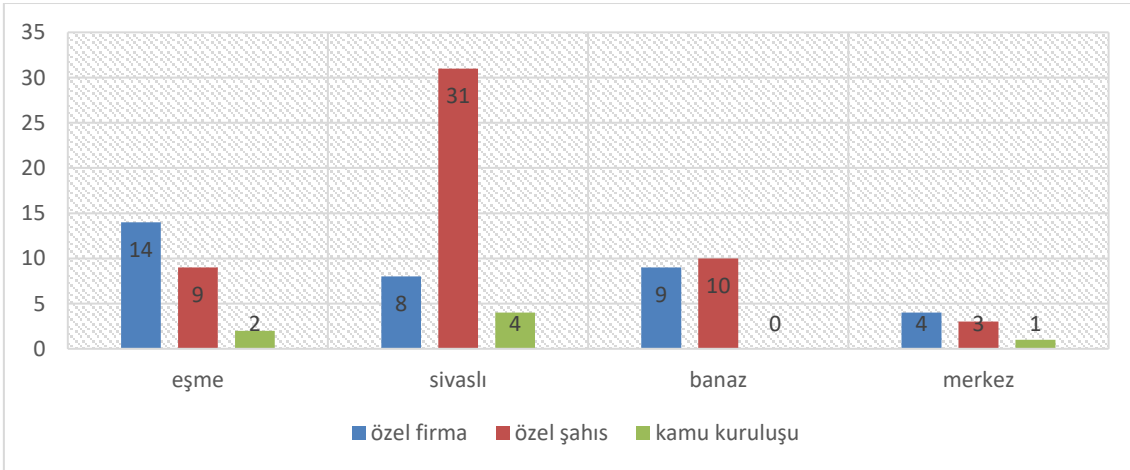
Uşak İl'inde bitki koruma ürünleri ile ilgili kurs alan meyve üreticilerinin sayısı (% 8) oldukça az olup, çoğu üreticinin (% 92) ise hiçbir kurs almadıkları kaydedilmiştir.

Antalya'nın Korkuteli ilçesinde yapılan araştırmaya katılan sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapan üreticilerin çok az kısmı (% 6) seminer veya kurs eğitimi almış, geriye kalan üreticilerin (% 94) ise herhangi bir eğitim almadığı belirtilmiştir [2].

Üreticilerin % 95 meyve bahçesinde hastalık, zararlı veya yabancı ota karşı tarım ilacı kullanmakta, alınan cevaplarda kullanılan ilaçların çoğunluğu sırasıyla insektisit (% 52), fungusit (% 38), herbisit (%7) ve nematisit (%1) oluşturmaktadır. İlaçları zirai ilaç bayilerinden (% 71), ziraat odasından (% 20) ve kooperatiflerden (% 8) temin etmektedirler. Üreticiler etkili olmasına (% 41), ekonomik olmasına (%17), ruhsatlı olması (%12), tanınmış olmasına (% 5) ve karışabilir olmasına (% 3) dikkat ettiklerini belirtmişlerdir. Güneydoğu Anadolu bölgesinde üreticilerin büyük çoğunluğunun (% 46) zirai ilaç kullandığını tespit etmişlerdir. Üreticilerin zirai ilaç seçerken ilacın çok etkili olmasına (% 55); etkili olmasına çevre ve insan sağlığına zararlılık düzeyine (% 26); ucuz, etkili, denenmiş olmasına (% 17); yeni ürün olmasına ve daha önce kullanılmış olmamasına (% 0.1) dikkat ettiklerini belirlemişlerdir [32].

Üreticilerin % 54'ü düzenli olarak ilaçlama yaparken, % 9'u düzenli olarak ilaçlama yapmamakta, ilaçlama yapan tüm üreticiler sezon içerisinde en çok 4 ve 4'den fazla ilaçlama (% 48) yapmaktadır. Geriye kalan üreticilerin % 28'i 3 defa, % 21'i 2 ve % 3'ü de 1 ilaçlama yapmaktadır. Üreticilerin % 62'si zirai ilaçları karıştırmadan kullanmakta, % 38'i karıştırarak uygulama yapmaktadır. Bu üreticilerin ise % 62'si birden fazla hastalık, zararlı veya yabancı otu yok etmek, % 20'si maliyeti düşürmek ve % 18'i de tek bir hastalık, zararlı veya yabancı otu kontrol altına almak amacıyla ilaçları karıştırdıklarını belirtmişlerdir. Kullanılan zirai ilaçların etkili olup olmadığı sorusuna üreticilerin % 73'ü etkili, % 27'si ise etkili olmadığı cevabını vermişlerdir. Üreticilerin çoğunluğu etken maddenin yetersiz kalması (% 47) nedeni ile ilacın etkili olmadığını, bazılarının ise ilaç dozlarının yetersiz kaldığını (%15), ilaçların zamanında kullanılmadığını (% 12) ve hastalıkların etken maddelere karşı bağışıklık kazanmasından (% 9) dolayı etkisiz kaldığını belirtmişlerdir.

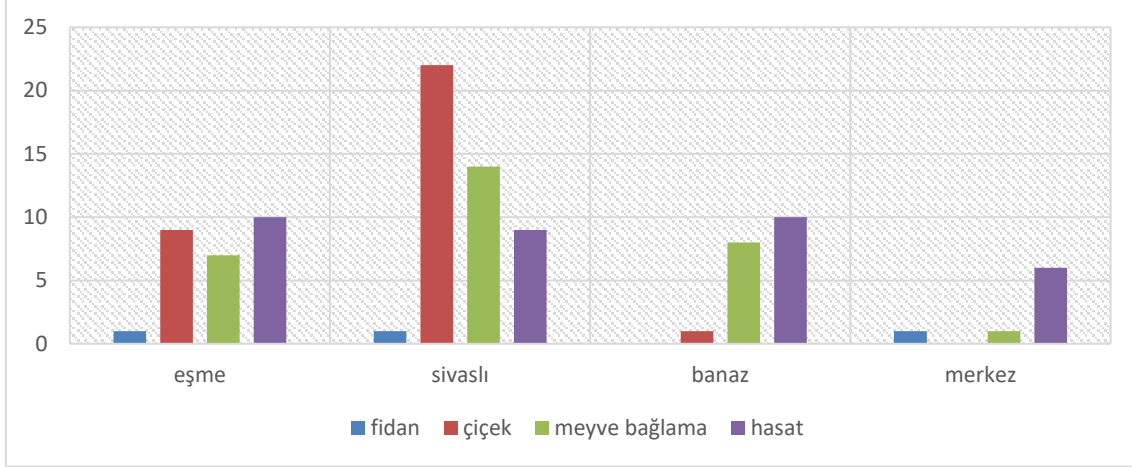
İlimizde üreticiler meyve bahçesi plantasyonlarında fidan temininin % 53'ünü özel şahıslardan, % 35'i özel firmalardan, % 7'si kamu kuruluşlarından karşılamakta ve sadece % 5'i kendi ürettiği fidanları kullanmaktadır (Şekil 5). Ay ve ark (2006) Antalya'nın Korkuteli ilçesinde yaptıkları çalışmada, sert çekirdekli meyve bahçesi kuran üreticilerin fidan temininde % 8'i özel firmaları, % 90'i özel şahısları ve sadece % 2'si kamu kuruluşlarını tercih ettiklerini bildirmişlerdir [2].



**Şekil 5** Ankete katılan üreticilerin Uşak İl ve ilçelere göre fidan teminleri

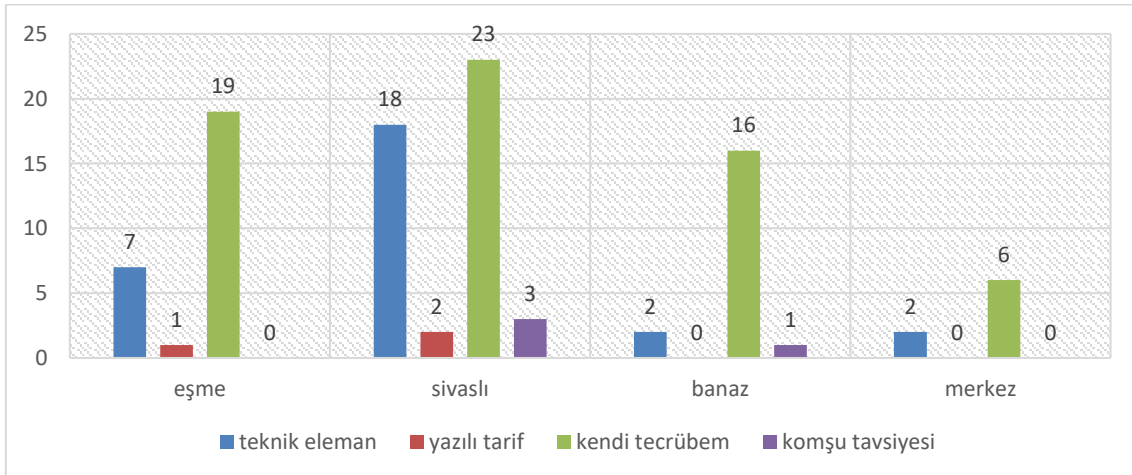
Meyve üreticilerinin hastalık salgınlarının sebebinin iklimsel (yağış ve sıcaklık) değişimlerden (% 47), ilaç yetersizliğinden (% 32) ve yapılan kültürel işlem hatalarından (% 11) kaynaklandığını belirtmişlerdir. Üreticilerin bir kısmı fungal hastalıklarla yoğun

(% 23) olarak karşılaştıklarını, birçoğu da bazen (% 49) ve nadiren (% 28) gördüklerini ifade etmişlerdir. Üreticilerin % 81'i hastalıkları tanıdıklarını ve en fazla monilya hastalığını (% 11) bildiklerini belirtmişlerdir. Hastalıklarla sırasıyla en çok hasat zamanında (% 35), çiçek (% 32), meyve bağlama (% 30) ve fidan döneminde (% 3) karşılaştıklarını ifade etmişlerdir (Şekil 6).



**Şekil 6** Ankete katılan üreticilerin Uşak İli ve ilçelere göre ilaçlamaya karar verme dönemleri

Ankete katılan üreticiler karşılaştıkları hastalıklara karşı en çok çiçek döneminde (% 50), budamadan sonra (% 30) ve hasat döneminde (% 18) ilaçlama yaptıklarını belirtmişlerdir. İlaçlama yapmaya üreticilerin çoğunluğu kendi tecrübeleri (% 64) ile karar vermekte, teknik eleman (% 29), komşu tavsiyesi (% 4) ve yazılı tariflerden de (% 3) destek alarak ilaçlamaya karar vermektedirler (Şekil 7).



**Şekil 7** Ankete katılan üreticilerin Uşak İli ve ilçelere göre ilaçlamaya karar verme durumları

Özkan ve ark. (2002), 83 üretici ile yapılan bir anket çalışmasında, üreticilerin % 68.3'ü tarla ve bahçesinde hastalık ve zararlıyı görür görmez ilaçlama yaptıklarını ve ilaçlama yapmaya kendilerinin karar verdiklerini belirtirken, % 20.2'sinin ilaç bayilerinden, % 9.8'i teknik elemanlardan destek aldıklarını ve % 1.7'sinin ise komşu tavsiyesi olarak diğer üreticilerin önerileri doğrultusunda ilaçlama yaptıklarını belirtmişlerdir [35]. Benzer araştırmacıların yaptığı başka bir çalışmada, 125 üreticinin katıldığı anket çalışmasında üreticilerin % 74.2'sinin bahçede hastalık ve zararlıları gördüğünde, % 11.6'sının tarım il/ilçe müdürlüğü teknik elemanlarının önerilerine göre, % 10.3'ü yakın çevredeki bahçelerde hastalık ve zararlıları kendileri gözlemleyerek, % 4.1'i ise ilaç bayilerinin önerilerine uyarak ilaçlamaya karar verdikleri belirtilmektedir [36]. Çıkman ve Yarba (2007), tarımsal mücadele konusunda bilgilendirme ve faaliyetlere karar verme konusunda % 81'inin zirai mücadele konularında komşulardan ve çevreye bakarak, % 2'sinin ise yakınlarında olan ziraat teşkilatlarına danışarak karar verdiği, ilaçlama zamanını belirlerken ise % 57'sinin hastalık ve zararlılar ortaya çıktığı zaman, % 18'inin komşularına bakarak, % 9'unun ilaçlama takvimine göre belirlediklerini kaydetmişlerdir [37].

İlimizde meyve üreticilerinin çoğunluğunun tarımsal kuruluşlardan bilgi edinmediği (% 51) herhangi bir sorunu olunca (% 28) bilgi aldığı, bazı üreticilerin ise örnek götürüp danışarak (% 10) yararlandığı tespit edilmiştir. GAP Bölgesi'ndeki üreticilerin tarımsal kuruluşlardan yararlanması değerlendirildiğinde her zaman yararlananlar (% 14), çoğu zaman yararlananlar (% 20), bazen yararlananlar (% 32), nadiren yararlananlar (% 31) ve hiçbir zaman (% 3) olarak belirlenmiştir [32].

Çalışmamızda üreticilerin, tarımsal üretimde piyasaya çıkan yeni ilaçları, zirai ilaç bayii (% 68), tarım il müdürlüklerinden (% 20), zirai ilaç firmalarından (% 6), internetten (% 2), seminer ve broşürler (%1)'den bilgi alarak öğrendikleri kaydedilmiştir. Zirai ilaçlama yaparken tedbir alma konusunda ise % 25'i eldiven ve gözlük, % 24'ü maske, %24'ü tülbent veya örtü, % 4 özel elbise kullanırken, %23'ünün ise hiçbir önlem almadığı belirlenmiştir. GAP bölgesi her üç ildeki üreticilerin % 26'sı maske takmakta, % 12'si eldiven, % 7'si tulum (özel iş elbisesi) giymektedir. Hiçbir önlem almadan ilaçlama yapanlar % 29 olarak belirlenmiştir [32].

Kavak (1998), Tokat İl'inde Kazova Ovası'nda meyvecilik işletmelerinde 100 üretici ile yapılan anket çalışmasında ise üreticilerin % 81'inin kimyasal ilaçlama sırasında hiçbir



koruyucu önlem almadığını kaydetmiştir [38]. Karataş ve Alaoğlu (2009) Manisa İli'nde yaptıkları çalışmada; üreticilerin karşılaşılan bitki koruma sorunlarında ilaçlama uygulaması sırasında % 50'sinin eldiven, maske, gözlük gibi koruyucu önlemler aldıklarını saptamışlardır [34].

Üreticilerimiz bahçeyi ilaçlama işleminden sonra kalan ilaçları boş araziye (% 45) püskürttüklerini, bahçenin bir kenarına döktüklerini (% 26), aynı araziye tekrar veya komşu araziye püskürterek (% 24) değerlendirdiklerini, bazıları da kanalizasyona (% 4), sulama kanalına veya akarsuya boşalttığını (% 1) belirtmişlerdir. İlaçlamadan sonra kullanılan ekipmanların temizliğinde su (% 91) ve dezenfektan (% 7) kullandığını belirtirken, % 2'si temizlemediğini belirtmişlerdir. Atık durumuna düşen boş ilaç kutularını yakıp imha (% 62) ettiklerini, çöp kutusuna (% 19), tarlanın bir kenarına (% 13), sulama kanalı veya akarsuya attığını (% 4) belirtirken, % 2'si ise gömdüğünü belirtmişlerdir.

GAP bölgesinde anket çalışmasına katılan üreticilerin büyük bir kısmı (% 55) boş ambalajları toplayıp imha ettiklerini belirtmektedirler. Ayrıca boş ilaç kutularını başka amaç için kullananlar (% 1), boş ambalajları toplayıp dereye atanlar (% 32), toprağa gömerek imha edenler (% 10) ve diğer şekillerde (% 2) imha eden üreticiler kaydetmişlerdir [32]. Başka bir çalışmada Demirkan ve Uysal (2011) Menemen'de pamuk üreticilerinin % 43'ünün boş ilaç kutularını rastgele attıkları, yaktıklarını (% 18), biriktirip çöpe attıklarını (% 15), biriktirdiklerini (% 4) ve sattıklarını (% 2) bildirmişlerdir [39]. Karataş ve Alaoğlu (2009), Manisa'da yapılan çalışmada, üreticilerin % 65'inin boş ilaç ve gübre atıklarını yakıp imha ettiklerini saptamışlardır [34].

Çalışmamızda zirai ilaçlamadan sonra üreticilerin bekleme süresine dikkat etme hususunda büyük çoğunluğunun (% 63) gerekli bekleme süresine uyduğunu ve diğer üreticilerin dikkat etmeyip % 19'u mahsulün olgunlaşmasına göre hasat ettiğini, % 9'u pazar koşullarına göre hasat ettiğini ve geri kalan % 9'u ise bekleme süresine uymadığını belirtmişlerdir. Kullanılan ilaçların çevre kirliliğine yol açması konusunda bilinci olup olmadığını ölçmek amacıyla soru yöneltildiğinde, yetiştiricilerin % 45'i ilaçlı mücadele çevreyi kirletiyor ancak mücadele gerekli olduğunu, % 36'sı ilaçların çevreyi kirlettiği doğru ancak abartılıyor olduğunu belirtirken % 19'u ilaçların çevreyi kirlettiğinin doğru olmadığını belirtmişlerdir.

Ankete katılan üreticilerimiz; kimyasal mücadele sırasında uygulanan ilaçların hedefi dışında kullanılarak çevreyi kirlettiği (% 27), ilaç atıklarının ortalıkta bırakılması ile (% 23), ilaçların gereksiz yerlerde (% 22) ve insanların bilinçsiz kullanımı (% 17) ve gereğinden fazla kullanıldığında (% 11) çevreyi kirlettiğini belirtmişlerdir. Üreticiler kalıntı sorununun önemi hakkında ise; önemli olduğu ancak ilacın yararı daha önemli (%35), bazı üreticiler sorunun çok önemli olduğu ilacın yararından daha da önemli (% 35) olduğu görüşünü vurgulamışlardır. Bazı üreticiler ise, kalıntı sorununa dikkat ettiklerini (%17) ve bazıları da hastalığı ortadan kaldırmanın daha da önemli olduğunu (%13) belirtmişlerdir.

## **Sonuç ve Öneriler**

Çalışmada üreticilerin hastalık, zararlı veya yabancı otu görür görmez ilaçlama yapma durumuna verdikleri cevapların bağımlı değişken olması nedeniyle istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Çalışma sonucunda üreticilerin ikamet ettiği ilçe (özellikle Sivashlı ve Eşme), meyve ağaç aralıkları, ara tarım yapması ya da yapmaması, düzenli zamanlarda (sabah, öğle ya da akşam) ilaçlama yapması durumları ile üreticilerin hastalık, zararlı veya yabancı otu görür görmez ilaçlama yapması arasındaki farklılaşmanın istatistiksel açıdan önemli ( $p < 0.05$ ) olduğu belirlenmiştir.

Uşak ilinin Merkez, Sivashlı, Eşme ve Banaz ilçelerinde sert çekirdekli meyve üretimi yapmakta olan ve bu çiftçilerden tesadüfi olarak seçilerek yapılan anket sonucuna göre;

- Çiftçilerin tamamının okuma yazma bildiği,
- Sert çekirdekli meyve üretimi deneyim sürelerinin ortalama 20-25 yıl olduğu,
- Sert çekirdekli meyve üretim yapılan arazilerin genişliğinin ortalama 12 da olduğu,
- Fidan temininde herhangi bir sıkıntılarının olmadığı çoğunluğun özel şahıslardan temin ettiği,
- İlaçlama yaparken dikkat edilmesi gereken kuralları bilmedikleri,
- Kültürel mücadelede bilgilerinin eksik olduğu,
- Çiftçi kurslarının yetersiz kaldığı,
- Çiftçi sorunlarının giderilmesi için herhangi bir yetkili ile irtibata geçmediği,
- Tarımsal kuruluşlardan yararlanmanın az olduğu,
- Büyük çoğunluğun direk pestisit kullanımını tercih ettiği,
- Bitki koruma ürünleri ile ilgili kurs alan yetiştirici sayısının çok az sayı olduğu,

- Bitki koruma ürünlerinin çevreye verdiği zararın farkında olmadıkları sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde üreticilerin sorulara verdikleri cevaplar doğrultusunda hangi konuda eksik bilgilere sahip oldukları ve yaşadıkları sorunlar ortaya konmuştur. Tüm bunlar dikkate alınarak, gerek ziraat fakültelerinde gerekse tarımsal kuruluşlarda konularında uzman olan kişilerin, kültürel ve kimyasal mücadele hakkında, tarımsal uygulamalar ve bahçelerde görülen hastalık ve zararlılar konusunda sunumlar hazırlayarak üreticilere seminerler verilmesi sonucuna varılmıştır. Ayrıca, kalıntı sorunu ve kimyasal ilaçların yol açtığı olumsuz sonuçlar konusunda çiftçiler daha fazla bilgilendirilmelidir.

#### **Açıklama ve Teşekkür**

Bu çalışma birinci yazarın ikinci yazar danışmanlığında hazırladığı yüksek lisans tezinin bir bölümünden üretilmiştir.

#### **Kaynaklar**

1. Karataş, E. and Ö. Alaoğlu, Manisa İlinde Üreticilerin Bitki Koruma Uygulamaları. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg, 2011. 48(1018 – 8851): p. 183-189.
2. Ay, R., et al., Antalya İli Korkuteli İlçesi Sert Çekirdekli Meyve Üretici Profilinin Bitki Koruma Uygulamaları Yönünden İncelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2006. 10: p. 52-55.
3. Yıldırım, E., Tarımsal Zararlılarla Mücadele Yöntemleri Ve Kullanılan İlaçlar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi. 2000.
4. Kaplan, M. And Ş. Orman, Kumluca Ve Finike Yörelerinde Serada Yetiştirilen Domates Bitkisinin Beslenme Durumunun Belirlenmesi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2004. 17: P. 19-29.
5. Özçağırın, R., et al., Ilıman İklim Meyveleri. Sert Çekirdekli Meyveler Cilt I. 2003.
6. FAO. 2016 14.2.2020; Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
7. TÜİK. Bitkisel üretim istatistikleri veri tabanı. 2019 1.02.2020; Available from: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>
8. Anonim, Yaş meyve ve sebze sektörü Türkiye geneli değerlendirme raporu 2016/2017 Ocak-Aralık Dönemi. Akdeniz İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği, 2018.
9. Anonim, Sert Çekirdekli Meyve Yetiştiriciliği 2. T.C. Millî Eğitim Bakanlığı Tarım Teknolojileri., 2012: p. 101.
10. Çobanoğlu, S. and Z. Düzgüneş, Ankara İlinde Önemli Meyve Ağaçlarında Tespit Edilen Kabuklubitler. Bitki Koruma Bülteni, 1986. 26: p. 135-158.
11. Akbolat, D., et al., Isparta ilindeki elma bahçelerinde mekanik yabancı ot savaş yönteminin kullanılma durumunun belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2006. 10: p. 33 39.
12. Deligöz. İ., K. Değirmenci, and M. Sökmen, Determination of Plum pox virus, the causal agent of Sharka Disease, in Samsun Province. Anadolu Journal of Agricultural Sciences, 2015. 30: p. 227.

13. Yılmaz, M.A., et al., GAP Bölgesinde Pilot Bitki Koruma Kliniklerinin Kurulması in No: 5.4.1, Ç.Ü.Z.F.P. Bileşeni, Editor. 1991: Adana.
14. Akbay, C. and O. Yurdakul, Aşağı Seyhan Ovasında tarımsal savaş ilaçlarının pazarlanması ve tarım ilaçları kullanımının ekonomik analizi. Ç.Ü.Z.F. Dergisi, 1993. 8: p. 15-30.
15. Yücel, A., Ç. E., and M. Yücel, Güneydoğu Anadolu Bölgesi uygulamaya konulmadan önce Harran Ovasında çiftçinin tarımsal mücadeleye bakışı, in GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu. 1995. p. 53-65.
16. Tezcan, H., Türkiye'nin bazı illerindeki zirai mücadele ilaç bayilerinin mevcut durumu ve düşündürdükleri. Tarım ve çevre ilişkileri sempozyumu, ed. D.K.S. Kullanımı. 1996.
17. Üremiş, I., et al., Çukurova Bölgesinde zirai mücadele ilaç kullanımının değerlendirilmesi, I.U.Z.M.İ. Sempozyumu, Editor. 1996.
18. Zeren, O. and H. Kumbur, İçel İlinde tarımsal ilaç pazarlama, kullanım tekniği ve etkinliği üzerinde araştırmalar. Türk-Koop Ekin Dergisi, 1998. 2: p. 62-68.
19. İnan, H. and B. N., Konya çiftçisinin tarım ilacı kullanımının genel olarak değerlendirilmesi. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi 2002. 16: p. 88 - 101.
20. İnan, H., 2001. Konya İlinde Zirai İlaç Bayilerinin Mesleki ve Bilgi Düzeyleri Bakımından Durumu ile Çiftçilerin Zirai Mücadele Uygulamaları Üzerine Bir Araştırma, Selçuk Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma ABD. Yüksek Lisans Tezi, 118 s., Konya.
21. Yiğit, F., Antalya İlinde zirai ilaç bayilerinin genel durumları ve çiftçi ile olan ilişkilerinin araştırılması. Türk-Koop Ekin Dergisi, 2001. 5: p. 90-96.
22. Emeli, M. and R. Ulusoy, Seyhan ve Yüreğir Havzasında Bitki Koruma Yöntemlerinin Uygulamadaki Sorunlar Üzerine Bir Araştırma, in Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma ABD. 2006, Çukurova Üniversitesi
23. Boz, Ö., et al., Aydın ilindeki zirai mücadele uygulamalarının sosyo-ekonomik yönden değerlendirilmesi. Türk. Entomoloji Dergisi, 1998. 22: p. 123-136.
24. Açar, S. and S. Toros, Pestisitlerin bitki bünyesine girişi ve değişimleri. Türk. Entomoloji Dergisi, 1990. 14: p. 119-126.
25. Demircan, V. and A.R. Aktaş, Isparta ili kiraz üretiminde tarımsal ilaç kullanım düzeyi ve üretici eğilimlerinin belirlenmesi. Tarım ekonomisi derneği dergisi, 2004. 9: p. 51-65.
26. Gençsoylu, İ. and H. Başpınar, Büyük Menderes Havzası pamuk ekim alanlarında üreticilerin zararlılara karşı yaptıkları kimyasal mücadele uygulamalarının genel değerlendirilmesi. ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 2004. 1: p. 7-11.
27. Çiçek A and E. O., Tarım ekonomisinde araştırma ve örnekleme yöntemleri. Gazi Osman Paşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 1996. 12.
28. Başaran, Y.K., Sosyal Bilimlerde Örneklem Kuralı. Akademik Sosyal Araştırmalar Dergisi, 2017. 47: 480-495.
29. Keseci, T. and Z. Kocabaş, Biyoistatistik. 1998, Ankara: Ankara Üniversitesi.
30. Büyüköztürk, Ş., et al., Bilimsel Araştırma Yöntemleri. 2015.
31. Güngör, M. and Y. Bulut, Ki-Kare Tesi Üzerine. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, 2008: p. 84 - 89.
32. E., K., GAP Bölgesindeki Bitki Koruma Uygulamalarına Ait Sorunların Belirlenmesi, in Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü. 2014, T.C. Dicle Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi.
33. Tanrıvermiş, H., Orta Sakarya Havzasında Domates Üretiminde Tarımsal İlaç Kullanımının Analizi, in Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü. 2000.
34. Karataş, E. and Ö. Alaoğlu, Manisa İlinde Bitki Koruma Yöntemlerinin Uygulamadaki Sorunlar Üzerine Bir Araştırma, in Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi. 2009.
35. Özkan, B., et al., Antalya İlinde Serada Sebze Üretiminde Pestisit Kullanımının Ekonomik Açından Değerlendirilmesi. Bahçe Dergisi, 2002. 31: p. 9 - 16.
36. Özkan, B., et al., Antalya İlinde Turunçgil Üretiminde Tarımsal İlaç Kullanımına Yönelik Üretici Tutum ve Davranışlar, Anadolu Dergisi, 2003, 13(2); p.103-116, İzmir.

37. Çıkman, E. and M.M. Yarba, Harran Ovası'nda sebze yetiştiriciliğinde karşılaşılan bitki koruma sorunları. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2007. 12.
38. Kavak, Y., Tokat ili Kazova Yöresi meyvecilik işletmelerinde tarımsal ilaç kullanımının ekonomik analizi. Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı (Basılmamış Yüksek Lisans Tezi), Tokat, 1998.
39. Demirkan, H. and F. Uysal, Menemen (İzmir) pamuk üreticilerine yönelik (bitki koruma açısından) bir anket alışması. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2011. 48(3): p. 277-282.

Silas, M., et al., Toxicity and phytochemical analysis of petroleum-ether, ethanolic and aqueous extracts of *Ceratotheca sesamoides*. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(2): p. 148-155. DOI: 10.38001/ijlsb.681349

## Toxicity and phytochemical analysis of petroleum-ether, ethanolic and aqueous extracts of *Ceratotheca sesamoides*

Manasseh Silas<sup>1\*</sup> , Ameh D. A<sup>1</sup> , Chintem D.G. Williams<sup>1,2</sup> , I. Yada Sudi<sup>3</sup> 

### ABSTRACT

This research investigated the toxicity and phytochemical analysis of aqueous, ethanol and petroleum ether extract of *Ceratotheca sesamoides* leaves in albino wistar rats. Qualitative and quantitative phytochemical screening of *Ceratotheca sesamoides* were carried out. The result of the toxicity test revealed that aqueous extracts of *Ceratotheca sesamoides* leaf did not show any fatality with dosage range (300 mg-5000 mg). This shows that the LD<sub>50</sub> is greater than 5000 mg/Kg body weight. The phytochemical investigation shows the presence of glycoside, carbohydrate and alkaloid in all the extract and only flavonoid was found in Aqueous and ethanol extracts. This shows that *C. sesamoides* is safe for consumption and is rich in polyphenols, flavonoids and tannins.

### ARTICLE HISTORY

**Received**

06 December 2019

**Accepted**

29 January 2020

### KEYWORDS

Toxicity, phytochemical, *Ceratotheca sesamoides*, flavonoid, fatality, polyphenols

## Introduction

*Ceratotheca sesamoides* commonly known as false sesame is an annual vegetable crop [1] belonging to the Pedaliaceae family. The Pedaliaceae has 16 genera and 60 species largely in Africa, Indo-Malayan region, and tropical Australia [2]. The plant, *Ceratotheca sesamoides* is described by many hairs on the stem and petiole, with leaf margin; the flowers are pink with dots purple or brown and sub erect growth habit. The *Ceratotheca sesamoides* is normally cultivated in Savannah or semi-arid areas of Africa. The native tribes of the savanna ecological zones of Nigeria relish false sesame known as 'eku' or

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria.

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Taraba State University, Jalingo Nigeria

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, Adamawa State University Mubi, Nigeria.

\*Corresponding author's email: [manassehsilas@yahoo.com](mailto:manassehsilas@yahoo.com)

'bunga' in Yoruba and 'karkashi' in Hausa [3]. The leaves are eaten raw or cooked with starchy morsels prepared from cereals, cassava and yam.

The plant has the following medicinal activities: Anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-hypertensive, cytotoxic, anti-tumour, antiviral [4] parasitic infections, diarrhea and dysentery and insecticidal activities [8]. It is also one of the sources of protein, minerals and vitamins [3], *Ceratotheca sesamoides* has been used to treat childhood diseases such as measles [6], the steeped and the slimy liquid of the leaves are dropped into the eye for the treatment of conjunctivitis [7]. The leaves of *C. sesamoides* used in southern part of Kaduna state to manage infective hepatitis but very little has been done to determine its efficacy. Thus, the study seeks to investigate the Phytochemical content, Total polyphenol and total flavonoid content of the aqueous, ethanolic and petroleum ether leaves extracts of *Ceratotheca sesamoides*.

General uses of *Ceratotheca sesamoides*: The mucilage is occasionally used as an emollient and lubricant [7]. The leaves are eaten as food with solid such as tuwo and fufu.

At present only a few documents are available about the history of this plant and there is lack of effective scientific research about the plant *Ceratotheca sesamoides*. The plant indicates a potential to have antiviral properties [4] and is used in the southern part of Kaduna state to manage hepatitis virus, but has not been scientifically proven. It is easy to cultivate and it thrives well in all manner of soils even with minimal water supply. Present study therefore, is to determine the toxicity and phytochemical analysis of *Ceratotheca sesamoides* leave plant extract in order to ascertain the safety use of the plant while the knowledge of the phytochemicals will give an inside of the type of phyto-metabolite readily available in the plant.

## **Materials and Methods**

### **Plant samples**

*C. sesamoides* fresh leaves was sourced from Kafanchan, Kaduna state and authenticated at the Biological Science Department ABU, Zaria and specimen with voucher number 2859 kept at the Department herbarium unit.

### **Plant extracts preparation**

The plant sample collected was thoroughly cleaned, shade dried and powdered by grinding in mortar and pestle. About 500 grams of the powdered leaves was soaked in 2500 mLs of Aqueous, Ethanol and Pet-ether solution for 24 hours at room temperature and filtered. The extracts was concentrated by drying in a water bath maintained at a temperature of 40°C until a residue was obtained and was kept in a sealed container refrigerated at 2-4°C until when required.

### **Determination of Phytochemical Constituents of the Extract**

Phytochemical analysis of the dried extracts (saponins, tannins, alkaloids, flavonoids, cyanogenic glycosides) was carried as described in the protocol of [10, 11, 12]

### **Quantitative estimation of total phenolic**

Total phenolic contents of different extracts of *C. sesamoides* leaves were determined by the modified Folin-ciocalteu method according to [13]. An aliquot of 0.5 ml of each extract (1mg/mL) was mixed with 2.5 mL of Folin- Ciocalteu reagent (previously diluted with distilled water 1:10 v/v) and 2mL (75% w/v) of sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). The tubes were vortexed for 15sec and allowed to stand for 30min at 40 °C for colour development. Absorbance was then measured at 765nm using spectrophotometer. Total phenolics content of different extracts was expressed as mg/g tannic acid equivalent using the following equation from the calibration curve.

Total phenolic contents of different extracts of *C. sesamoides* leaves were determined by the modified Folin-ciocalteu method according to [14]. About 1ml of extracts and standard solution of gallic acid (2-10mg/L) was added into 25ml volumetric flask containing 9mL of distilled water. About 1 mL of Folin- ciocalteu reagent was added to the mixture and shaken. After 5 minutes, 10mL of 7% sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) solution was added and the solution was diluted to volume with distilled water and mixed. After incubation for 90minutes at room temperature, absorbance against prepared reagent blank (9 distilled water) was measured at wavelength of 750nm. Total pheolic contents were presented as mg Gallic Acid Equivalent (GAE)/g of extract. All samples were analysed in triplicates.

$$\text{Total phenolic content (\% w/w)} = \text{GAE} \times \text{V} \times \text{D} \times 10^{-6} \times 100/\text{W},$$

GAE - Gallic acid equivalent (µg/ml), V - Total volume of sample (ml), D - Dilution factor, W - Sample weight (g).



### **Quantitative estimation of total flavonoids**

Total flavonoid contents of different solvent extracts was determined by the method described by [15]. About 0.5mL of various solvent extracts (1 mg/mL) was mixed with 0.5mL of aluminium chloride prepared in (2% in ethanol). The resultant mixture was incubated for 60min at room temperature for yellow colour development which indicated the presence of flavonoid. Absorbance was measured at 420nm using UV–VIS spectrophotometer(Shemazu 2012v). Total flavonoid content was calculated as quercetin equivalent (mg/g).

$$C = X \times V/N$$

Where: C= Total Flavonoid content (mg/g), V=volume of extract taken in mL, N=weight of plant extract in g, V = 1mL and N = 0.002 g (2mg), X can be calculated from standard curve

### **Toxicological studies**

Acute oral toxicity of the extract was determined by Standard Official Methods of Analysis of the AOAC Guideline 420 *fixed dose procedure* [16]. A sighting study was carried out by administering different concentration of the extract to different rats to determine the minimal and maximum toxic dose. The range of concentration below the minimum toxic dose was the safety dose and was used in the main study. The main toxicity study was carried out starting from the minimum toxic dose to classify the toxicity of the plant.

### **Statistical analysis**

Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) with the aid of SPSS 20v for Windows. Data's obtained were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Difference between the various extracts were compared using DMRT. *P* value less than or equal to 0.05 ( $P \leq 0.05$ ) was considered significant.

### **Result and Discussion**

Toxicity test and Lethal Dose (LD<sub>50</sub>) of *Ceratotheca sesamoides* aqueous leaf extract treatment of healthy albino wister rats with aqueous *extracts of Ceratotheca sesamoides* leaf did not show any fatality starting with 300mg to 5000mg. This shows that the LD<sub>50</sub> is

greater than 5000mg. Other symptoms like change in eye and skin colour, lethargy, respiratory distress and muscles paralysis were not observed. This observation showed *Ceratotheca sesamoides* is non-toxic.

Qualitative phytochemistry of different leaf extract of *Ceratotheca sesamoides* In Table 1 shows the qualitative phytochemistry of aqueous, ethanolic and petroleum ether leaf extracts. Result from the table shows that polyphenols, flavonoids and tannins are presence in aqueous and ethanolic extract, and are absent in petroleum ether extract. For the first time, this study shows the presence of tannins, flavonoids and alkaloids in aqueous leaf extract of *Ceratotheca sesamoides*. The presence of polar phytochemical could account for antioxidant activity.

**Table 1** The qualitative phytochemistry of aqueous, ethanolic and petroleum ether leaf extracts

Extracts	Phytochemicals							
	Carbohyd rates	Steriods	Cardiac glycoside	Saponins	Flavonoid	Tannins	Alkaloids	Anthraq uinones
Aqueous	++	-	+	-	++	+	++	-
Ethanol	+	+	+	+	+	-	+	-
Pet-ether	+	+	+	-	-	-	+	-

+ = positive, ++ = very positive, - = negative

Quantitative phytochemicals of aqueous, ethanolic and petroleum ether leaves leaf extracts of *Ceratotheca sesamoides* in Table 2 shows the result for total polyphenol was found high in Aqueous extract ( $63.828 \pm 0.667$ ) followed by ethanol extract and the least was in Pet-ether extract. Similar trend was also observed in Total flavonoid content as indicated in Total polyphenol. The total phenolic content was (36.45mg/gm) expressed as gallic acid equivalent per gram. While the contents of total flavonoid (66.8 mg/gm) were expressed in terms of rutin equivalent.

Fruits and vegetables in the diet have been demonstrated in epidemiological researches to be protective against some chronic diseases linked with aging such as some type of cancer,

general cardiovascular illness, cataracts, brain and immune dysfunction [17]. The protective effects of these natural products have been assigned to several ingredients such as carotenoids, vitamins C and E, and phenolic compounds and thiol (SH) compounds [18,21]. Several researches have emphasized on the biotic actions of such which are potent antioxidants and free radical scavengers in quite a number of metabolic processes [19,22]. The concern in phenolic compounds derived from plants such as garden plants and their functions in nutrition are generally increasing [23,24]. The phenolic chemicals from plants are also well known to perform a significant function in stabilizing lipids metabolism against peroxidation and inhibiting various types of oxidizing enzymes [20]. The differences in the structure and function relationship of flavonoid structures and their substitutions influence the phenoxyl radical stability, thus affecting the antioxidant properties of the flavonoids [17]. Hence flavonoid part and phenolic compound of aeroponically grown plant were discovered to be comparable to those grown in the soil [25]. The total produce crop was, however, higher in aeroponically grown plant.

**Table 2** Total polyphenol and total flavonoid content of aqueous, ethanolic and petroleum ether leaves extracts of *Ceratotheca sesamoides*

	Petroleum ether extract	Ethanol extract	Aqueous extract
<b>Total polyphenol</b>			
(mgGallic acid Equivalent/g)	2.612±0.25	16.884±0.167	63.828±0.667
<b>Total flavonoid</b>			
(mg Quercetin/g)	0.269±0.002	0.795±0.009	0.878±0.002

Mean ± SD of 3 triplicates

## Conclusion

*Ceratotheca sesamoides* was extracted using aqueous solvent, ethanol solvent and petroleum solvent. Chemical ingredients (qualitative phytochemical analysis, quantitative polyphenols and flavonoids) were determined. Among the three different extracts of *Ceratotheca sesamoides* leaf, aqueous extract and ethanolic extracts contain polar

phytochemicals, but aqueous extract contains higher concentration of polyphenols. Further studies is required to evaluate the possible interactions of *Ceratoteca sesamoides* leaves with therapeutic drugs and or dietary components in order to clarify its possible use as traditional herb. Although studies have shown that the plant is rich in polyphenols and flavonoids, there is need to identify the specific phenolic compound and to test their biological activity.

#### **Acknowledgement**

The authors are grateful to all the Laboratory Technologist at Merry Hallway Laboratory Department of Biochemistry Ahmadu Bello University Zaria for Technical and analytical support and providing research facilities.

#### **Conflict of Interests**

On behalf of all the contributing authors, it is declared that there is no conflict of interests regarding this paper.

#### **References**

- 1 Fasakin, K. Studies on the effect of sowing depth and planting density on vegetative growth and leaf yield of two local cultivars of *ceratoteca sesamoides* Endl. *M.Sc. Project, University of Ilorin*. 1991, p. 128.
- 2 Gbile, Z. O. Indigenous and adapted African vegetables. In 6th African symposium on Hort. Crops, Ibadan, Nigeria. Ed. Omidiji, M.O. *Acta Horticulturae*, 1983. 76, 123.
- 3 Adegoke, E.A. and Nagu, A. Studies of Nigerian medicinal plants. *J West Afr Sci Ass.* 1968. (13): p. 13-39
- 4 Obi, R.K., Iroagba, I.I. and Ojiako. O.A.. Virucidal potential of some edible Nigerian vegetables. *African Journal of Biotechnology*. 2006. **5** (19): 1785-1788.
- 5 Bakare, S.O., Effect of niUogen on yield of *Ceratoteca sesamoides* Endl. *B. Agric. Project, Department of Crop Production, University of Ilorin, Ilorin*, 1987. p 87
- 6 Anon, (2003). Medicinal plants. In: International Trade Forum- *The Quarterly Magazine of the International Trade Centre. Retrieved from www, tradeforum.org.*
- 7 Grubben, G. J. H. and Denton, O. A. Plant Resources of Tropical Africa 2: Vegetables. *PROTA Foundation, Netherlands/Beckluys Publishers, Wageningen*. 2004. 63 - 176.
- 8 Burkill, H.M. 1985. The Useful Plants of West Tropical Africa, *Royal Botanic Gardens*, 4.
- 9 Yakubu, M. T., Opakunle, F. K., Salimon, S.S., Ajiboye, T. O., Bamisaye, F. A and Quadiri, A.L, Antidiarrhoeal activity of aqueous leaf extract of *Ceratoteca sesamoides* in rat. *Journal of Bangladesh Pharmacological society*. 2012. p. 451
- 10 Horbone J.B., (1998). Phytochemical screening methods, a guide to modern techniques of plant analysis, 6<sup>th</sup> edition, Macmillan publisher, London; Page 232-237.
- 11 Trease, G.E and Evans, M.C. Text book of pharmacology, 12<sup>th</sup> ed. Bullieve, Tindall, London; 1989. p 343-383.
- 12 Sofowora, E. A., Phytochemical screening of Nigerian medicinal plants. Part II *Lloydia*, 1993. 41(3), p234-246

- 13 Omoruyi BE, Bradley G, Afolayan AJ. Antioxidant and phytochemical properties of *Carpobrotus edulis* (L.) bolus leaf used for the management of common infections in HIV/AIDS patients in Eastern Cape Province. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012 Dec;12(1):215.
- 14 Chun OK, Kim DO, Lee CY. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003 Dec 31;51(27):8067-72.
- 15 Ordonez AA, Gomez JD, Vattuone MA. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food chemistry*. 2006 Aug 1;97(3):452-8.
- 16 AOAC, *Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Washington DC., 1990. p1 - 50.*
- 17 Vinson, J. A. Jang, J. Dabbagh Y. A. Serry, M. M., and S. Cai, "Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, vol. 43, no. 11, pp. 2798–2799.
- 18 Paganga G., Miller N., and Rice-Evans C. A., "The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?" *Free Radical Research*, 1999, vol. 30, no. 2, pp. 153–162,
- 19 Kähkönen, M. P. Hopia, A. I., Vuorela H. J. et al., "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, vol. 47, no. 10, pp. 3954–3962.
- 20 Sugihara, N. Arakawa, T. Ohnishi, M. and K. Furuno, "Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with  $\alpha$ -linolenic acid," *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol. 27, no. 11-12, pp. 1313–1323.
- 21 Hasan Murat Aksoy, Yilmaz Kaya, Murat Ozturk, Zafer Secgin *Pseudomonas putida* - Induced Response in Phenolic Profile of Tomato Seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) Infected by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Biological Control*, 11 / 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.11.001>
- 22 Samsulrizal, N.H., et al., A Review of Approaches in Steviol Glycosides Synthesis *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2019. 2(3): p. 145-157. <https://doi.org/10.38001/ijlsb.577338>
- 23 Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *The American journal of clinical nutrition*. 2003 Sep 1;78(3):559S-69S.
- 24 Riccioni G, Mancini B, Di Ilio E, Bucciarelli T, D Orazio N. Protective effect of lycopene in cardiovascular disease. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2008 May 1;12(3):183.
- 25 Chandra S, Khan S, Avula B, Lata H, Yang MH, ElSohly MA, Khan IA. Comparison of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content and yield of different crops grown in soil and aeroponic system. *Planta Medica*. 2014 Jul;80(10):PD134.

Hasan, H. and F.A. Manan, Total Phenolic and Flavonoid Content of *Elaeis guineensis* Leaves Treated with Different Amount of Nitrogen-Potassium Fertilizer. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(2): p. 156-163. DOI: 10.38001/ijlsb.699527

## Total Phenolic and Flavonoid Content of *Elaeis guineensis* Leaves Treated with Different Amount of Nitrogen-Potassium Fertilizer

Hazrina Hasan<sup>1</sup> , Fazilah Abd Manan<sup>1\*</sup> 

### ABSTRACT

The amount of fertilizer used as source of nutrients play an important role for successful growth of oil palm. In this study, the effect of different amount of nitrogen (N) and potassium (K) fertilizer on the biochemical properties of oil palm were studied. Oil palm trees were supplied with fertilizer consist of constant amount of Bayovar rock phosphate (BRP), Kieserite (KS), and Foliar Boron as well as different levels of muriate of potash (MOP) and ammonium sulphate (AS). The treatments were labeled as T1, T2 and T3. Six planting materials indicated as A, B, C, D, E and F were tested. The total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) in the leaves of the oil palm trees were analyzed using Folin-Ciocalteu method and Aluminium chloride method, respectively. From the results, the leaves of planting material A and F showed significant responses towards different levels of fertilizer where the TPC and TFC contents reduced at the highest fertilizer level. Planting material C and D responded quite similarly in terms of TPC content with planting material A and F, respectively. Overall, different planting materials showed different pattern of responses specifically for TPC and TFC towards fertilizer level.

### ARTICLE HISTORY

**Received**

06 March 2020

**Accepted**

16 May 2020

### KEYWORDS:

Phenolic,  
flavonoid,  
*Elaeis guineensis*,  
fertilizer

## Introduction

Oil palm (*Elaeis guineensis*) is an important perennial crop in many countries such as Malaysia, Indonesia, some African and Columbia. The oil palm belongs to the species *Elaeis guineensis* and family Arecaceae. In 2016, the crude palm oil generated was 17.32 million tonnes, covering 5.74 million hectares land [1]. Suitable fertilizer application for oil palm trees is important due to the nature of plants being vulnerable to nutrient deficiencies. Unfortunately, most oil palm plantations have low soil fertility which is needed for oil palms to produce optimum fresh fruit bunch yield. Therefore, balancing fertilizers is necessary to maintain high yield and good nutritional status of oil palm and prevent over-fertilization that possibly brings negative impact to the environments.

<sup>1</sup> Department of Biosciences, Faculty of Science, Universiti Teknologi Malaysia, 81310 Skudai, Johor, Malaysia.

\*Corresponding Autor: Fazilah Abd Manan, e-mail: [m-fazilah@utm.my](mailto:m-fazilah@utm.my)

Nitrogen is one of the most important nutrient elements for plant growth and physiological health which make up chlorophyll, protoplasm, amino acids and proteins [2]. On the other hand, potassium is necessary for sustaining osmotic balance, photosynthesis, transports of phloem and fruit quality [3]. Generally, macro and micro nutrients are vital in various functions in plant cells including providing resistance to diseases [4]. Among the oil palm by-products are empty fruit bunches, palm pressed fibre, oil palm fronds, palm kernel cake, palm oil mill effluent and oil palm trunk [5]. Oil palm fronds can be used as ingredients for livestock feeding, an alternative way for by-product disposal [6]. Several studies have reported that oil palm leaf extracts are rich in antioxidant activity from carotenoid, tocopherol, and phenolic compounds [7, 8, 9]. Phenolic compounds are ubiquitous in plants. This compound act as antioxidants and involves in plant defense system [10]. Flavonoids and phenolic acids are the two major classes of phenolic compounds. Phenolic compounds such as flavonoid being the main constituent that can be found in oil palm leaves alcoholic extract [11]. Flavonoid act as antioxidant to protect plants from various biotic and abiotic stresses [12, 13] and served as plant-derived foods and beverages. Depending on the progenies, oil palms may respond differently to nutrient inputs. Therefore, this study aimed to determine the total phenolic and flavonoid content in the leaves of oil palm from different planting materials when treated with different levels of NK fertilizer.

## **Materials and Methods**

### **Plant samples**

*Elaeis guineensis* leaves from frond-17 were harvested from four-year old oil palm trees planted in Johor, Malaysia. The leaves were taken from oil palm of different planting materials indicated as A, B, C, D, E, and F, treated with different levels of NK fertilizer (T1, T2, and T3). T1 (control) consist of 2 kg Bayovar rock phosphate (BRP), 1.25 kg Kieserite (KS) and 0.125 kg Foliar Boron. T2 consist of 2.7 kg ammonium sulphate (AS), 1.75 kg muriate of potash (MOP) + control and T3 consist of 5.4 kg AS, 3.5 kg MOP + control. After collection, samples were transported directly to the laboratory and kept in the freezer at -80°C before further analysis. Leaves were washed and dried overnight in the oven at 65°C for extraction process. The leaves were crushed into powder using mortar and pestle and extracted with distilled water at a 1:10 (dry weight: volume) ratio

for 1 hour at 90°C. The mixture was centrifuged at 9000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant obtained was used for determination of total phenolic and flavonoid content.

#### **Analysis of total phenolic content (TPC)**

The total phenolic content was analyzed following Folin-Ciocalteu method [14]. Standard curve of gallic acid solution at the concentration of 0, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 µg/mL were prepared. 0.2 mL of the supernatant was mixed with 0.8 mL of distilled water. 0.1 mL of Folin-Ciocalteu reagent was added and left for 3 minutes at room temperature. Then, 0.8 mL of 20% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added into the mixture and incubated 2 hours in the dark. The absorbance was measured using UV-Vis spectrophotometer at 765 nm. The absorbance, y obtained after analysis for each *Elaeis guineensis* leaf sample was used in the equation  $y=0.0121x - 0.048$  obtained from the standard curve. Then, the value obtained, x was substituted in C1 in the equation  $C=C1 \times V/m$  where,

C= Total phenolic content in GAE in µg/g

C1= Concentration of gallic acid established from standard curve in µg/ml

V= Volume of extract in ml

m= Weight of plant extract in g

#### **Analysis of total flavonoid content (TFC)**

The total flavonoid content was assessed by aluminium chloride colorimetric method [15]. Standard curve of quercetin solution (in 80% (v/v) ethanol) at the concentration of 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 and 160 µg/mL were prepared. 0.2 mL of the extract supernatant was mixed with 0.15 mL of 5% NaNO<sub>2</sub> and incubated in the dark for 6 minutes at room temperature. Then, 0.15 mL of 10% (w/v) AlCl<sub>3</sub> was added to the mixture and kept in dark for 6 min at room temperature. After that, 0.8 mL of 10% (w/v) NaOH was added into the mixture and incubated in dark for 15 min at room temperature. The absorbance was measured using UV-Vis spectrophotometer at 510 nm. The absorbance, y obtained after analysis for each *Elaeis guineensis* leaf sample was used in the equation  $y=0.0046x - 0.0187$  obtained from the standard curve. Then, the value obtained, x was substituted in C1 in the equation  $C=C1 \times V/m$  where,

#### **Statistical analysis**

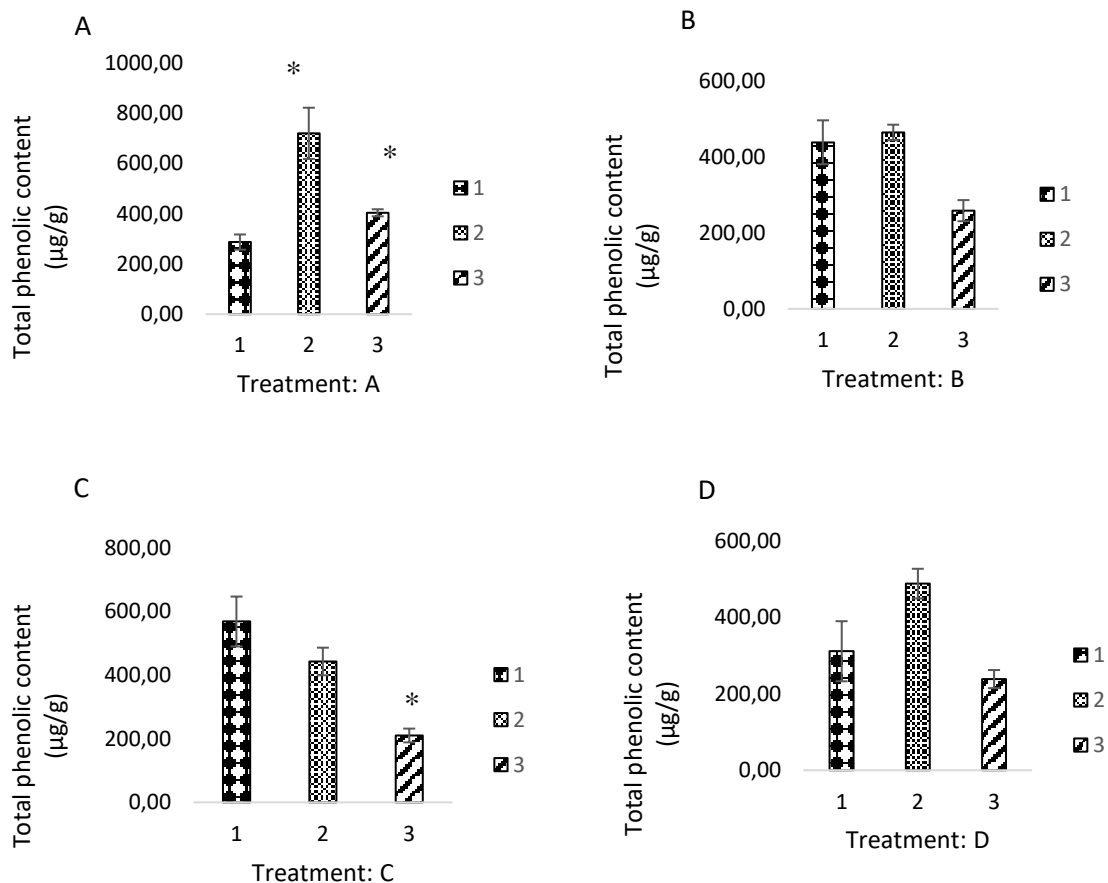
All experiments were conducted in triplicates. Data reported are mean ± standard error. Microsoft Excel 2013 was used for statistical analysis.

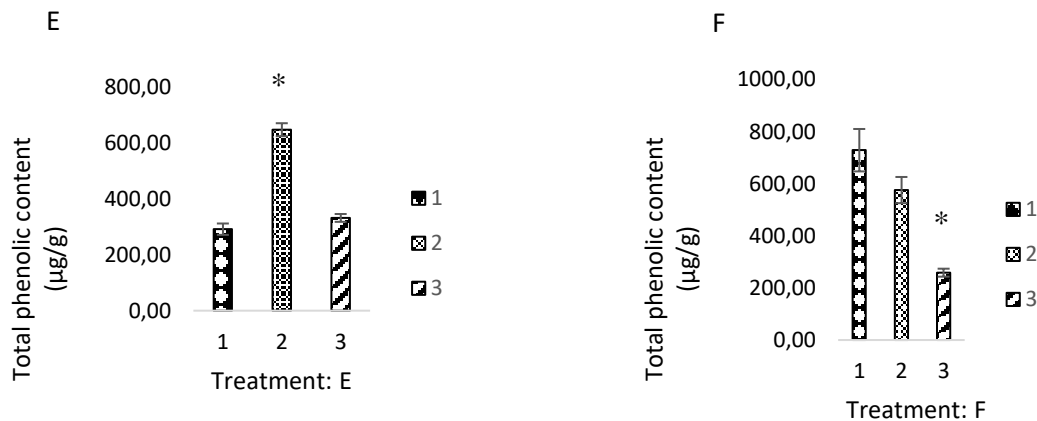


## Results and Discussions

### Total phenolic content in oil palm leaves

Fig 1 shows the total phenolic content (TPC) in oil palm leaves of planting material A-F. For planting material A, results showed that the highest TPC was obtained in the oil palm leaves at T2 fertilizer level, while the lowest TPC was recorded in the leaves of oil palm at T1 fertilizer level. Data analysis showed significant differences of TPC content in T2 and T3 when compared to T1. In planting material B, no significant differences between treatments were recorded. For planting material C, T3 treatment had significantly reduced the production of phenolic compounds. This reduction was also observed at T2. The trend was similar for planting material F. For planting material E, T2 significantly increased the production of TPC, although the TPC level slightly dropped for T3. For some plants, nitrogen deficiency will enhance the accumulation of phenolic compound in plant tissues [16]. However, in this study, this pattern was observed only for planting material C and F. Total phenolic content in plants may be influenced by different nitrogen source of the fertilizer, besides other environmental factors during plant growth and developmental stages.

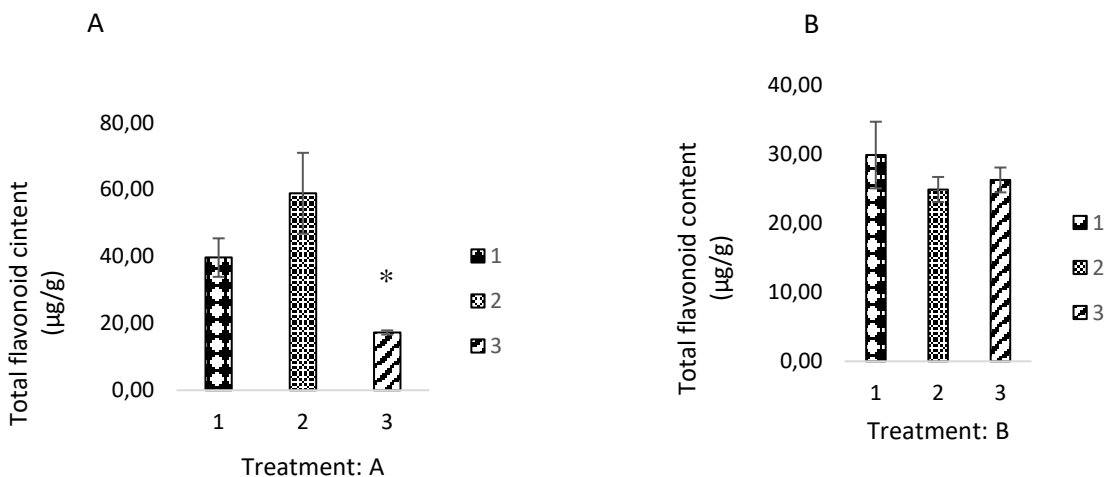


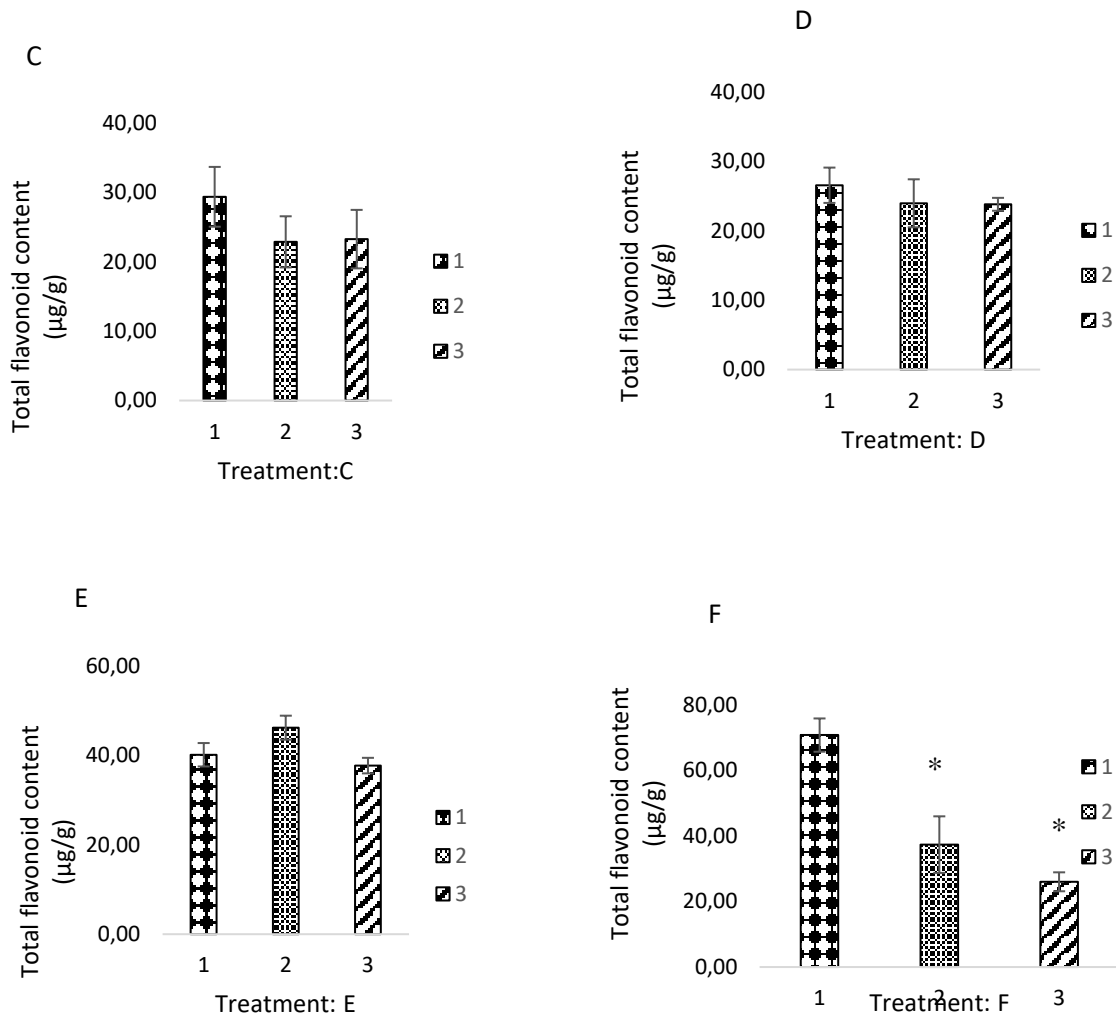


**Fig 1** Total phenolic content in the leaves of oil palm. (A-F): Planting material A-F treated with different amount of fertilizer. Data are mean  $\pm$  standard error, n=3. (\* indicates significant difference in total phenolic content compared to control using t-test;  $p < 0.05$ )

### Total flavonoid contents of oil palm leaves

Fig 2 shows the total flavonoid content (TFC) of oil palm leaves from planting material A-F. The results showed that the highest TFC was obtained in the leaves of oil palm at T2 fertilizer level, and the lowest TFC was recorded for oil palm leaves treated at T3 fertilizer level in planting material A. TFC of T3 treated leaves differ significantly compared to T1. Another planting material that showed significant responses towards different levels of fertilizer was planting material F. The lowest TFC was recorded at T3 while the highest TFC was found in the leaves of plants supplied with fertilizer at T1. It can be concluded that the fertilizer at T2 and T3 had assisted the progeny to produce less flavonoid compound.





**Fig 2** Total flavonoid content in the leaves of oil palm. (A-F): Planting material A-F treated with different amount of fertilizer. Data are mean  $\pm$  standard error, n=3. (\* indicates significant difference in total flavonoid content compared to control using t-test;  $p < 0.05$ )

In this study, different amount of NK fertilizer supplied to oil palm trees had shown different responses in terms of total phenolic and flavonoid content of oil palm leaves, depending on the planting materials. Although nitrogen is an essential element for amino acids and construction of proteins, excessive amount of this nutrient in plant tissue can cause mineral toxicity and reduce physiological and phenological responses to the plant [17]. Similar to total phenolic content, several studies also reported that total flavonoid content decreased with excessive nitrogen uptake [18, 19, 20]. Lower flavonoid content

in plants that received high amount of nitrogen was observed previously in species such as apple trees and *Sesamum indicum* L. seeds [21, 22]. This trend was present although not significantly observed in some planting materials with some non-synchronize trend at T2.

## Conclusion

Different planting materials showed various responses in the total phenolic and flavonoid content when applied with different fertilizer treatments. For total phenolic content, planting material F showed the highest TPC at T1. Even T1 contained only basic amount of fertilizer, this treatment has led to high amount of phenolic content compared to T2 and T3. Similarly, T3 showed the lowest total phenolic content for planting material C. For total flavonoid content, T1 showed the highest total flavonoid content for planting material F, a similar trend to its total phenolic content. Nonetheless, different trends of responses were recorded among the tested planting materials, hence total phenolic and flavonoid content in the leaves of different progenies vary greatly with NK fertilizer level.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Universiti Teknologi Malaysia for the support from Geran Universiti Penyelidikan (GUP Tier 1); Vote Number: Q.J130000.2545.13H92. We also thank Advance Agricultural Research (AAR) Sdn.Bhd for providing samples and advice related to the project.

## Funding

This study is funded by Geran Universiti Penyelidikan (GUP Tier 1), Universiti Teknologi Malaysia (UTM): grant number: Q.J130000.2545.13H92.




## References

1. Ahmad Kushairi, D, Malaysian Oil Palm Industry Performance 2016 and Prospects for 2017. Palm Oil Economic Review and Outlook Seminar 2017. [http://www.mpob.gov.my/images/stories/pdf/2017/2017\\_Dr.KushairiPALMEROS2017.pdf](http://www.mpob.gov.my/images/stories/pdf/2017/2017_Dr.KushairiPALMEROS2017.pdf). Retrieved on 31st October 2019.
2. Abass Almodares, R. T., C. Min, and F. Majid, The effect of nitrogen and potassium fertilizers on growth parameters and carbohydrate contents of sweet sorghum cultivars. *Journal of Environmental Biology*, 2008. 29(6): 849-852.
3. Tripler, C. E., S.S. Kaushal, G.E. Likens, and M. Todd Walter, Patterns in potassium dynamics in forest ecosystems. *Ecology Letters*, 2006. 9(4): 451-466.
4. Fageria, N. K., V.C. Baligar, and C.A. Jones, *Growth and mineral nutrition of field crops*. CRC Press, 2010.
5. Abdullah, N., and F. Sulaiman, The oil palm wastes in Malaysia. In *Biomass now-sustainable growth and use*. IntechOpen, 2013.

6. Mohamed, W. Z. and M. Mohd Farid, Oil-palm by-products as feeds for livestock in Malaysia, In: International Palm Oil Congress (PIPOC 2011), 15 -17 Nov 2011, KLCC, Kuala Lumpur, Malaysia.
7. Han, N., and C. May, Determination of antioxidants in oil palm leaves (*Elaeis guineensis*). American Journal of Applied Sciences, 2010.7(9): 1243-1247.
8. Soundararajan, V. and S. Sreenivasan, Antioxidant activity of *Elaeis guineensis* leaf extract: An alternative nutraceutical approach in impeding aging. APCBEE Procedia, 2012. 2: 153-159.
9. Vijayarathna Soundararajan, S. S., Antioxidant activity of *Elaeis guineensis* leaf extract: An alternative nutraceutical approach in impeding aging. APCBEE Procedia, 2012.2: 153-159.
10. Lattanzio, V., Phenolic compounds: Introduction, In book: K.G. Ramawat and J.M. Me'rillon. Natural products, Chapter 50. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2013. p.1543-1580.
11. Yin, N. G.S., S. Abdullah, and C.K. Phin, Phytochemical constituents from leaves of *Elaeis guineensis* and their antioxidant and antimicrobial activities. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science, 2013. 5(Suppl 4), 137-140.
12. Alothman M., R. Bhat, and A.A. Karim, Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. Food Chemistry, 2009.115(3): 785-788.
13. Enujiugha, V. N., J.Y. Talabi, S.A. Malomo, and A.I. Olagunju, DPPH radical scavenging capacity of phenolic extracts from African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*). Food and Nutrition Sciences, 2012. 3(1): 7-13.
14. Waterhouse, A.L., Determination of total phenolics. In ERE Wrolstad (ed), Current Protocols in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001. pp. I1.1.1-I1.1.8.
15. Zou, Y., Y. Lu, D. Wei, Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2004. 52: 5032-5039.
16. Argyropoulou, K., Salahas, G., Hela, D., and Papasavvas, A, Impact of nitrogen deficiency on biomass production, morphological and biochemical characteristics of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants, cultivated aeroponically. Agriculture and Food, 2015. 3: 32-42.
17. Sheikh, S., and Ishak, C. F., Effect of nitrogen fertilization on antioxidant activity of Mas cotek (*Ficus deltoidea* Jack). Journal of Medicinal Plants Studies, 2016. 4(4): 208-214.
18. Knobloch, K. H., Bast, G., and Berlin, J., Medium-and light-induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Phytochemistry, 1982. 21(3): 591-594.
19. Smoleń, S., and Sady, W., The effect of various nitrogen fertilization and foliar nutrition regimes on the concentrations of sugars, carotenoids and phenolic compounds in carrot (*Daucus carota* L.). Scientia Horticulturae, 2009. 120(3): 315-324.
20. Stewart, A. J., Chapman, W., Jenkins, G. I., Graham, I., Martin, T., and Crozier, A., The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. Plant, Cell and Environment, 2001. 24(11): 1189-1197.
21. Leser, C. and D. Treutter, Effect of nitrogen supply on growth content of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. Physiologia Plantarum, 2005. 123: 49-56.
22. Elhanafi, L., M. Houhou, C. Rais, I. Mansouri, L. Elghadraoui, and H. Greche, Impact of excessive nitrogen fertilization on the biochemical quality, phenolic compounds, and antioxidant power of *Sesamum indicum* L seeds. Journal of Food Quality, 2019. Article ID 9428092, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2019/9428092>.

Samsulrizal NH, Hazuki MD, Azmi NSA, Said ZSAM, Wahab NA, Ramli Z. 2020. Orthologous Revelation between *Elaeis guineensis*, *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. International Journal of Life Sciences and Biotechnology. 3(2):164- 179. DOI: 10.38001/ijlsb.717846

## Orthologous Revelation between *Elaeis guineensis*, *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*

Nurul Hidayah Samsulrizal<sup>1,2\*</sup> , Muhammad Danial Hazuki<sup>1,2</sup> , Nur Sabrina Ahmad Azmi<sup>1,2</sup> , Zatty Syamimi Adura Mat Said<sup>3</sup> , Nurniwalis Abdul Wahab<sup>3</sup>  and Zubaidah Ramli<sup>3</sup> 

### ABSTRACT

Oil palm is an important commodity crop in Malaysia as major contributor to agriculture sector. Thus, the need for better yield production is urgent to accommodate rising local and global demand while reducing the land expansion for oil palm plantation. This can be achieved by identifying the agronomical important traits in oil palm using comparative genomic approach. In this study, gene related to plant height, fruit development and fruit ripening in oil palm were predicted by comparing *Elaeis guineensis* genome sequence with *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum* genome sequence. The model plant chosen are based on its special attribute such as completely sequenced and fleshy fruit model. The analysis begun with orthology analysis using InParanoid, and SonicParanoid. There are 9,624 orthologous genes identified common among species selected. The reformatted orthologous genes were then annotated with Gene Ontology (GO) using Blast2GO program. The process of annotation includes blast with local database (DIAMOND), mapping, annotation and project statistical analysis. 100% of the orthologous gene has sequence of significant similarity but only 61.79% of the sequence has GO assignment. By using the annotated orthologous genes generated, only small amount of gene associated with trait of interest was predicted i.e. gibberellins (GAs) 10 genes, brassinosteroids (BRs) 14 genes, auxin (9 genes), fruit development (8 genes) and fruit ripening (4 genes). These agronomical important genes could be utilized in genetic engineering and molecular breeding to improve the production of palm oils.

### ARTICLE HISTORY

Received

11 April 2020

Accepted

29 June 2020

### KEYWORDS

SonicParanoid, comparative genomic, ortholog,

## Introduction

Palm oil is the major contributor to the production of world's oil and fat; and plays a significant role in accommodating the rising demand for global edible oils. About 23% of

<sup>1</sup> Department of Plant Science, Kulliyah of Science, International Islamic University Malaysia.

<sup>2</sup> Research Unit for Bioinformatics and Computational Biology (RUBIC), Kulliyah of Science, International Islamic University Malaysia, Kuantan, Pahang, Malaysia.

<sup>3</sup> Advanced Biotechnology and Breeding Centre (ABBC), Malaysian Palm Oil Board, 6 Persiaran Institusi, Bandar Baru Bangi, Kajang, Selangor, Malaysia.

\*correspondence address: [hidayahsamsulrizal@iium.edu.my](mailto:hidayahsamsulrizal@iium.edu.my)

world fat and oil are contributed by palm oil production in which 85% of world palm oil productions are from Malaysia and Indonesia. The demand for palm oil increases constantly at the rate of 4% every year [1], thus the need for oil palm that has superior agronomic traits are more urgent than ever to accommodate high palm oil demands while keeping land exploration and expansion for agriculture purpose at minimum. This objective can be achieved in various ways such as breeding program and genetic modifications.

In 2013, oil palm genome has been completely sequenced and published by Singh and his team. It was estimated that the genome size of oil palm is 1800 Mbp with 34,800 numbers of genes has been predicted using a total of 1.535 Gb of assembled sequence and transcriptome data from 30 tissues types [3]. The genome information could be viewed via MyPalmViewer Genome Browser <http://gbrowse.mpob.gov.my>. From here, more research has been made to increase tolerance to biotic and abiotic stress with final goals is to increase the quantity and quality of the yield produce, achieve sustainable agriculture and reduce its carbon footprint [4, 5]

Comparative genomics is a way to predict genes function by comparing genes sequence from two or more species. Furthermore, comparative genomics study also involves an examination of gene loss, duplication, and horizontal gene transfer in evolutionary changes among organisms [21]. By identifying and manipulating the agronomically important genes, we can boost the quality and quantity of the yield produce from oil palm [2]. In this research, we aim to infer orthologous relationship between oil palm (*E. guineensis*) with two dicot plants, which are model plants *A. thaliana* and tomato (*S. lycopersicum*) and to identify and characterize the agronomically related genes of interest especially in height, fruit development and fruit ripening.

## **Materials and Methods**

### **Obtaining genomes sequences and bioinformatics tools**

Genome sequence of *A. thaliana*, *E. guineensis* and *S. lycopersicum* are downloaded from their respective database which are The Arabidopsis Information Resource (TAIR), Genomsawit and Solanaceae Genomics Network. Blast package and its utility command are acquired from National Center for Biotechnology Information (NCBI). Stand-alone

InParanoid 4.1 and its extension MultiParanoid are acquired from Sonnhammer Bioinformatics Group website. SonicParanoid installation is done with Ubuntu terminal with manual instruction acquired from IWASAKI Lab/SonicParanoid page. Blast2GO software (OmicsBox) was locally installed on Windows and subscribed with all the functional annotation and analysis features. Genome sequence files which usually in compressed gz and tar.gz format are uncompressed using gunzip command in Linux.

### **Orthology analysis**

Orthology analyses in this study consist of combination of reciprocal BLAST and ortholog group clustering InParanoid, and multi-species ortholog analysis (SonicParanoid).

#### ***Ortholog group clustering using inparanoid***

The genome protein sequence for comparison (Arabidopsis, tomato and oil palm) which is in uncompressed fasta format was assembled in this directory. The output format of the analysis includes Human-readable text (Output.arab.fa-tomato.fa). Other than that, an HTML file serving as a slightly stylized representation of the previous (orthologs.arab.fa-tomato.fa.html) was generated. Furthermore, a tab-separated list listing each orthologous group on its own line (sqltable.arab.fa-tomato.fa) and a tab-separated list listing a given orthologous group across multiple lines (table.arab.fa-tomato.fa) can also be found. Summary of the analysis were viewed at file 'Human-readable text'.

#### ***Multi-species ortholog analysis using sonicparanoid***

SonicParanoid program on the other hand, perform pairwise and multi-species ortholog analysis in one process. The genomes sequence was not formatted manually since SonicParanoid does not use blast search, but the file must be in fasta format. After the genome has been assembled, the virtual environment was created and activated. The Ubuntu terminal grep function are used to calculate the number of ortholog groups between species and extracted for annotation with Blast2GO. This output file contains number of total gene sequences, homolog sequences, in-paralogs in each species and groups of orthologs.

### **Extracting protein sequence from genome database to orthologous gene IDs**

The list of orthologous gene IDs from SonicParanoid contain both the pairwise and orthologous of three species. Only the orthologous gene IDs between three species are



selected for annotation. The gene sequence of the selected orthologous gene IDs are then extracted from the *Arabidopsis* genome sequence to the newly created list using `blastdb` command in Linux. The *Arabidopsis* genome database must first be formatted for blast usage.

#### **Blast search of orthologous *A. thaliana* protein sequence with NCBI database.**

Three tools for Blast search used in this study includes Blast2GO high performance cloud server BLAST search, stand-alone NCBI-BLAST+ with local database and DIAMOND high performance analysis with local database. The local databases are acquired from NCBI ftp site from Non-redundant (nr) protein database and its md5 files. The md5 files are checksums to make sure the file is downloaded properly. The same files are used for Blast2GO BLAST search except the files are used directly from its private fast cloud server. For Blast2GO, the option for blast search and the parameters required can be chosen directly from the OMICSBOX software. Parameters which include number of hits, E-value, input types, output format and others are assign uniform among all blast tools.

#### **Gene ontology annotation using BLAST2GO**

The manually blast orthologous genes are loaded to the software for genes classification with GO terms by Gene Ontology mapping under functional analysis. Gene ontology annotation was then initiated with default set of annotation configuration. Successful annotation for each query sequence will result in table colour change for the respective sequence from light-green to blue at the Main Sequence Table, and only the annotated GOs will remain in the GO IDs column. The results are visualized and summarized using GO graph and charts.

#### **Data mining for candidate genes**

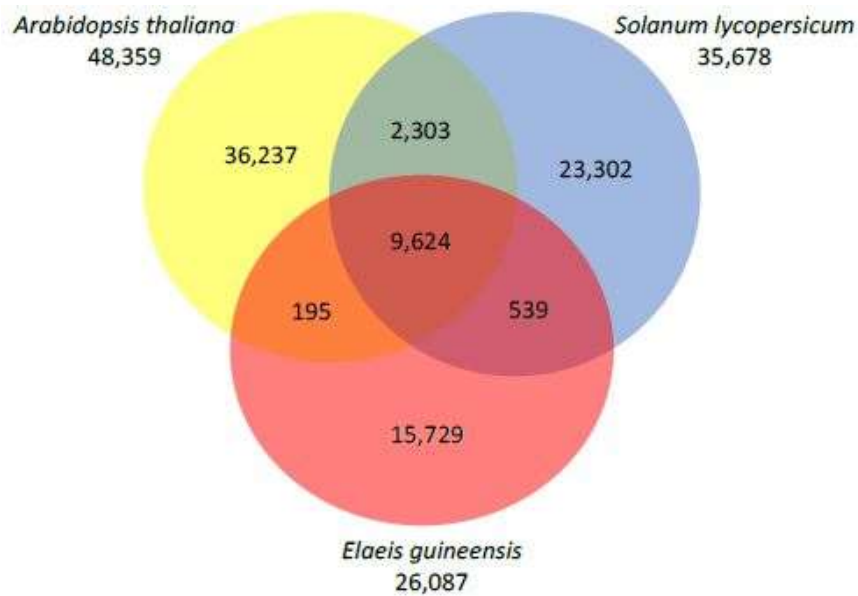
The GO IDs for plant height, fruit development and fruit ripening are identified by generating a GO graph using GO description search in Blast2GO. The GO IDs for plant height selected are GO:0009740 for gibberellic acid mediated signalling, GO:0009742 for brassinosteroid mediated signalling and GO:0009851 for auxin biosynthetic process. While, the GO IDs selected for fruit development and fruit ripening are GO:0010154 and GO:0009835. Annotated sequences assigned with these specific GO IDs were extracted, listed and discussed.

## Result and Discussion

Comparative analysis was undertaken to detect orthologous relationships by using InParanoid program that applies *all-versus-all* sequence comparisons between two genomes, followed by merging these data using Sonicparanoid. Orthologous measurements can be divided into two categories; (1) cluster pairs of gene with the same biological function and (2) phylogenetic trees to identify functional divergence occurrence. The InParanoid program was used as an alternative to the phylogenetic method. In order to obtain the results, three well establish genomes have been selected i.e. *E. guineensis*, *A. thaliana* and *S. lycopersicum*. The results from the analysis were sorted and viewed manually using Microsoft Excel program. The total numbers of genes shared among all three species were obtained and calculated.

This research aims to identify gene that share similar function in three major group which plant height, fruit development and fruit ripening. *E. guineensis* genome (as our important crops) was compared to *A. thaliana* which is one of the established plant models and the genome was also completely sequenced and annotated. *S. lycopersicum* genome was selected as a representative of model plant for fleshy fruit specifically fruit development and ripening process which is part of traits of interest for this study.

The result show that, 10,163 genes was predicted orthologs to *S. lycopersicum*, and 9,819 of *E. guineensis* genes show to share similar function with *A. thaliana*. Apart from that, *A. thaliana* and *S. lycopersicum* seem to have the largest orthologous group compared to *E. guineensis*. Fig 1 on the intersections of the three pair sets shows that all three species share 9,624 orthologous genes in total contributing to estimately 37% of *E. guineensis* gene sequences (26,087). This latter set may reflect a basic gene(s) tool kit that important in adaptation to the environment [6]. These sets of genes also provide the information for this study which relating to the evolution of the species and the foundation set for selecting the genes in plant height, fruit development and fruit ripening.



**Fig 1** Venn diagram represents the result of comparative genomic analysis between oil palm and two dicot plants. Numbers in the area overlap indicate the number of orthologs predicted by InParanoid with E value =  $10 \times 10^{-5}$ . Total of 9,624 protein sequences are identified as ortholog between all three species

### Gene classification by gene ontology (GO)

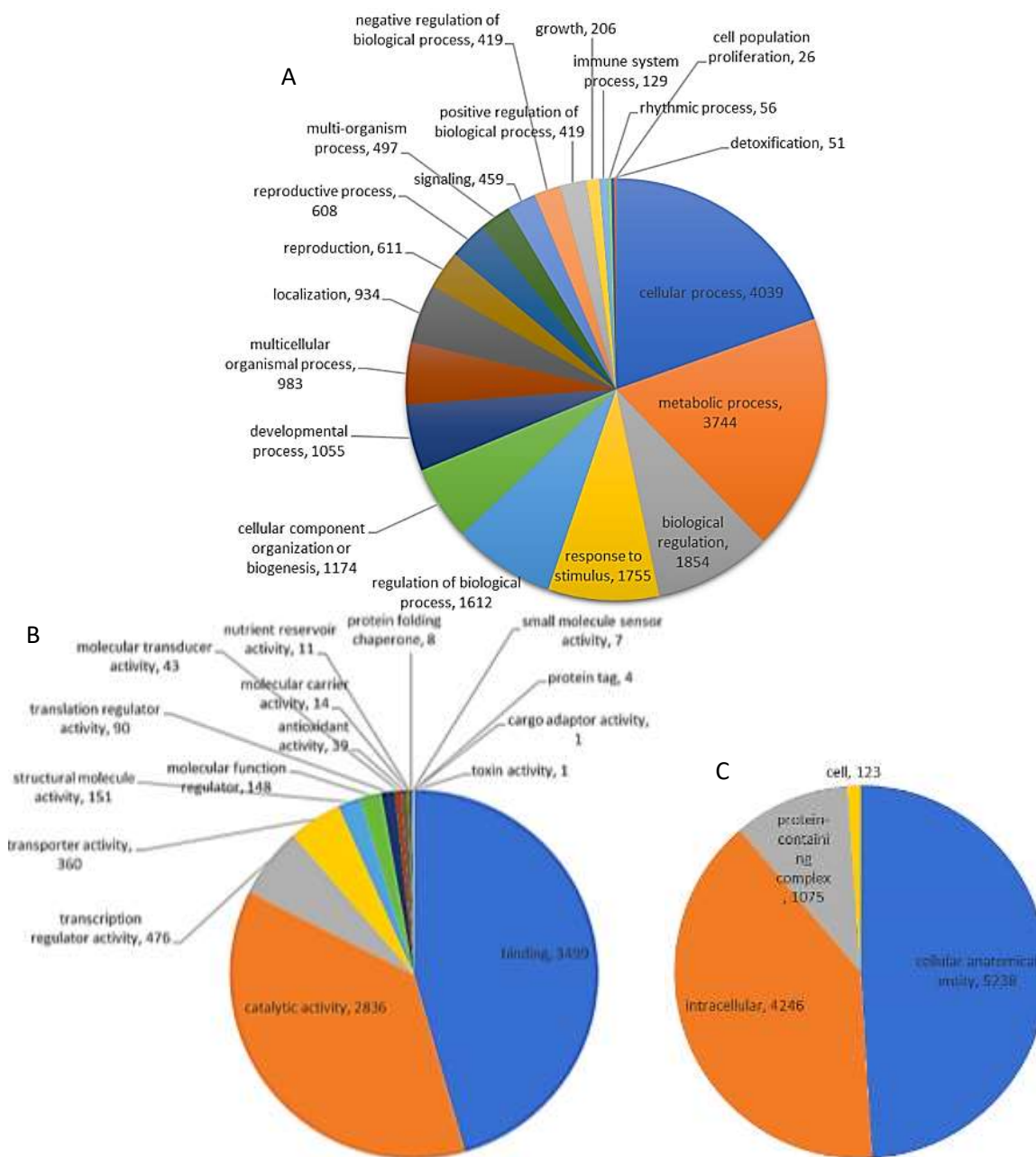
Gene products are assigned to its respective class together with GO term, term that develop to describe its function. The 9,624 orthologous query sequences were blast using NCBI-BLAST+ tools, Blast2GO and DIAMOND to find high-scoring segment pairs (HSP). Majority of the sequences were blast with local database downloaded from NCBI using DIAMOND software since it has similar degree of sensitivity with NCBI-BLAST+ but 20,000 times faster [7]. General parameter set include E-value of  $10 \times 10^{-5}$  and 10 maximum hits. Successfully blast sequence (100%) was loaded into Blast2GO for annotation. Hits obtained by blast search contain the accession number of homolog gene that likely with same gene function. A total of 11,732 GO terms were loaded through mapping to Gene Ontology database. 5,947 or 61.79% of the query sequence (Table 1) are successfully assigned based on Gene Ontology Consortium in biological process (Fig 2A), molecular function (Fig 2B) and cellular components (Fig 2C). More than one term could be associated per gene [8] and each category can be split into other subcategories for high level classification [9].

**Table 1** Gene Ontology classification analysis generated using Blast2GO suite

	Quantity	Percentage (100%)
Sequence has significant similarity (e-value $\leq 10^{-5}$ )	9,624	100
Sequence has Gene Ontology assignment	5,947	61.79

GO classification consists of three major group i.e. biological process, molecular function and cellular component. Biological process term graph at second level of GO classification shows that gene for cellular process and metabolic process are the dominant conserved genes between genome of oil palm, *Arabidopsis* and tomato with 20% (4039 genes) and 18% (3744 genes) of the total gene sequence assigned by GO term followed by biological regulation (1854 genes), response to stimulus (1755 genes), regulation of biological process (1612 genes), cellular component organization or biogenesis (1174 genes), developmental process (1055 genes), multicellular organismal process (983 genes), localization (934 genes), reproduction (611 genes), reproductive process (608 genes), multi-organism process (497 genes), signalling (459 genes), negative regulation of biological process (419 genes), positive regulation of biological process (419 genes), growth (206 genes), immune system process (129 genes), rhythmic process (56 genes), detoxification (51 genes) and cell population proliferation (26 genes). Main plant cellular process and metabolic activity include cellular respiration and photosynthesis.

While for molecular function, binding (3499 genes) and catalytic activity (2836 genes) overwhelmingly dominate the graph with 46% are occupied only for binding category. These are followed by small percentage of transcription regulatory activity (476), transporter activity (360 genes), structural molecule activity (151 genes), molecular function regulator (148 genes), translation regulator activity (90 genes) and others. About 50% of the ortholog genes categorized in cellular component located at cellular anatomical entity. The locations of other genes are at intracellular, protein containing complex and only small  $\approx 1.15\%$  percentage of gene located at cell (123 genes).



**Fig 2** Gene Ontology Classifications. (a) Biological process term at second level of GO classification that was generated using BLAST2GO software. The metabolic process and cellular process were the most dominant second level, with 18% and 17% respectively. (b) Molecular function at second level of GO classification that generated using BLAST2GO software. There were 16 categories of second level molecular function terms that have been successfully assigned for all sequences in database with binding 46% as the dominant categories. (c) Cellular component at second level of GO classification that was generated using BLAST2GO software. There were 4 categories assigned cellular component term i.e. cell, intracellular, protein-containing complex and cellular anatomical entity

## **Data mining for candidate genes**

### ***Plant Height***

Many of the earlier plant height studies have established gibberellin (GAs) and brassinosteroids (BRs) as significant stem elongation hormones [10]. Auxin biosynthesis and signalling also play an important role in controlling the length of the stem [11]. Thus, genes involved in regulating GAs, BRs and auxin are the target genes for regulating plant height in this study. The GO IDs identified for regulating 'GAs' is GO:0009740, gibberellic acid mediated signalling which has a relationship with 28 GO terms within the hierarchical directed acyclic graph. Moreover, the GO IDs for regulating 'BRs' is GO:0009742 named brassinosteroid mediated signalling with 30 related GO terms and the GO IDs for 'auxin' hormone is GO:0009851 named auxin biosynthetic process with 12 GO terms. All three selected GO terms are annotated to biological process by gene ontology as visualized on their respective ancestor charts.

The ancestral charts represent the relationship between nodes (GO terms). GO's structure can be represented as a graph, where each GO term is a node, and the connections between the nodes are edges. From the table generated by Blast2GO containing annotated orthologous genes, the genes of interest are identified using the selected GO terms (GO:0009740, GO:0009742 & GO:0009851) which involve in regulating plant height. There are 10 genes assigned to GO:0009740 which represent gibberellic acid mediated signalling in each species which are PTKs, ZNFs 8, AT1G68360, GASA14, LFY, NF-YC9, PIF3, GA2, GASA6 and AT1G22690 (Table 2). While for GO:0009742, that represent brassinosteroid mediated signalling were 14 genes from each species assigned to it such as transthyretin-like protein (TTL), rapid alkalization factor 23 (RALF23), AT1G48270, AT2G42080, BSL2, AT1G63500, GSK1, VIK, scpl22, IWS1, BIM1, BEH4, BES1 and GF14 PHI (Table 3). For auxin biosynthetic process, GO:0009851, 9 annotated genes identified in each species (Table 4), such as Walls Are Thin 1 (WAT1), aldehyde oxidase 4 (AO4), TSA1, YUC1, YUC6, YUC6, YUC10, STY1 and LRP1. Each gene in Arabidopsis, oil palm and tomato carry the same gene function within their respective cluster but the level of expression during cell division and elongation for plant growth is not determined.

**Table 2** Orthologous gene in *A. thaliana*, *E. guineensis* and *S. lycopersicum* that assigned to GO term gibberellic acid mediated signalling

<b>Gene Description</b>	<b>Short Name</b>	<b>Arabidopsis Gene ID</b>	<b>Oil Palm Gene ID</b>	<b>Tomato Gene ID</b>
Protein kinase family protein	PTKs	AT3G03940.1	p5.00_sc00008_p0027.1	Solyc03g119610.1.1
zinc finger protein 8	ZNFs 8	AT2G41940.1	p5.00_sc00133_p0046.1	Solyc03g058160.3.1
C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein		AT1G68360.1	p5.00_sc00008_p0041.1	Solyc05g009170.2.1
GASA14		AT5G14920.1	p5.00_sc00005_p0101.1	Solyc03g113910.3.1
LEAFY transcription factor	LFY	AT5G61850.1	p5.00_sc00057_p0088.1	Solyc03g118160.2.1
nuclear factor Y, subunit C9	NF-YC9	AT1G08970.1	p5.00_sc00042_p0116.1	Solyc01g079870.3.1
phytochrome interacting factor 3	PIF3	AT1G09530.1	p5.00_sc00060_p0113.1	Solyc01g102300.3.1
Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein		AT1G79460.1	p5.00_sc00010_p0155.1	Solyc08g005640.3.1
Gibberellin-regulated family protein	GAS A6	AT1G74670.1	p5.00_sc00035_p0062.1	Solyc03g116067.1.1
Gibberellin-regulated family protein		AT1G22690.1	p5.00_sc00045_p0180.1	Solyc11g017440.2.1

**Table 3** Orthologous gene in *A. thaliana*, *E. guineensis* and *S. lycopersicum* that assigned to GO term brassinosteroid mediated signalling

Gene Description	Short Name	Arabidopsis Gene ID	Oil Palm Gene ID	Tomato Gene ID
transthyretin-like protein	TTL	AT5G58220.1	p5.00_sc00023_p0237.1	Solyc01g080940.3.1
protein-coupled receptor 1		AT1G48270.1	p5.00_sc00004_p0261.1	Solyc08g061260.3.1
Chaperone DnaJ-domain superfamily protein		AT2G42080.1	p5.00_sc01517_p0001.1	Solyc03g063350.3.1
rapid alkalization factor 23	RALF23	AT3G16570.1	p5.00_sc00009_p0031.1	Solyc01g099520.3.1
BR11 suppressor 1 (BSU1)-like 2	BSL2	AT1G08420.1	p5.00_sc00026_p0077.1	Solyc01g009280.3.1
kinase with tetratricopeptide repeat domain-containing protein		AT1G63500.1	p5.00_sc00197_p0020.1	Solyc11g064890.2.1
GSK3/SHAGGY-like protein kinase 1	GSK1	AT1G06390.1	p5.00_sc00065_p0093.1	Solyc07g055200.3.1
VH1-interacting kinase	VIK	AT1G14000.1	p5.00_sc00004_p0204.1	Solyc01g010950.3.1
serine carboxypeptidase-like 22	scpl22	AT2G24000.1	p5.00_sc00044_p0010.1	Solyc02g088820.3.1
Transcription elongation factor (TFIIS) family protein	IWS1	AT1G32130.1	p5.00_sc00200_p0018.1	Solyc06g066320.3.1
basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	BIM1	AT5G08130.1	p5.00_sc00079_p0054.1	Solyc01g080070.3.1
BES1/BZR1 homolog 4	BEH4	AT1G78700.1	p5.00_sc00059_p0105.1	Solyc02g071990.3.1
BR signaling positive regulator (BZR1) family protein	BES1	AT1G19350.1	p5.00_sc00106_p0015.1	Solyc02g063010.3.1
GF14 protein phi chain	GF14 PHI	AT1G35160.1	p5.00_sc00128_p0004.1	Solyc04g012120.3.1



**Table 4** Orthologous gene in *A. thaliana*, *E. guineensis* and *S. lycopersicum* that assigned to GO term auxin biosynthetic process

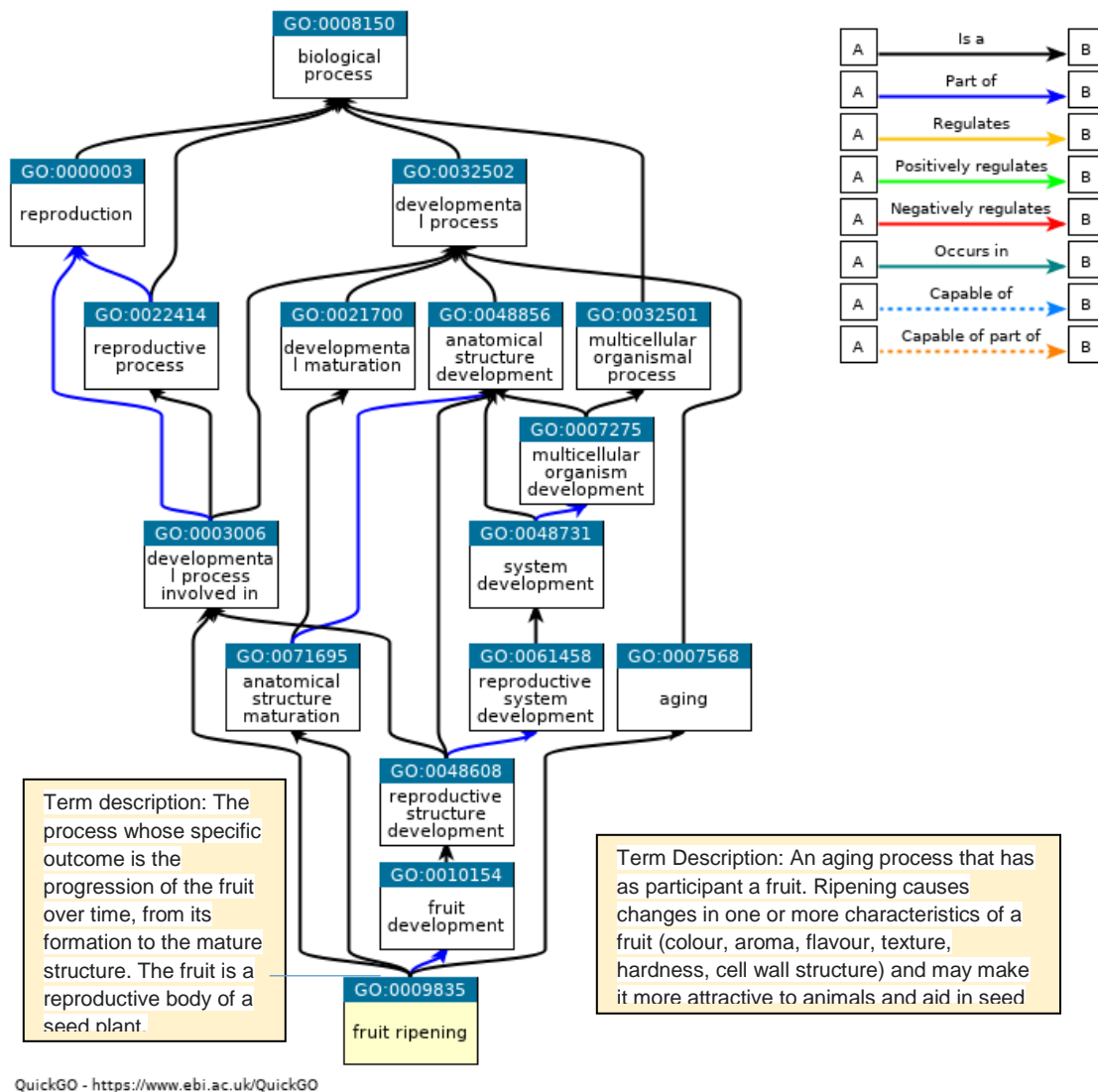
<b>Gene Description</b>	<b>Short Name</b>	<b>Arabidopsis Gene ID</b>	<b>Oil Palm Gene ID</b>	<b>Tomato Gene ID</b>
tryptophan synthase alpha chain	TSA1	AT3G54640.1	p5.00_sc00072_p0034.1	Solyc01g098550.3.1
Walls Are Thin 1	WAT1	AT1G75500.1	p5.00_sc00134_p0082.1	Solyc04g080940.3.1
aldehyde oxidase 4	AO4	AT1G04580.1	p5.00_sc02118_p0001.1	Solyc01g009235.1.1
Flavin-binding monooxygenase family protein	YUC1	AT4G32540.1	p5.00_sc00105_p0039.1	Solyc06g065630.3.1
Flavin-binding monooxygenase family protein	YUC6	AT4G13260.1	p5.00_sc00059_p0124.1	Solyc08g068160.2.1
YUCCA 9	YUC9	AT1G04180.1	p5.00_sc00150_p0011.1	Solyc06g083700.3.1
Flavin-containing monooxygenase family protein	YUC10	AT1G48910.1	p5.00_sc00034_p0005.1	Solyc09g074430.3.1
Lateral root primordium (LRP) protein-like protein	STY1	AT3G51060.1	p5.00_sc00002_p0514.1	Solyc02g062400.3.1
Lateral root primordium (LRP) protein-like protein	LRP1	AT5G12330.1	p5.00_sc00032_p0044.1	Solyc11g064800.2.1

### **Fruit development and ripening**

The development of fruit requires three fundamental stages. The first stage is the development of the ovary and the beginning of the division of cells, together called a set of fruit [12]. Cell division in the second phase and fruit grows in size during the third stage. Then, the ripening process will take the place once the fruit cells have fully expanded and the fruit has matured [13,14]. Each stage of fruit development and ripening involves specific gene activity as shown by transcriptomic analyses [15,16,17]. As predicted, several genes identified include transcription factors known to regulate major changes in fruit development and ripening, such as the Cnr locus [18] and several MADS-box genes expressed in the early stages of tomato fruit ripening [19, 20].

The GO IDs that was identified for fruit ripening is GO:0009835. In acyclic graph generated (Fig 3), fruit ripening and fruit development GO terms are within the same hierarchical directed acyclic graph. The GO IDs for fruit development is GO:0010154 which is the parent for GO term fruit ripening. The genes are annotated to biological process which involve 14 other GO terms. As expected, fruit development and ripening process involve heavily on the initiative for development of plant reproductive organ and structure (cell multiplication and differentiation). This can be observed by the identified GO terms in acyclic graph, which include anatomical structure development & reproductive system to fruit ripening.

From the table generated by Blast2GO containing annotated orthologous genes, our candidate genes are under GO terms (GO:0009835 & GO:0010154) which involve in development of fruit until ripening. There are 8 genes (CYP94B3, XET28, UBP15, AGB1, XIK, RPL, AFO, and POP2) assigned to GO:0009835 which represent fruit development in each species. While for GO:0010154 which represent fruit ripening has 4 genes from each species assigned such as aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 4 (ACS4), NAC-like, activated by AP3/PI (NAP), ACS7 and ACS2. Each gene in *Arabidopsis*, oil palm and tomato carry the same gene function within their respective row yet the level of expression during cell division and elongation for plant growth still unknown.



**Fig 3** Acyclic graph for fruit ripening and fruit development

## Conclusion

Comparative genomics approaches have provided connections between function and evolution in complex biological structures and systems. The aim of this study was to provide genes that were common emerge in group of plant height fruits development and ripening in *E. guineensis* and two dicot plants namely *A. thaliana* and *S. lycopersicum*. The objectives were successfully achieved using combination of bioinformatics tools i.e. InParanoid, SonicParanoid, Diamond BLAST and Blast2GO. After all, only a small

number of related trait genes are present as orthologous genes for each of the group(s). It was suggested in the future work, these agronomical important gene(s) can be utilised not only in molecular breeding but also in genetic engineering such as RNAi, TALENS, or CRISPR techniques. These approaches were then will lead to discovery of new line or variety that consists of desired genetic backgrounds.

#### **Acknowledgments**

We sincerely thank the staff and administration of International Islamic University Malaysia and The Malaysian Palm Oil Board for their assistance and support in this study. This study is funded by the International Islamic University Malaysia (IIUM) Research Initiative Grant Scheme (RIGS17-022-0597) for sponsored this work.

#### **References**

1. Abdullah, R., and Wahid, M. B., World palm oil supply, demand, price, and prospects: focus on Malaysian and Indonesian palm oil industry. Malaysian Palm Oil Board Press. Malaysia. 2010.
2. Samsulrizal, N. H., and Yusof, N. Y., In Silico Prediction of Cell Wall Remodeling Genes in Tomato, Banana, Melon and Grape. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2019. 2(2), 108-121.
3. Singh, R., et.al., Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. *Nature*, 2013. 500(7462), pp.335-339.
4. Nur, S. Y., Suhaila, S., and Ping, L. Genome-wide comparative analysis in discovering potential evolved hypothetical genes in infected oil palm. *Malaysian Applied Biology Journal*, (2018). 47(5), 81-88.
5. Rosli, R., et al., Comparative genomic and transcriptomic analysis of selected fatty acid biosynthesis genes and CNL disease resistance genes in oil palm. *PloS one*, 2018. 13(4).
6. Somero, G. N., The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *Journal of Experimental Biology*, 2010. 213(6), 912-920.
7. Buchfink, B., Xie, C., and Huson, D. H., Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, 2015. 12(1), 59.
8. The Gene Ontology Consortium., The gene ontology resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic acids research*, 2018. 47(D1), D330-D338.
9. Lewis, S. E., The Vision and Challenges of the Gene Ontology. *The Gene Ontology Handbook*, 2017. 291.
10. Gyawali, A., et al., Single-plant GWAS coupled with bulk segregant analysis allows rapid identification and corroboration of plant-height candidate SNPs. *BMC plant biology*, 2019. 19(1), 412.
11. Wang, Y., and Jiao, Y., Auxin and above-ground meristems. *Journal of experimental botany*, 2017. 69(2), 147-154.
12. Handa, A. K., et al., Fruit development and ripening: a molecular perspective. In *Plant biotechnology and agriculture*. Academic Press, 2012. pp. 405-424.
13. Gillaspay, G., Ben-David, H., and Gruissem, W., Fruits: a developmental perspective. *The Plant Cell*, 1993. 5(10), 1439.

14. Ezura, H., and Hiwasa-Tanase, K., Fruit development. In *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*, Springer, Berlin, Heidelberg. 2010. pp. 301-318.
15. Carrari, F., et al., Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiology*, 2006. 142(4), pp.1380-1396.
16. Mounet, F., et al., Gene and metabolite regulatory network analysis of early developing fruit tissues highlights new candidate genes for the control of tomato fruit composition and development. *Plant Physiology*, 2009. 149(3), 1505-1528.
17. Srivastava, A., et al., Maturity and ripening-stage specific modulation of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit transcriptome. *GM crops*, 2010. 1(4), 237-249.
18. Manning, K., et al., A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature genetics*, 2006. 38(8), 948.
19. Busi, M. V., et al., MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant molecular biology*, 2003. 52(4), 801-815.
20. Giovannoni, J. J., Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current opinion in plant biology*, 2007. 10(3), 283-289.
21. Wickell, D.A. and Li, F.W., On the evolutionary significance of horizontal gene transfers in plants. *New Phytologist*, 2020. 225(1), pp.113-117.

Çetinkaya S, Kocabay S, Yenidünya AF. 2020. An investigation on the probiotic properties of *Lactobacillus fermentum*. International Journal of Life Sciences and Biotechnology. 3(2):180-190.  
DOI: 10.38001/ijlsb.725520

## An investigation on the probiotic properties of *Lactobacillus fermentum*

Serap Çetinkaya<sup>1\*</sup> , Samet Kocabay<sup>2</sup> , Ali Fazıl Yenidünya<sup>1</sup> 

### ABSTRACT

The study assessed some of the probiotic characteristics of an isolate (AB4 29) of *Lactobacillus fermentum*. AB4 29 was isolated from a faecal sample of an infant, fed with breast milk. The results indicated that the isolate had acceptable survival rates in gastric juice both in the presence and in absence of pepsin. It also displayed acceptable sensitivity rates to eleven different antibiotics. Hydrophobicity test showed that the isolate had a good capacity to adhere to xylene. It could also destroy sodium salts. AB4 29 displayed the least survival rates in bile salt. These initial findings could suggest that infant faeces and breast milk could serve as good sources of probiotic organisms.

### ARTICLE HISTORY

#### Received

22 April 2020

#### Accepted

29 June 2020

### KEYWORDS

*Lactobacillus fermentum*,  
Acid tolerance,  
Probiotic,  
Surface hydrophobicity

## Introduction

Currently, many of the commercial probiotic strains are obtained from the intestines of healthy infants and adults. Current research therefore has mainly focused on the identification of those bacteria which could survive in the gut and compete with other microorganisms [1]. In the selection of probiotic strains, the main consideration is their beneficial properties to humans. The niche of these bacteria is the column. Probiotics are usually administered by the mouth and thus they must survive the harsh conditions while passing through the gastrointestinal tract (GI) to arrive at this final destination. Therefore, they are expected to resist salivary enzymes, stomach acid, and bile acids and salts, on the way. The cells of a probiotic strain should also form aggregates with themselves as well as with other microorganisms. The self-clusters form a biological barrier in the cavities of the GI- and

<sup>1</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Science Faculty, Sivas Cumhuriyet University, Sivas Turkey.

<sup>2</sup> Inonu University, Science and Literature Faculty, Department of Molecular Biology and Genetics, Malatya, Turkey

Corresponding Author: Serap Çetinkaya, e-mail: [serapcetinkaya2012@gmail.com](mailto:serapcetinkaya2012@gmail.com)

urogenital systems, whereas the heterogeneous accumulations are necessary for the neutralisation of other bacteria [2-4].

Many probiotic microorganisms have been derived from genera known as lactic acid bacteria (LAB). They are obtained from food sources and therefore are generally known as safe (GRAS). Species of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* include many of the current probiotic strains. They are Gram (+), and their morphology can be rod, spherical or both. They do not form spores. They are relatively more resistant to stomach acids, and to lysozyme [5, 6]. Yeasts such as members of *Saccharomyces*, have also been used as probiotics [7].

Main metabolites produced by LABs include bio surfactants, carbon dioxide, di-acetyl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lactic acid, and protein compounds (bacteriocin and bacteriocin-like substances) and they generally have antimicrobial activities [8-10].

Lactic acid is a sour and odourless fermentation product [11]. During growth LABs also produce hydrogen peroxide. It is a thermodynamically unstable compound and readily decomposes into water and oxygen. The amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced differs from genus to genus, between species, and even among the strains of the same species [12, 13].

The aim of the study was to demonstrate whether infant faeces would be a source for the probiotic bacteria. Thus faecal samples collected belonged to the infants who were born by natural means and fed with breast-milk only. Thus the first step involved the isolation and identification of the LAB members and the second step included the studies performed for the investigation of some of their probiotic characteristics. Probiotic properties were screened by growing the isolated strain in simulated gastric- and intestinal juice, and in the presence of antibiotics. In addition, surface hydrophobicity was also determined.

## **Materials and Methods**

### **Isolation and identification of the faecal isolate**

One-gram faecal sample was inoculated in 10mL liquid culture and grown for 12h at 37°C (MRS, pH 6.3: 2% glucose, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1% meat extract, 0.005% MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 1% peptone, 0.5% sodium acetate, 0.5% yeast extract, 0.2% tri-ammonium citrate). Colonies were obtained and purified by the streak method and by successive passages on MRS-agar media. Bacterial stocks were prepared in 20% glycerol. The isolates

were screened for Gram reaction and catalase activity. Gram (+) and catalase negative isolates were saved at -80°C for further use.

For the molecular characterisation, DNA was prepared and used for the amplification of 16S rRNA gene by using the method described in Bulut *et al.* (2004) [14]. Amplification was carried out in a Thermo Cycler System (Thermo Electron Corp., USA). Nucleotide sequence of the two oligo-primers used for the amplification were forward, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and reverse, 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3' [15]. Final reaction volume (50µl) included 200ng DNA template, 0.2mM dNTPs, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10pmol each of the oligomers in 1x PCR buffer (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 8g Nonident P40/1, pH 8; MBI Fermentas, Lithuania), and 1.25 U Taq DNA polymerase (MBI Fermentas). Amplification reactions included 5 min initial denaturing step at 94°C; each of the 40 amplification cycles included 1 min denaturation step at 94°C, 1 min annealing at 58°C, and 1 min elongation at 72 °C Amplification ended with a 10 min terminal extension step at 72 °C.

### **Determination of probiotic properties of the isolates**

#### ***Tolerance to low pH***

Four MRS broth media with different pH (2, 3, 4, and 6.3) were prepared. Strain AB4 29, pH 6.3 (control) was inoculated into MRS broth and grown overnight in a shaking water bath at 37°C. The culture was divided into four sterile falcon tubes and the cells were precipitated for 10 min at 5,000 rpm at 4°C. After removing the supernatant, cells were resuspended in one of the MRS broths (10ml) with different pH [pH 2, pH 3, pH4, and pH 6.3 (control)].

Sequential dilution (10<sup>12</sup>-fold) was performed in sterile 4.5 ml NaCl (0.85%). One hundred microliters of the last two dilutions were inoculated by the pour-plate method. The cells were then left for incubation overnight at 37°C. The colonies grown were counted and cfu/ml was counted and plotted. Survival rate was calculated by using the formula below:

$$\text{Survival rate (\%)} = (\log \text{ cfu } N_1 / \log \text{ cfu } N_0) \times 100\%$$

(N<sub>1</sub> = Total number of the cells survived after each of the pH treatments, N<sub>0</sub> = Total number of alive cells before the treatment) [16].



### ***Tolerance to gastric juice***

To imitate gastric juice, 1x sterile PBS solutions, prepared at pH 2, pH 3, and pH4, were supplemented with fresh 3g /L pepsin. The isolate AB4 29 was incubated in each these solutions for 4h, and survival rate was assessed as before.

### ***Tolerance to bovine bile acids***

Four MRS liquid media, pH 6.8, each containing 0.5%, 1%, 1.5%, or 2% ox-bile, were prepared. The isolate AB4 29 was incubated in each these solutions for 3h, and survival rate was assessed as before.

### ***Antibiotic resistance***

AB4 29 strain was incubated overnight at 37°C in MRS broth, pH 6.3. One millilitre of the overnight culture was then spread on MRS agar, pH 6.3. After waiting for 1 min, antibiotic discs containing kanamycin K 30, ampicillin AM 10, streptomycin S 10, tetracycline TE 30, gentamicin CN 30, chloramphenicol C 30, penicillin P 2 units, erythromycin E 15, rifampin RA 5, neomycin N 30, vancomycin VA 30, and control 00 were placed onto the plates, and allowed for overnight incubation at 37°C. Following morning, antibiotics sensitivity was determined by measuring the diameters of the clear zones, formed around the discs, and the measured values were plotted [17].

### ***Tolerance to sodium salts***

The AB4 29 isolate was grown in MRS agar overnight at 37°C. Sodium salts, 0.005 g/ml, (sodiumglycocholate hydrate, sodium taurodeoxycholate, sodium taurocholic acid) were prepared in MRS agar, pH 6.3. The colonies formed were immersed in the sodium salt solution and left for overnight incubation at 37°C. Salt break-down by AB4 29 was checked and the results were recorded [18].

### ***Cell surface hydrophobicity test***

AB4 29 was grown overnight at 37°C in MRS broth (pH 6.3). The culture was divided into four aliquots in sterile tubes. Cells were precipitated and 10 ml of phosphate-urea magnesium sulphate were added onto each of the cell pellets. This last step was performed twice. The

initial cell densities were set to 1 at 450nm and then 0.6 ml of *n*-hexadecane, *n*-hexane, xylene were added onto the cell suspensions (3ml). The final samples were then incubated for 15 min at 37°C by gentle mixing every 2 min. The samples were kept at room temperature until a hydrocarbon layer formed. This step took approximately 25 min. The aqueous phase was removed and the bacterial density of the remaining mixture was measured. The hydrophobicity percentage was calculated by using the formula below.

$$\text{Hydrophobicity \%} = (\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ N}_0 - \text{OD}_{450\text{nm}} \text{ N}_1) / \text{OD}_{450\text{nm}} \times 100\%$$

( $\text{OD}_{450\text{nm}} \text{ N}_1$  = absorbance value of the species after treatment with bovine bile acids,  $\text{N}_0$  = absorbance value before application) [19].

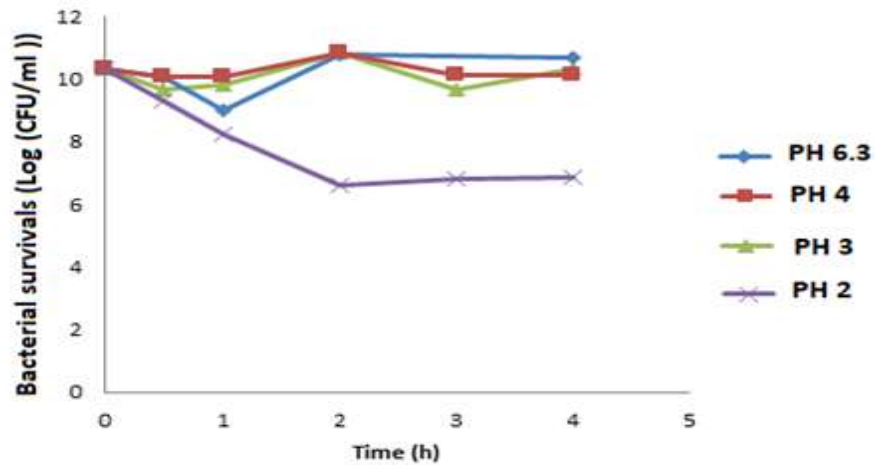
## **Result and Discussion**

### **Characterization of isolates**

Morphological and partial biochemical characterization showed that all of the isolates were Gram-positive, catalase-negative and non-spore forming rod-shaped bacteria (data not shown). A phylogenetic analysis based on 16S ribosomal RNA (rRNA) gene sequence comparison showed that the isolates belonged to *Lactobacillus fermentum*. The sequence was submitted to GenBank (Accession Number: KJ865403).

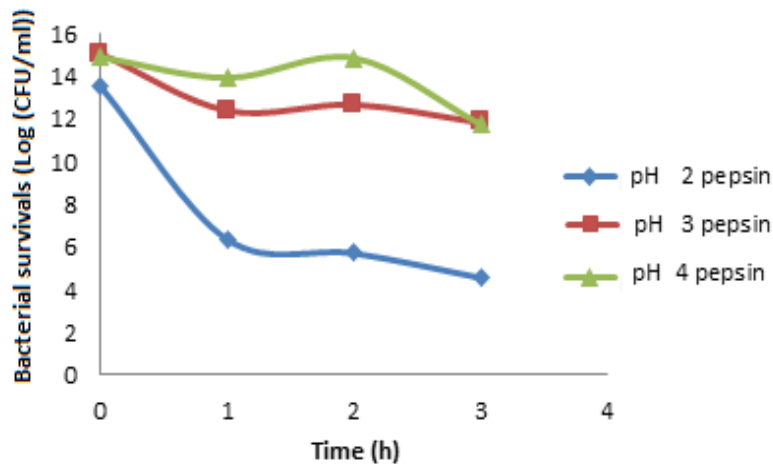
### **Resistance to low pH, gastric juice, bile acids and sodium salts**

AB4 29 strain produced a resistance curve similar to that of the control growth curves at pH 3 and 4. Small differences can be evaluated within the experimental error limits. Sensitivity started at pH points below 3. There was a 1000-fold decrease in the number of live cells at pH 2 and after two hour of incubation, beyond this point of time the number of the cells appeared to be stabilised (Figure 1).



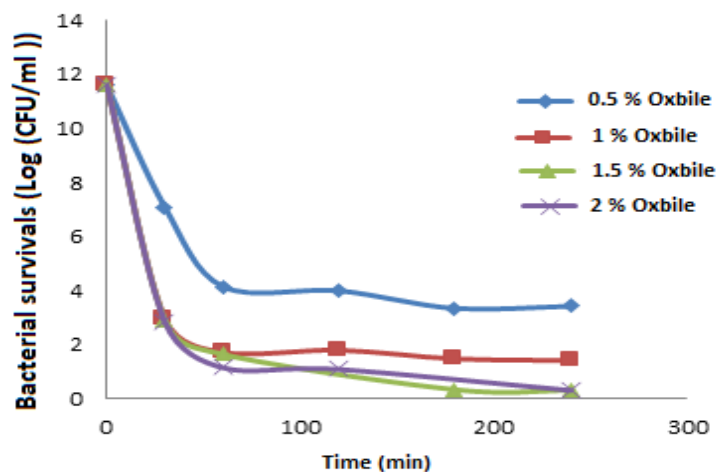
**Fig 1** The number of live cells at low pH

AB4 29 was incubated at three different pH in phosphate buffered salt solution (PBS), containing pepsin. The cell number decreased approximately 100 times at pH 3 and 4, and approximately 10 billion times at pH 2 (Figure 2).



**Fig 2** Survival rates of AB4 29

AB4 29 displayed the lowest resistance in this experiment. As can be seen (Figure 3), the number of cells decreased between 100 million to 1 trillion times.



**Fig 3** Tolerance to bile salt

The detoxification of sodium salts was determined qualitatively by means of salt zones formed around the colony. Enzymatic separation of the taurine portion from the deoxycholate enables the formation of zones around the colonies. Strain AB4 29 appeared to be capable of performing this reaction (Table 1).

**Table 1** Break down of sodium salts

<b>Bacteria</b>	Sodium glycocholate hydrate	Sodium torodeoxycholate	Sodium torocolic acid	Sodium toroglycolate
AB4 29	+	+	+	-

High acid and bile tolerance of a probiotic candidate is very much desired because human body appears to have combined almost all the hostile environments within the confines of gastro-intestinal system. On one end, stomach pours in daily around 3 litres of strong acid, and the liver produces approximately 1 litre of bile salts, on the other end [20]. It appears that hydrolases seem to render the bacteria to be tolerant against bile salts [21,22]. It has been known that LABs could generally show significant resistance to the bile salts, between 0.3% and 0.4% concentrations at pH 7 [23]. This tolerance has seemed to decrease at pH points below 7 [24]. In some studies, it has been reported that much lower bile salt concentrations

could inhibit the growth of bacteria [25] and 0.3% could be the critical concentration [23]. In one of the reports it has been argued that toleration to bile salts can even be strain-dependent, that is it varied among the members of the same species [26]. In this study it was obvious that much higher bile salt concentrations, than those of the literature, were employed (Fig.3). Low tolerance could be a reflection of this approach. The acid tolerance profile of the strain AB4 29 at pH 2 (Fig. 1) was similar to those found in the literature, and this performance is likely to be improved further by adding glucose to the medium [27].

In the literature the maximum incubation time used was 100 min. In this study 5h of incubation was performed and after two hours the survival rate did not change and the number of live cells were stable. This finding might suggest that the protons of the medium were somehow titrated by the cellular metabolism, as it seems unlikely for the surviving cells to adapt to low pH in such a short time.

The survival rate obtained after the treatment with pepsin in an acid medium was also very similar to the that obtained in the absence of pepsin. The results in the literature are usually expressed in % rather than graphics, and the rates range from 60% to 98%. In this study, it is possible to say that the negative effect of pepsin on cells is very low. On the other hand, it is clear from the graphs that AB4 29 is more sensitive to trypsin.

Bacterial adhesion to hydrocarbons as a screening method for probiotic bacteria gives an insight into the role of hydrophobic interactions in adhesion [28]. Cell surface hydrophobicity of some strains of *Lactobacillus* has been found to be as high as 95% [29]. In some of the other studies relatively lower percentages have been mentioned [30]. AB4 29 appeared to have a rather weak surface hydrophobicity, ranging from 11 to 17% (Table 2), compared to those found in the literature. This issue can be clarified by more precise and non-controversial methods with devices measuring cell surface charge.

**Table 2** Results of surface hydrophobicity

<b>Solvent</b>	<b>Hydrophobicity %</b>
n-Hexadecane	11,69
n-Hexane	17,62
Xylene	23,17
H <sub>2</sub> O	17,05

To sum up, this initial study with a very limited project budget, suggests that LAB of infants fed with breast milk may be a good source of probiotic bacteria.

### Antibiotic susceptibility

The sensitivity of AB4 29 to antibiotics was assessed qualitatively by using 11 different antibiotics (Figure 4).

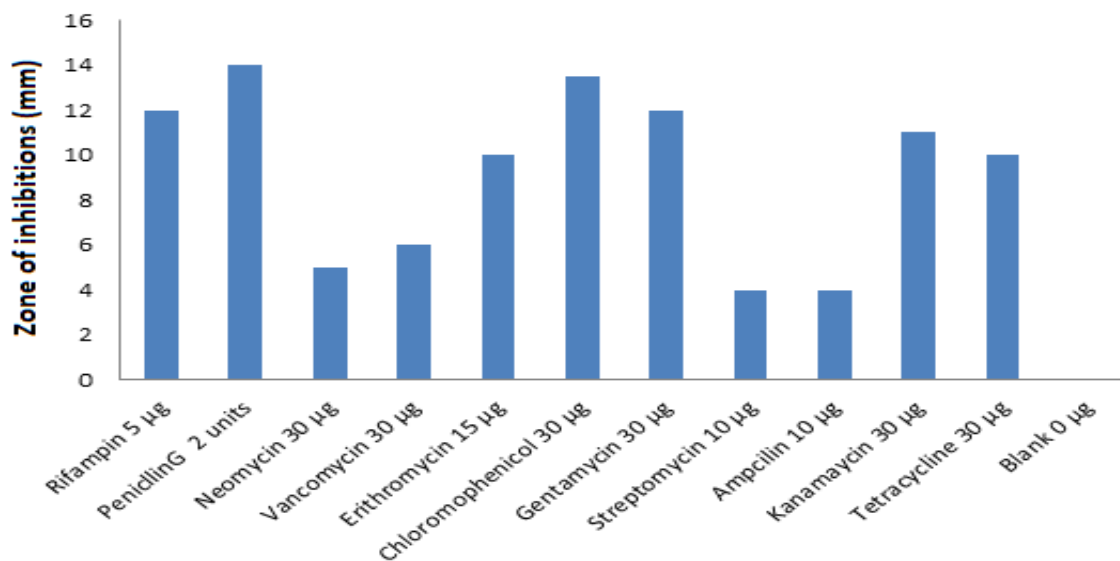


Fig 4 Antibiotic susceptibility of AB4 29

### Surface hydrophobicity

Surface hydrophobicity was assessed by spectrophotometric measurement of cell turbidity in three organic solvents (Table 2). Compared with water, it was found that the rate of adhesion to *n*-hexadecane was lower than to that of water. The highest adhesion was obtained with xylene.

### Conclusion

The study was performed with a project with modest budget. It enabled us to study some of the desired probiotic properties of the AB4 29 isolate of *Lactobacillus fermentum*. The experiment aiming at the investigation of the bile tolerance should be repeated by using the

much lower concentration figures indicated in the literature. Other findings were comparable to those found by other studies.

### Acknowledgement

This work (F-498) was supported by CUBAP, Sivas Cumhuriyet University.

### References

1. Ahmad, I., F. Ahmad, and J. Pichtel, *Microbes and Microbial Technology*, 2011, Springer.
2. Kolenbrander, P.E., Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. *Annual Review of Microbiology*, 1988. 42: p. 627–56.
3. Reid, G., et al., Is there a role for lactobacilli in prevention of urogenital and intestinal infection? *Clinical Microbiology Reviews*, 1990. 3(4): p. 335–344.
4. Turhan, F.Y., Determination of Potential Probiotic Properties of Some Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated in Vaginal Secretion. Ankara University, Biotechnology Institute, 2011, Ph.D. Thesis.
5. Hoffman, F.A., Executive Summary Scientific and Regulatory Challenges of Development of Probiotics as Foods and Drugs. *Science and Regulation of Probiotics*. 2008. 46(2): p. 53-57.
6. Tahri, K., J.P. Grill, and F. Schneider, Bifidobacteria strain behaviour toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Current Microbiology*. 1996. 33: p. 187-193.
7. Binns, N., *Probiotics, Prebiotics and The Gut Microbiota*, ILSI Europe Concise Monograph Series, 2013, International Life Sciences Institute.
8. Floch, M.H., et al., The effect of bile acids on intestinal microflora. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1972. 25: p. 1418-26.
9. Mishra, C. and J. Lambert, Production of antimicrobial substances by probiotics. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 1996. 5(1): p. 20-24.
10. Reid, G. and A.W. Bruce, Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001. 183(1): p. 77-80.
11. Barbosa, T.M. and S.B. Levy, The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates*, 2000. 3(5): p. 303–311.
12. Delves-Broughton, J., et al., Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1996. 69: p. 193–202.
13. Klaenhammer, T.R., Genetics of intestinal lactobacilli. *International Dairy Journal*, 1995. 5(8): p. 1019–1058.
14. Bulut, C., et al., Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. *Journal of Dairy Research*, 2005. 72(1): p. 19–24.
15. Yenidünya, A.F., A.Y. Kitapçı, and A. Cetin, A comparative study on colonic and milk bacteria by double-digested 16S rRNA gene amplicons. *Biotechnol. Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2010. 24(3): p. 1310–2818.
16. Iver, R., et al., Probiotic properties of folate producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Food Research International*, 2010. 43(1): p. 103-110.
17. Elli, M., et al., Survival of yoghurt bacteria in the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006. 72(7): p. 5113-5117.
18. Zoral, S., Determination of Probiotic Properties of Human Originated *Lactobacillus* spp Strains. Ahi Evran University, Institute of Science, Department of Biology, 2013, Master Thesis.
19. Ghosh, K., et al., Role of probiotic *Lactobacillus fermentum* KKL1 in the preparation of a rice based fermented beverage. *Bioresource Technology*, 2015. 188: p. 161–168.

20. Cotter, P.D. and C. Hill, Surviving the acid test: responses of Grampositive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003. 67: p. 429–453.
21. Bao, Y., et al., Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 2010. 21(5): p. 695–701.
22. Begley, M., C.G. Gahan, and C. Hill, The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005. 29(4): p. 625–651.
23. Gilliland, S.E., T.E. Staley, and L.J. Bush, Importance in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 1984. 67(12): p. 3045-3051.
24. Khalil, R., et al., Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. *African Journal of Biotechnology*, 2007. 6(7): p. 939–49.
25. Fuller, R., *Probiotics. The Scientific Basis*, 1992, London, Chapman and Hall.
26. Maldonado, N.C., et al., Lactic acid bacteria isolated from young calves e characterization and potential as probiotic. *Research in Veterinary Science*, 1992. 92(2): p. 342-349.
27. Corcoran, B.M., et al., Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Applied And Environmental Microbiology*, 2005. 71(6): p. 3060–3067.
28. Rosenberg, M., Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiology Letters*, 2006. 262(2): p. 129–134.
29. Draksler, D., S. Gonzáles, and G. Oliver, Preliminary assays for the development of a probiotic for goats. *Reproduction Nutrition Development*, 2004. 44(5): p. 397–405.
30. Kaushik, J.K., et al., Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PloS One*, 2009. 4: p. 1–11.



Subramaniam, Y., et al., Antimicrobial Activity of *Musa acuminata* Peel Extract against Gram-Positive Bacteria. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(2): p. 191-196. DOI: 10.38001/ijlsb.747883

## Antimicrobial Activity of *Musa acuminata* Peel Extract against Gram-Positive Bacteria

Yashini Subramaniam<sup>1</sup> , Nurzafirah Mazlan<sup>1\*</sup> , Halijah Hassan<sup>1</sup> ,  
Juju N. Jaafar<sup>2</sup> , Thung Tze Young<sup>3</sup> , Siti Marwanis Anua<sup>4</sup> , Safaa N. Saud<sup>5</sup> 

### ABSTRACT

Particular communities are discarding banana (*Musa acuminata*) peels as household and industrial food waste. It is high in nutritive value and a healthy source of food to consume. This study aims to evaluate the antimicrobial activity of *M. acuminata* peels against four types of Gram-positive bacteria, namely, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. The extract of *M. acuminata* peel was prepared using a Soxhlet apparatus for ethanolic extract and rotary evaporator to concentrate the ethanolic extract. Antimicrobial activity was carried out on the extract using agar disc diffusion technique; the inhibitory zones were recorded in millimetres. Results showed that the disc diffusion method of ethanolic extract of *M. acuminata* peel was not effective against all the Gram-positive bacteria strains. This result indicated that *M. acuminata* peel did not pose any potential antimicrobial effect against Gram-positive bacteria. However, further study should be carried out using different extraction method and concentration in order to evaluate antimicrobial activity.

### ARTICLE HISTORY

Received

06 April 2020

Accepted

07 July 2020

### KEYWORDS

Antimicrobial activity, *Musa acuminata* peel, acarbose, Gram-positive bacteria.

## Introduction

Banana (*Musa* spp) is the second most fruit crop plantation in Malaysia, and *Musa acuminata* plantation coverage is about 50% of the total banana plantation area [1]. Most of the time banana peel is discarded as waste by household and some industries. The bioactive compounds in banana peels such as flavonoids, glycosides, alkaloids and tannins have

<sup>1</sup>Department of Diagnostic & Allied Health Sciences, Faculty of Health & Life Sciences, Management and Science University, University Drive, Section 13, 40100 Shah Alam, Selangor, Malaysia.

<sup>2</sup>Department of Crop Science, Faculty of Agriculture, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia.

<sup>3</sup>Department of Food Science, Faculty of Food Science & Technology, Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia.

<sup>4</sup>Environmental and Occupational Health Program, School of Health Sciences, Health Campus Universiti Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian, Kelantan, Malaysia.

<sup>5</sup>Faculty of Information Sciences and Engineering, Management and Science University, University Drive, Section 13, 40100 Shah Alam, Selangor, Malaysia.

\* Corresponding Author: Nurzafirah Mazlan. Email: [nurzafirah\\_mazlan@msu.edu.my](mailto:nurzafirah_mazlan@msu.edu.my)

various pharmacological and biological effects [2]. Mohapatra et al., (2010) stated that banana peels are one of the good sources of pectin and nutrients such as dietary fibres, sugars and minerals [3]. Other varieties of banana peels such as *Musa sapientum* and *Musa paradisiaca* peels show effective antimicrobial activities against certain types of bacteria [4,5]. A wide range of pharmaceutical agents such as antibacterial, antiparasitic, antifungal and antiviral drugs was encompassed by antimicrobial activity [6]. Antimicrobial agents can be in the form of antibiotics, which helps to stop the growth or kill the microorganisms [7]. Encyclopedia Britannica stated that there were a number of natural origin antibiotics such as gentamicin and tetracycline used commonly in antibacterial activity. Nowadays, plant-derived antibiotics are mostly preferred for antimicrobial activities by pharmaceutical and food industries [8]. In antimicrobial testing disc diffusion method is a suitable technique to identify the zone of inhibition shown by the plant extract and nutrient broth agar method is used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) according to Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) [9].

Gram-positive bacteria are multi-resistant bacteria that cause infections and lead to a significant health problem for the public. They affect the mortality and mobility of a person and cause an increase in the implementation of infection control measure and expenditure on patient management [10]. Even though, there are certain antibiotics used in order to treat the infections caused gram-positive bacteria; but they were still causing side effects [11]. Therefore, plant-derived antimicrobials are now preferable, and many researchers intend to conduct research based on plant extract. Although, *M. acuminata* peels consist of certain medical properties that can be used to treat diseases [12], the scientific evidence that has been provided in the management of Gram-positive bacteria is not that much susceptible in antimicrobial activity. Hence, this research was conducted to evaluate the potential antimicrobial activity of *M. acuminata* ethanolic peel extract against Gram-positive bacteria.

## **Materials and Methods**

### **Sample extraction preparation**

*Musa acuminata* fruit used in this research was collected from Kampung Parit Serong, 45500 Tanjong Karang, Selangor, Malaysia at the coordinate of longitude: 3.427186; latitude: 101.220844. Identification of *M. acuminata* peel was carried out at the Department of Crop Science, Faculty of Agriculture, University Putra Malaysia (UPM) and the peels were taken for an experiment at the herbarium. The peels of *M. acuminata* were rinsed with distilled water; chopped into 0.5 cm – 1.0 cm and dried in an oven at 50°C for 12 hours. The dried *M. acuminata* peel was grounded into a fine powder and soaked into hexane for defatting method. Then, the peel once again dried using the oven at 10°C for 10 minutes [13]. A total of 500g of powdered *M. acuminata* peels was soaked in 5 L of 85% ethanol and placed in a water bath at 60°C for 8 hours. The supernatant was filtered using filter paper and evaporated to dry by using a rotary evaporator at 40-50°C. The dried extract was dissolved in acetone and stored at 0-4°C in an airtight container for further use [14].

### **Antibacterial activity of *Musa acuminata* peel**

The disk diffusion method was used to evaluate the antimicrobial activity. Bacterial suspensions (100 µl) were spread using glass spreader (90° bend). An amount of 10 µl plant extract concentration of 10 mg/ml was loaded on sterile filter paper discs and placed on the top of Mueller-Hilton agar plates. Ampicillin (10 µg), Gentamicin (10 µg) and Tetracycline (10 µg) discs were also loaded on the same Mueller-Hilton agar plate as control. The plates were kept in an incubator at 37°C for 24 hours. Using a Vernier caliper, the zone of inhibition was measured [15].

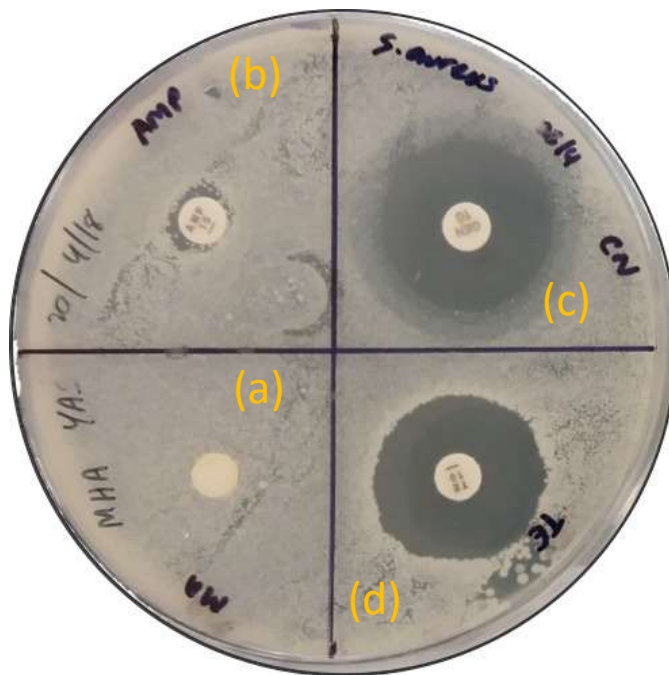
## **Result and Discussion**

The *Musa acuminata* ethanolic peel extract does not show zone of inhibition (0.00mm) on four types of tested organisms, as presented in Table 1. The results revealed that ethanolic extract of *Musa acuminata* peel was resistant to all the Gram-positive bacteria tested. The previous study reported that Gram-positive bacteria had shown the lowest inhibition zone in other variety of banana *Musa* spp. [4,5]. However, Rattanavichi & Cheng (2014) reported that there was the antimicrobial activity of the hot-water extracts of *M. acuminata* peel

against pathogens from aquatic animals [16]. Different extraction methods can be used to test the effectiveness against Gram-positive bacteria. The disk diffusion method was used in this study to evaluate the antimicrobial activity of the *M. acuminata* and antibiotics such as Ampicillin, Gentamicin and Tetracycline against the Gram-positive bacteria such as *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. Figure 1 shows the inhibition zone of *Musa acuminata* ethanolic peel extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. This method has been used widely in the previous study [13,14]. However, in this study, the value of MIC was not determined; thus, the result obtained did not justify the concentration of extract used. A study by Mokbel and Hashinaga (2005) showed that with a MIC value of between 140 - 750 ppm, it was unable to inhibit all the Gram-positive bacteria [17].

**Table 1** Inhibition zone (mm in diameter) of *Musa acuminata* ethanolic peel extract and antibiotics (positive control) against four different organisms

	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. pyogenes</i>
<i>Musa acuminata</i> <i>peel extract</i>	0.0 mm ± (Resistant)	0.0 mm ± (Resistant)	0.0 mm ± (Resistant)	0.0 mm ± (Resistant)
<i>Ampicillin</i>	10.0 mm ± (Resistant)	7.0 mm ± (Resistant)	7.0 mm ± (Resistant)	9.0 mm ± (Resistant)
<i>Gentamicin</i>	24.0 mm ± (Susceptible)	24.0 mm ± (Susceptible)	21.0 mm ± (Susceptible)	20.0 mm ± (Susceptible)
<i>Tetracycline</i>	8.0 mm ± (Resistant)	23.0 mm ± (Susceptible)	7.0 mm ± (Resistant)	20.0 mm ± (Susceptible)



**Fig 1** Inhibition zone (mm) of (a) *Musa acuminata* ethanolic peel extract, (b) Ampicillin, (c) Gentamicin, and (d) Tetracycline against *Staphylococcus aureus*

## Conclusion

It was concluded that the *M. acuminata* ethanolic peel extract did not pose any antimicrobial effect against Gram-positive bacteria *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. Future study can be conducted by measuring the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the extract and using different extraction method.

## Acknowledgments

The researchers would like to thank Mr. Muhammad Sarimie Nurul Nizam Bin Shamsir Khan (MSU) for his help in sample collection and advice in this study. Thanks to the supplier of *Musa acuminata* from Kampung Parit serong, Tanjong Karang, Selangor and Crop Science lab assistant Encik Azahar from Universiti Putra Malaysia.

## References

1. Nyombi, K., Diagnosis and management of nutrient constraints in bananas (*Musa* spp.), *Fruit Crops*, A.K. Srivastava, Chengxiao Hu, 2020, Elsevier. Netherlands. P. 651-659.
2. Pereira, A. and Maraschin, M., Banana (*Musa* spp) from peel to pulp: ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health. *Journal of ethnopharmacology*, 2015. 160: p.149-163.

3. Mosa, Zenab M., and Ayman F. Khalil, The effect of banana peels supplemented diet on acute liver failure rats. *Annals of Agricultural Sciences*, 2015. 60(2): p.373-9.
4. Sirajudin, Zuvairea Nazren Mohd, et al., Antimicrobial activity of banana (*Musa paradisiaca* L.) peels against food borne pathogenic microbes. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2014. 8: p.3627-39.
5. Ehiowemwenguan, G., Emoghene, A. O. and Inetianbor, J. E, Antibacterial and phytochemical analysis of banana fruit peel. *Pharmacy*, 2013. 4(8): p. 18-25.
6. Leekha, S., Terrell, C. L. and Edson, R. S, General principle of Antimicrobial Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, 2011. 86(2): p.156-167.
7. Cowan, M. M., Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999.12(4): p. 564-582.
8. Rahman, SM Abdel, et al., Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment. *Biotechnology*, 2011.10(52): p.10733-10743.
9. Patel, J. B., et al., Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Laboratory Standards Institute*, 2017. 37(27): p.1-249.
10. Woolford, N. and David, M. L., Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of global challenge. *Infection*, 2009. 59(1): p. 4-16.
11. Andrade, R. J. and Tulkens, P. M., Hepatic safety of antibiotics used in primary care. *Antimicrobial Chemotherapy*, 2011. 66(7): p.1431-1446.
12. Edenta, C., et al., Hypolipidemic effects of aqueous extract of three cultivars of *Musa sapientum* fruit peel on polarxamer-407 induced hyperlipidemic wistar rats. *Pharmacology and Science Research*, 2014. 5: p.1046-1051.
13. Fatemah, S. R., Saifullah, R., Abbas, F. M. A. and Azhar, M. E., Total phenolic and antioxidant activity of banana pulp and peel flours: Influence of variety and stage of ripeness. *International Food Research*, 2012. 19(3): p.1041-1046.
14. Priyanga, S., et al., Acute toxicity assessment of ethanolic leaf extract of *Macrotyloma uniflorum* L. on wistar albino rats. *Toxicology International Formerly Indian*, 2017. 24(1): p. 22.
15. Mostafa, Ashraf A., et al., Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Biological Sciences*, 2018. 25(1): p. 361-366.
16. Rattanavichi, W. and Cheng, W., Effects of hot-water extract of banana (*Musa acuminata*) fruit's peel on the antibacterial activity, and anti-hypothermal stress, immune responses and disease resistance of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium resenbegii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014. 39(1); p.326-335.
17. Mokbel, M. S., and Hashinaga, F., Antibacterial and antioxidant activities of banana (*Musa*, AAA cv. Cavendish) fruits peel. *American journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2005. 1(3): p.125-131.

Mohammed S. Effects and Quantity Ranges Of Some Auxins On Embryogenic Callus Induction From Upland Rice Cultivars: An Overview. International Journal of Life Sciences and Biotechnology. 2020. 3(2): p. 197-204. DOI: <https://doi.org/10.38001/ijlsb.669914>

## Effects and Quantity Ranges Of Some Auxins On Embryogenic Callus Induction From Upland Rice Cultivars: An Overview

Sulaiman Mohammed<sup>1\*</sup> 

### ABSTRACT

Embryogenic callus induction from indica rice sub-species, upland cultivars has remain a challenging task, but plant growth regulators (PGRs) have been found to play a vital role in enhancing the production. Hence, solving this tricky problem and achieving optimum embryogenic callus induction from this special type of rice is a welcome development as a food security concern, while proper examination of the appropriate PGRs is the only solution. Here we reviewed on two auxins-PGRs that promote the embryogenic callus induction from upland rice, viz., 2,4-D and NAA with their recommendable quantity ranges. 2,4-D and NAA were the most commonly employed and discovered best growth hormones in PTC irrespective of explant in all cereal plants. They are found the most suitable hormones and positively upgrade the production of reproducible callus. Classical analyses implies that medium supplemented with such PGRs provides necessities for quality callus from upland rice. Evidences indicated that callus induction or somatic embryogenesis from matured seeds of upland rice is persuade by 2,4-D between 1.0 – 2.5 mg/L concentrations. Whereas for NAA, to obtain its desired effects on upland rice callus induction it must be fortified in concentrations ranging from 0.5 mg/L to 10 mg/L. But convincingly, 0.5 – 5.0 mg/L NAA with other PGR like 2,4-D would be more proper. Hence, extensive studies of these hormones and others will provide insights on their potentialities to embryogenic callus induction and probably identify more of their roles in PTC analysis.

### ARTICLE HISTORY

Received

03 January 2020

Accepted

22 April 2020

### KEYWORDS

Upland rice, callus induction, PGRs, 2,4-D, NAA, Auxin

## Introduction

Rice or its botanical name *Oryza sativa* L. is divided into three sub-species which includes indica, japonica and javonica [1]. Indica sub-species, precisely upland, is planted and grown in dry-land, rain-feeding or short irrigation condition [2]. Farming of these rice varieties may lessen the laborious irrigation, save plenty of water and probably reduce water pollution. Upland rice is a special rice type which comprises almost 80% of the world cultivated rice and found in many Asian nations [2-5]. For example, Malaysia has diverse number of upland rice cultivars [6], mostly cultivated in Sabah and Sarawak [7].

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Gombe State University, PMB 0127 Gombe, Nigeria.

\*Corresponding author email: [sumulsu@yahoo.com](mailto:sumulsu@yahoo.com)

Regarding all these advantages over wetland rice varieties, upland rice contributes only 12% of global rice production [2, 3].

Evidences exist to show that upland rice has the potential to be explored as alternative compared to wetland rice [2]. Whereas, research on upland rice improvement has gained little attention because of its unstable grain yield which occurred due to poor agronomy management practices and lack of application of suitable nutrient as described by Musa, Azemi [8]. Thus, to increase the production of this rice species; callus induction and regeneration (biotechnology approach) through plant tissue culture (PTC) as well as genetically (molecular approach) improve the cultivars via biotransformation are the alternative solutions to this peculiar problem. PTC or plant micro-propagation describe the aseptic culture of explant under control physical and chemical condition in vitro [9, 10]. It is considered the best approach for demonstrating the plant cells totipotency and its utilization for various practical solicitations [11]. Also, the case is not different in *Oryza sativa* L. as earlier discovered by Koetje, Grimes [12], Croughan and Chu [13] and Oinam and Kothari [14].

In plant tissue culture (PTC), the explant can either be mature or immature seeds, leaves, buds, node or tips of root [15]. The explant callus induction, growth and development and morphogenic response in tissue culture depends on genotype, explant type, environment, culture medium and plant growth regulators (PGRs). According to Khanna and Raina [16], Oza-wa, Ling [17] Gairi and Rashid [18], Karthikeyan, Pandian [19], Meneses, Flores [20], [Bho-jwani and Dantu [11], 21], embryogenic callus induction massively rely on PGRs, medium composition (as they can be easily manipulated) along with explant genotype and culture environment. Interestingly, media supplemented with PGRs provides necessities for quality and reproducible calli [22]. Embryogenic calli production is the prerequisite for achievable regeneration and remain problematic in indica subspecies such as upland rice. However, proper examination of the appropriate medium and its supporting supplement(s) that may induce qualitative and quantitative embryogenic calli is significant. Reports have indicated that optimizing the culture media for indica culture using PGRs, precisely auxins have yielded a recommendable outcome [3, 23-28]. Therefore, the aim of this review is to provide an insight overview of two most commonly used auxins namely; 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and Naphthaleneacetic acid (NAA) and their recommendable quantity ranges that make embryogenic callus from



upland rice cultivars.

## **Plant Growth Regulators (PGR) and Their Classification**

As far as PTC is concerned, the important point is that, due to the plasticity and totipotency of the explant [29, 30]. Precise media manipulations can be practice to direct embryogenic callus development in culture. Manipulation or optimization of medium are either from carbon source, amino acids basis, vitamin or growth regulators [31]. Reports have shown that phytohormones (PGRs) are the critical constituents for determining the target callus in addition to the developmental pathway of the plant cells [32].

effects of hormones (PGRs) have been widely investigated in tissue culture technology. They are widely considered as essential parameter(s) in determining the success of embryogenic callus induction [33]. Trejo-Tapia, Amaya [34] communicated that, combinations of hormone type and its various concentration can greatly promote the morphogenetic development leading to calluses production. The employed PGRs in plant tissue culture analysis are classified into five (5) main classes, they include; Auxins, Cytokinins, Gibberellins, Abscisic acid and Ethylene.

The first four class of PGRs mentioned above are used so open, whereas the first two are mostly fortified in upland rice analysis. According to Skoog and Miller [35], auxin and cytokinin ration determine the type and extent of organogenesis in plant cell cultures. Nevertheless, pieces of reports described the vitality of auxins as a constituent in upland rice culture and dedifferentiation processes in in vitro cultures. The most commonly used auxins in upland rice culture are the synthetic analogues, viz, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and Naphthaleneacetic acid (NAA). Therefore, in order to obtain embryogenic callus from upland rice specimen, auxin(s) hormones should be added into the medium. Although their rations required are not universally same. Bhaskaran and Smith [36] reported that there is erraticism on the quantity ratio of such hormones required for callus induction among genera, species, sub-species and cultivars.

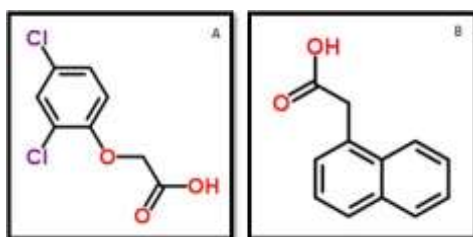
### **2,4-Dichlorophenoxyacetic acid**

In monocotyledonous plants, the use of auxins as growth regulator or promoters of cell indifferentiation is absolutely possible. These enhances induction of indirect somatic embryogenesis as reconfirmed by Meneses, Flores [20], Karthikeyan, Pandian [19], [31]. Auxins have significant effect by inducing embryogenic competence on the scutellar

cells of rice seeds, leaves and other organs. Rice cultivar's genotypic difference shows diversification in their specificity towards response to auxins concentration [18, 37]. Among the various auxins, 2,4-D is the best regulator discovered so far. 2,4-D is the most employed in tissue analysis irrespective of explant in all cereal species. This synthetic auxin provides a desirable and efficient embryogenic calli when supplemented in upland rice tissue culture regardless of the medium type. 2,4-D has chemical formulae  $C_8H_6Cl_2O_3$  and schematic diagram as shown in figure 1.

Zhu, Sun [38] revealed on the suitability of 2,4-D on embryogenic callus induction. Others have recommended 2,4-D as an in vitro plant regulator for development of callus in upland rice culture and hence always employed in medium either; singly, in combination with other auxins or cytokinin [33]. Endress and Endress [39] reported that, 2,4-D generate DNA hypermethylation which uphold cells in active mitotic stage and therefore, in favour of embryonic phase.

Previous reports indicated that embryogenic calli production from indica sub-species face a major set-back due to its low tissue response [24, 40]. But recent evidences demonstrated that callus induction or indirect somatic embryogenesis from matured seeds of upland rice is persuade by 2,4-D at different concentrations [31]. Thus, the concentration of the hormone used, the culture period and sub-culture time control the responses and virtually reversion of embryos-to plants. However, distinct 2,4-D responses has been observed as a functional enhancer of callus production from upland genotype; since they are characterized for having difficulties in tissue responsive [2-4, 20, 24]. The use of 2,4-D in high concentration is necessary in some upland varieties as they provide positive responses towards embryogenic calluses production, but simultaneously they exert an inhibitory effect on plant regeneration because the hormone residues remain within the embryo cells.



**Fig 1** Schematic representation of (A) 2,4-D and (B) NAA growth regulator

Shahsavari, Maheran [2] discovered that using 2,4-D alone at 2 mg/L gave the earliest and optimum callus induction (84%). This is consistent with other earlier reports that higher callus induction were observed using 2 mg/L 2,4-D [41]. The highest percentage of callus induction (85%) were obtained on media containing 5 mg/L 2,4-D [42]. In another report by Shahsavari [43] reveal that 2 mg/L 2,4-D in combination with other hormones gave up to 95% callus induction frequency. This concentration is almost the same with that of Ahmad, Johan

[4] and Karthikeyan, Pandian [19] whose reported that 2.5 mg/L 2,4-D gave optimal induction in Malaysian upland rice. Evenly, 2.5 mg/L 2,4-D plus NAA fortified in another Malaysian upland rice culture, optimum induction were achieved [44]. Also, 3 mg/L 2,4-D was reported and optimal callus induction (90%) was obtained [5]. Conclusively, many reports recommended the use of 1.0 – 2.5 mg/L 2,4-D for callus induction from upland rice tissue [18, 19, 33].

#### **$\alpha$ -Naphthalene-acetic acid**

NAA is another essential synthetic auxin hormone that is routinely used for the vegetative propagation of plants. It is widely used in agriculture for various purposes and for tissue culture research [2, 24]. NAA is an organic compound with the formula  $C_{10}H_7CH_2CO_2H$  [schematic diagram (fig. 1b)] and auxin family that prevents premature dropping and thinning of fruits from stems. NAA has been shown to greatly increase cellulose fiber formation in plants when paired with another phytohormone called gibberellic acid. This plant regulator plays a role in both embryogenic callus production and regeneration from upland cultivars as communicated by Aananthi, Anandakumar [45] and Din, Ahmad [5]. The effect of NAA on callus growth is greatly reliant on the time of applying and its concentration. The hormone is only slightly toxic when applied at higher concentration. Thus, this is to understand that increased amounts of NAA can actually have negative effects, however, cause growth inhibition to the development of crops such as rice.

For plant growth, NAA is used after 4-weeks to stimulates shoot growth, while full-time use limits the plant growth. When used in 4-week pulse, adventitious root growth is greatly increased. In micropropagation NAA is typically added to a media containing essential nutrients for explant survival. It is added to help induce embryogenic callus induction [26, 43], shoot and root development [24, 33, 45].

For NAA to obtain its desired effects in upland rice callus induction, it must be fortified in concentrations ranging from 0.5 mg/L to 10 mg/L as recommended by Zuraida, Naziah [26]. Many have used the concentration between 0.5-5.0 mg/L, but so far it is only Zuraida, Naziah [26] and Zuraida, Zulkifli [42] that obtained maximum callus production from upland rice at 10 mg/L of NAA. Whereas, high concentration may lead to optimum induction from upland rice, nonetheless depend on genotype. Going by all the practiced concentrations, 10 mg/L was the highest used for upland rice callus induction which may affect the quality of the callus or even shoot. As earlier discussed, NAA at high concentration is toxic, therefore the use of maximum concentration (10 mg/L) may be problematic to crop quality. As less as 1 mg/L can make optimum callus from upland rice (Malaysian cultivar) [44]. Also 3 mg/L proved to be beneficial for callus induction [46], but all depend on the genotype. Using a slightly high concentration around 5 mg/L as described by Shahsavari [43] is also appropriate. Convincingly, supplementing 0.5 – 5.0 mg/L NAA with other PGR like 2,4-D for callus induction from upland rice it would be more proper.

## **Conclusion**

Embryogenic callus induction is the prerequisite for micropropagation, regeneration and genetic transformation. Achieving optimum embryogenic callus induction from upland rice cultivars is a welcome development as a food security concern. 2,4-D and NAA were found the most useful auxin growth hormones and positively upgrade the production of reproducible callus. There is a need for appropriate utilization of these PGRs at a certain range of concentration. Usually, tissue culture of upland rice without any of the reviewed hormones yields no embryogenic callus. Therefore, this review achieved the aim of providing useful information on such auxins (2,4-D and NAA) and their concentration range that would yield maximum embryogenic callus from upland rice. However, extensive studies of these plant regulators will provide more significant insights to their potential in callus induction and identify more of their roles in PTC analysis.

## **References**

1. Karthikeyan, A., S.K. Pandian, and M. Ramesh, Agrobacterium-mediated transformation of leaf base derived callus tissues of popular indica rice (*Oryza sativa* L. sub sp.indica cv. ADT 43). *Plant science*, 2011. 181(3): p. 258-268.

2. Shahsavari, E., et al., The effect of plant growth regulators on optimization of tissue culture system in Malaysian upland rice. *African Journal of Biotechnology*, 2010. 9(14): p. 2089-2094.
3. Shahsavari, E., Evaluation and optimizations of media on the tissue culture system of upland rice. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2010. 12(4): p. 537-540.
4. Ahmad, F.I., N.S. Johan, and A. Wagiran, Effect of 2, 4-D on Embryogenic Callus Induction of Malaysian indica Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars MR123 and MR127. *Jurnal Teknologi*, 2013. 64(2).
5. Din, A.R.J.M., et al., Improvement of efficient in vitro regeneration potential of mature callus induced from Malaysian upland rice seed (*Oryza sativa* cv. Panderas). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016. 23(1): p. S69-S77.
6. Sohrabi, M., et al., Genetic diversity of upland rice germplasm in Malaysia based on quantitative traits. *The scientific world journal*, 2012. 2012.
6. Sohrabi, M., et al., Genetic divergence of Malaysian upland rices revealed by microsatellite markers. 2013.
7. Musa, M.H., et al., Upland rice varieties in Malaysia: agronomic and soil physicochemical characteristics. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 2009. 32(3): p. 225-246.
8. Thorpe, T.A., History of plant cell culture. *Plant tissue culture: Techniques and Experiments*, 2013: p. 1.
9. Stasolla, C. and T. Thorpe, Tissue culture: historical perspectives and applications. *Applications of plant biotechnology: in vitro propagation, plant transformations and secondary metabolite production*. IK International, India, 2010: p. 1-39.
10. Bhojwani, S.S. and P.K. Dantu, *Plant tissue culture: an introductory text*. 2013: Springer.
11. Koetje, D.S., et al., Regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.) from primary callus derived from immature embryos. *Journal of plant physiology*, 1989. 135(2): p. 184-190.
12. Croughan, T. and Q.-R. Chu, Rice (*Oryza sativa* L.): Establishment of callus cultures and the regeneration of plants, in *Rice*. 1991, Springer. p. 19-37.
13. Oinam, G. and S. Kothari, Totipotency of coleoptile tissue in indica rice (*Oryza sativa* L. cv. CH 1039). *Plant cell reports*, 1995. 14(4): p. 245-248.
14. Ullah, H., et al., Tissue culture techniques for callus induction in rice. *Sarhad Journal of Agriculture*, 2007. 23(1): p. 81.
15. Khanna, H.K. and S.K. Raina, Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998. 52(3): p. 145-153.
16. Ozawa, K., D.-H. Ling, and A. Komamine, High-frequency somatic embryogenesis from small suspension-cultured clusters of cells of an interspecific hybrid of *Oryza*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 1996. 46(2): p. 157-159.
17. Gairi, A. and A. Rashid, TDZ-induced somatic embryogenesis in non-responsive caryopses of rice using a short treatment with 2, 4-D. *Plant cell, tissue and organ culture*, 2004. 76(1): p. 29-33.
18. Karthikeyan, A., S.T.K. Pandian, and M. Ramesh, High frequency plant regeneration from embryogenic callus of a popular indica rice (*Oryza sativa* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2009. 15(4): p. 371-375.
19. Meneses, A., et al., Effect of 2, 4-D, hydric stress and light on indica rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 2005. 53(3-4): p. 361-368.
20. Kaya, Y. and S. Karakütük, Effects of different growth regulators on regeneration of Turkish upland rice. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 2018. 33(3): p. 226-231.
21. Ozawa, K., Establishment of a high efficiency Agrobacterium-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 2009. 176(4): p. 522-527.
22. Lin, Y. and Q. Zhang, Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. *Plant cell reports*, 2005. 23(8): p. 540-547.

23. Sahoo, K.K., et al., An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. *Plant Methods*, 2011. 7(1): p. 49.
24. Khalequzzaman, M., et al., Regeneration efficiency and genotypic effect of 15 Indica type Bangladeshi rice (*Oryza sativa* L.) landraces. *Plant Tissue Cult*, 2005. 15(1): p. 33-42.
25. Zuraida, A., et al., Efficient plant regeneration of Malaysian indica rice MR 219 and 232 via somatic embryogenesis system. *Acta physiologiae plantarum*, 2011. 33(5): p. 1913-1921.
26. Zaidi, M., et al., Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. *Agron Res*, 2006. 4(2): p. 563-575.
27. Yin Xia, Z. and S. Te-chato, Callus induction and plantlet regeneration from mature
28. embryos of indica rice (*Oryza Sativa* L.) cultivar Kra Dang Ngah. *Journal of Agricultural Technology*, 2012. 8(7): p. 2423-2433.
29. Joyce, S.M., A.C. Cassells, and S.M. Jain, Stress and aberrant phenotypes in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003. 74(2): p. 103-121.
30. Birnbaum, K.D. and A.S. Alvarado, Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell*, 2008. 132(4): p. 697-710.
31. Mohammed, S., A.A. Samad, and Z. Rahmat, Comparison of Embryogenic Callus Induction from Two Malaysian Upland Rice Seed (Cv. Hitam and Wai). *Advanced Science Letters*, 2018. 24(5): p. 3668-3672.
32. George, E.F., M.A. Hall, and G.-J. De Klerk, The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients. 2008: Springer.
33. Kaushal, L., et al., Auxin to improve green plant regeneration of rice anther culture. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 2015. 8(1): p. 15.
34. Trejo-Tapia, G., et al., The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. *Plant cell, tissue and organ culture*, 2002. 71(1): p. 41-46.
35. Skoog, F. and C. Miller. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured. 1957. *In vitro. Symp. Soc. Exp. Biol.*, v. 11, p. 118-131.
36. Bhaskaran, S. and R.H. Smith, Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science*, 1990. 30(6): p. 1328-1337.
37. Rueb, S., et al., Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1994. 36(2): p. 259-264.
38. Zhu, D., et al., Use of anther culture in hybrid rice breeding. *Advances in hybrid rice technology*. Manila: IRRI, 1998: p. 265-281.
39. Endress, R. and R. Endress, *Plant cell biotechnology*. 1994: Springer.
40. Tang, K., et al., A simple and efficient procedure to improve plant regeneration from protoplasts isolated from long-term cell-suspension cultures of indica rice. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2000. 36(5): p. 362-365.
41. Tyagi, H., S. Rajasubramaniam, and I. Dasgupta, Regeneration and Agrobacterium mediated transformation of a popular indica rice variety, ADT39. *Current Science*, 2007. 93(5): p. 678-683.
42. Zuraida, A., et al., Regeneration of Malaysian Rice variety MR219 via somatic embryogenesis. *J. Trop. Agric. And Fd. Sc*, 2012. 39(2): p. 167-177.
43. Shahsavari, E., Evaluation and optimizations of media on the tissue culture system of upland rice. *Int. J. Agric. Biol*, 2010. 12(4): p. 537-540.
44. Makerly, H., Z. Rahmat, and A. Wagiran, Potential Use of Partial Desiccation Treatment for Regeneration System of Malaysian Indica Rice (*O. Sativa* L.). *Jurnal Teknologi*, 2012. 59(1).
45. Aananthi, N., et al., Regeneration study of some indica rice cultivars followed by Agrobacterium-mediated transformation of highly regenerable cultivar, Pusa Basmati *Electronic Journal of Plant Breeding*, 2010. 1(4): p. 1249-1256.
46. Ge, X., et al., A tissue culture system for different germplasms of indica rice. *Plant Cell Rep*, 2006. 25(5): p. 392-402.

## Bitkilerde Aktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Ali Doğru<sup>1\*</sup> 

### ÖZET

Aerobik organizmalar için oksijen vazgeçilmez bir moleküldür. Biyotik ve abiyotik stres faktörleri altında bitkilerde elektron taşınımı ile ilgili reaksiyonlar aktif oksijen türlerinin oluşum hızını artırır. Bu reaksiyonlarda elektronlar stres faktörlerinin etkisiyle asıl hedef molekül yerine oksijene verilir. Bu şekilde başlayan zincirleme reaksiyonlar bitki dokularında süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi aktif oksijen türlerinin birikim göstermeye başlamasına yol açar. Antioksidant sistemin yeterince aktive edilememesi durumunda oldukça reaktif olan aktif oksijen türleri hücrel bileşenlere zarar vermeye başlar. Bu olay oksidatif stres olarak bilinir. Aktif oksijen türleri bitki hücrelerindeki birçok organelde oluşabilir. Kloroplastlar bitki hücrelerinde aktif oksijen türlerini oluşturma kapasitesi bakımından en aktif organellerdir. Bunun dışında mitokondriler, peroksizomlar, endoplazmik retikulum gibi organellerle apoplastik bölgede de aktif oksijen oluşumu gözlenir. Stres koşulları altında sekonder bir stres olarak ortaya çıkan oksidatif stres tarımsal verimliliği tehdit eden en önemli faktör olarak kabul edilmektedir. Bu derlemede bitki hücrelerinde aktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olan metabolik olaylar, bu bileşiklerin kimyasal özellikleri ve oksidatif hasar oluşturma mekanizmaları tartışılmıştır.

### MAKALE GEÇMİŞİ

**Geliş**  
20 Şubat 2020  
**Kabul**  
10 Mayıs 2020

### ANAHTAR KELİMELER

Aktif oksijen türleri,  
bitki,  
oksidatif stres

## Active Oxygen Species and Oxidative Stress in Plants

### ABSTRACT

Oxygen has been an indispensable molecule for aerobic organisms. The reactions related to electron transport in plants under biotic and abiotic stress factors may cause acceleration of the formation rate of active oxygen species. In these reactions, electrons are delivered to the oxygen instead of main target molecule as the result of stressful conditions. Thus, a chain reaction starts and this leads to the accumulation of the active oxygen species in plant tissues, such as superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. In the case of lower antioxidant activity, active oxygen species begin to be harmful to cell components, which is known as oxidative stress. Active oxygen species may be produced in several cell compartments in plant cells. Chloroplasts, for example, are known to have the highest potential to produce active oxygen species in plant cells. In addition, mitochondria, peroxisomes, endoplasmic reticulum and apoplast are included in the formation of active oxygen species in plants. Oxidative stress, which appears secondary stress under stressful conditions, has been accepted as the most serious threat for agricultural productivity. In this review, metabolic reactions leading to the formation of active oxygen species in plants, the chemistry of these reactive compounds and their mechanism to produce oxidative stress are discussed.

### ARTICLE HISTORY

**Received**  
20 February 2020  
**Accepted**  
10 May 2020

### KEY WORDS

Active oxygen species,  
plant,  
oxidative stress

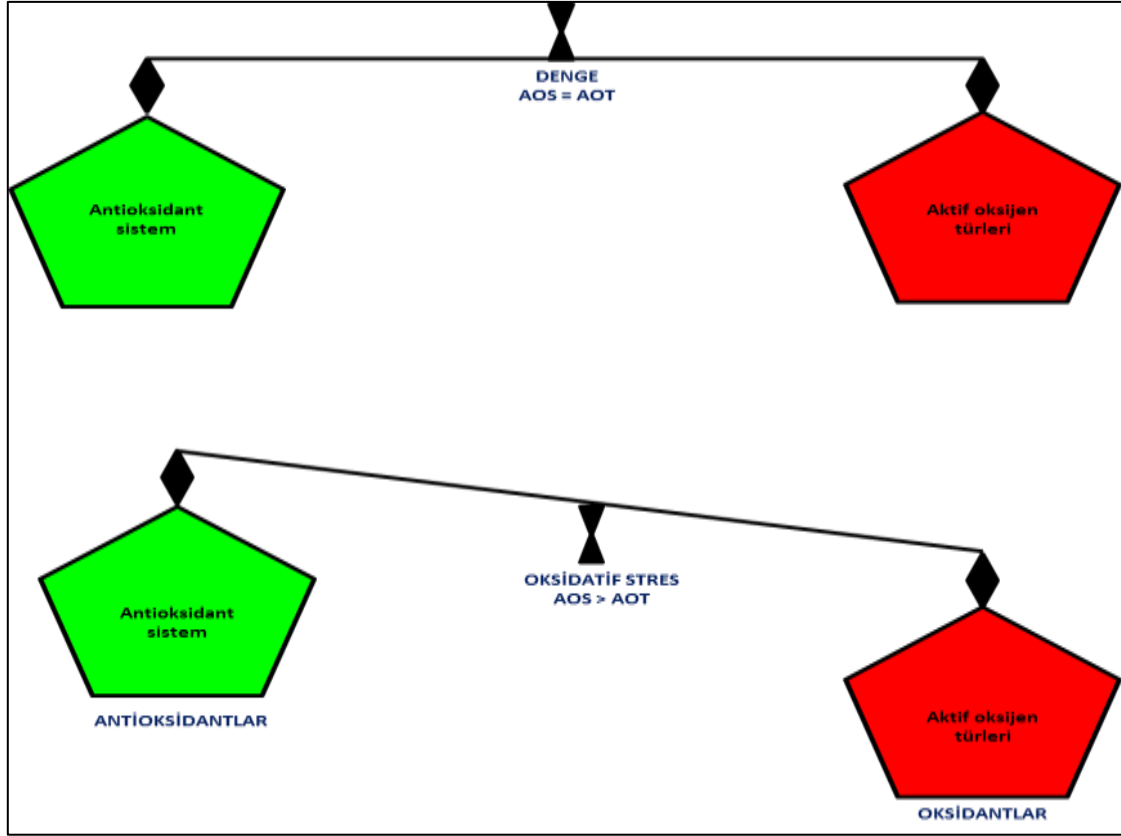
<sup>1</sup> Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Esentepe Kampüsü, 54187, Sakarya

## Giriş

Diğer aerobik organizmalar gibi bitkiler de etkili bir şekilde enerji üretebilmek için oksijene ihtiyaç duymaktadırlar. Moleküler oksijen ( $O_2$ ) ilk olarak yaklaşık 2,7 milyar yıl önce fotosentetik organizmalardaki oksijen evolüsyonu reaksiyonu sonucu oluşmuş ve aktif oksijen türleri (AOT) aerobik yaşamın bir parçası haline gelmiştir [1]. Ancak oksijenin varlığı hücrel yapıların ve reaksiyonların sürekli oksidatif bir tehdit altında olmasına yol açmaktadır [2]. Bitki hücrelerinde oksijenin suya tam olarak indirgenmesi; gerekli enerjinin açığa çıkmasını sağlarken, oksijenin tam olarak indirgenememesi ise oldukça reaktif olan ve DNA, proteinler ve lipidler gibi birçok makromoleküle zarar veren AOT'lerin oluşumuna neden olmaktadır [3]. AOT'lerin hücrel yapılarda hasar oluşturması ise "oksidatif stres" olarak tanımlanmaktadır. Kloroplast ve mitokondrilerdeki redoks reaksiyonları sırasında, bazı stres faktörleri nedeniyle elektronların asıl alıcı molekül yerine moleküler oksijene verilmesi sonucu AOT'ler oluşmaya başlar. Ağır metaller, kuraklık, yüksek ve düşük sıcaklık, mekanik yaralanma, ultraviyole (UV) ışık, fotoinhibisyona yol açan yüksek ışık yoğunluğu, patojen enfeksiyonu ve hava kirliliği gibi stres faktörlerinin de AOT oluşumuna ve oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir [4,5]. Bu durumda oksidatif stres, bitkilerde biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin etkisiyle ortaya çıkan sekonder bir stres olarak nitelendirilebilir.

AOT'ler peroksizomlar, kloroplastlar ve mitokondri gibi farklı hücrel organellerde lokalize olan metabolik reaksiyonlar sırasında ara ürün olarak da meydana gelebilir [6,7]. Gelişmiş bitkilerde fotosentez olayı; oldukça iyi organize olmuş tilakoid membranlara sahip olan kloroplastlarda meydana gelen bir olaydır. Tilakoid membranlar optimum ışık absorpsiyonu için gerekli yapısal özelliklere ve bileşenlere sahiptir. Fotosentez boyunca kloroplastlarda oluşan oksijen, elektron taşınım reaksiyonlarından gelen elektronları alarak süperoksit radikalini ( $O_2^{\cdot-}$ ) oluşturabilir. Normal koşullar altında AOT'ler çeşitli antioksidant savunma mekanizmaları ile detoksifiye edilir [8]. Ancak tuzluluk, UV radyasyonu, kuraklık, ağır metaller, aşırı yüksek ve düşük sıcaklıklar, besin eksikliği, hava kirliliği, herbisitler ve patojen saldırıları gibi biyotik ve abiyotik stres faktörleri, AOT'lerin oluşum ve detoksifikasyon hızı arasındaki dengeyi bozabilir. Bu da hücrel yapılarda hasarlara neden olan AOT'lerin hücre içindeki miktarının hızla artmasına yol açar (Şekil 1) [9].





**Şekil 1** AOS (antioksidant sistem) ve AOT (aktif oksijen türleri) arasındaki denge [13]

$O_2^-$  radikali çeşitli reaksiyonlar sonucunda hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikali ( $OH^-$ ) ve diğer AOT'lerin oluşmasına yol açar.  $O_2^-$  radikali,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$  (singlet oksijen),  $HO_2^-$  (perhidroksi radikali) ve  $OH^-$  radikali gibi AOT'ler oldukça reaktiftir ve toksik etkilere sahiptir. Farklı çevresel stres faktörlerinin etkisiyle bitki dokularında meydana gelen AOT'ler ürün kayıplarının temel sebebidir [10-12]. AOT'ler nükleik asitlerde hasar oluşturarak, proteinleri okside ederek ve lipid peroksidasyonuna neden olarak birçok hücre fonksiyonunda bozulmalara neden olur [8].

Bitkilerde, AOT'lerin toksik etkilerinden korunmak için etkili bir antioksidant savunma sistemi bulunmaktadır. Bu sistemin enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenleri AOT'lerin oluşumunu engelleyerek ya da oluşuktan sonra AOT'leri detoksifiye ederek hücre yapılarının oksidatif stres hasarlarından korunmasını sağlar.

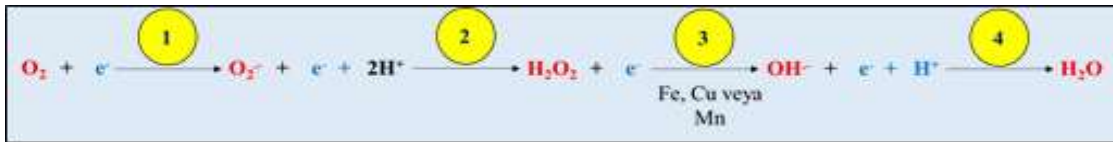
Bu derlemede çeşitli AOT'lerin oluşum reaksiyonları ve lokasyonları, AOT'lerin bitki hücrelerinde meydana getirdikleri hasarlar tartışılmıştır.

## Okside Edici Bileşiklerin Kimyası

Oksijen yer kabuğunda en yaygın olarak bulunan elementtir [14]. Aynı zamanda suyun kütle olarak %89'unu oluşturduğundan canlı organizmalarda da kütle bazında en fazla miktarda bulunan elementtir [15]. Oksitleme yeteneği bakımından ise flordan sonra ikinci sırada bulunmaktadır [16,17]. Atmosferde bulunan oksijenin temel formu  $O_2$ 'dir. Bu molekülün paylaşılmamış iki elektronu vardır ve bu elektronların paralel spinli olmasından dolayı temel durumdaki oksijen ( $O_2$ ) düşük bir reaktiviteye sahiptir. Bu olaya "spin kısıtlaması" adı verilir. Yani  $O_2$  kimyasal olarak çok fazla aktif olmadığı gibi aynı zamanda aerobik organizmalar için toksik de değildir. Yüksek bir reaktiviteye sahip olması için  $O_2$ 'ye spin kısıtlamasını ortadan kaldıracak bir enerji girişinin gerçekleşmesi gerekir. Bu enerji birçok kimyasal ve biyokimyasal reaksiyondan, elektron taşınım reaksiyonlarından, UV ve iyonize radyasyondan sağlanabilir. Biyolojik sistemlerde bulunan birçok AOT arasında  $^1O_2$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  ve nitrik oksit ( $NO^-$ ) oksidatif stresi indükleyen en önemli AOT'lerdir [11]. Bunun dışında peroksil, alkoksil ve hidroperoksil radikalleri ile peroksinitrit, ozon ve hipoklorik asit de diğer önemli AOT'lerdendir.

## Moleküler Oksijenin İndirgenmesi ve Aktivasyonu

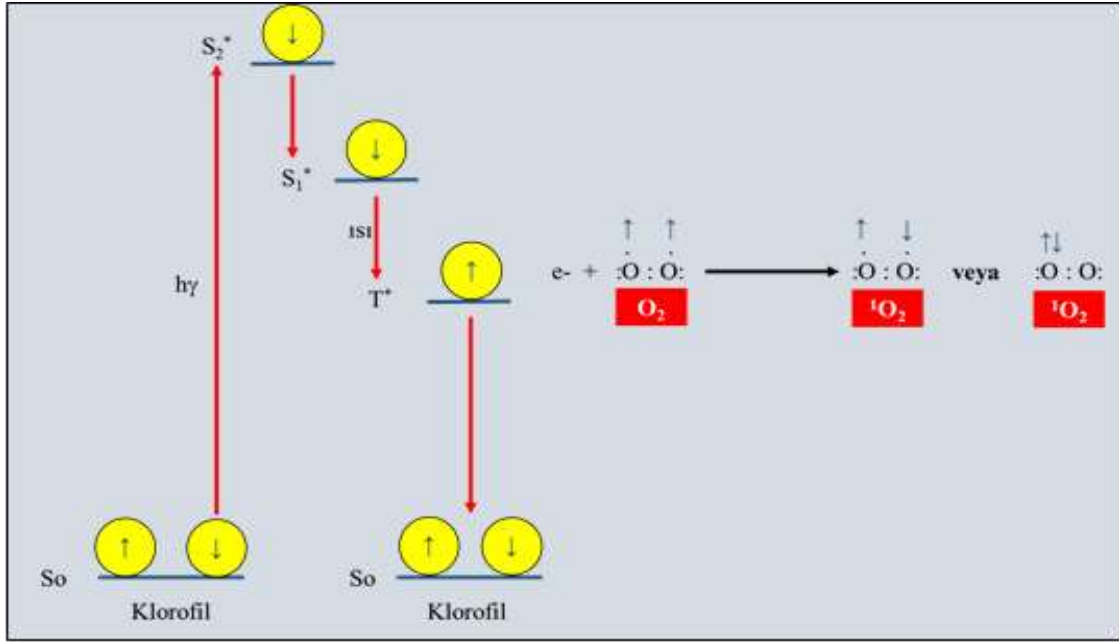
Moleküler oksijenin indirgenmesi, birbirini takip eden, her basamakta tek bir elektronun oksijen tarafından alınmasını ve farklı AOT'lerin oluşumunu sağlayan dört aşamadan ibarettir. Bu olaya "monovalent redüksiyon" adı verilir [18,3,19]. Monovalent oksijen redüksiyonu yoluyla oluşan çeşitli AOT'ler şekil 2' de görülmektedir. Bu reaksiyon zincirinin ilk basamağı enerji gerektirmektedir. Ancak diğer basamakları ekzotermik özelliğe sahiptir ve bu nedenle kendiliğinden veya kataliz yoluyla gerçekleşebilmektedir [20].



Şekil 2 Monovalent oksijen redüksiyonu sonucunda meydana gelen AOT' ler [21]

Oksijenin aktivasyonu, klorofil molekülünün uyarılması (eksitasyonu) aracılığıyla ışığa bağımlı reaksiyonlarla da sağlanabilmektedir [22]. Bu reaksiyonda ışık enerjisinin absorblanması ile klorofil molekülündeki bir elektron temel durumundan ( $Kl_0$ ,  $S_0$ ), yüksek enerjili bir duruma ( $Kl_0^*$ ,  $S_2$ ) fırlatılmaktadır. Klorofil molekülü çok kısa bir süre

içerisinde bu elektronunun enerjisinin bir kısmını kaybederek daha düşük enerjili bir duruma (S1) ve daha sonra yine enerji kaybı ile triplet (T\*) duruma geçmektedir. S1 durumundan triplet durumuna dönüşüm sırasında, klorofil molekülünün uyarılmış elektronunun spini de değişmektedir. Enerjinin triplet klorofil molekülünden temel durumdaki oksijene transferi ile klorofil molekülü temel durumuna dönerken; bu kez de temel durumdaki oksijenin elektronlarından birinin spini değişmekte ve sonuçta  $^1\text{O}_2$  (singlet oksijen) oluşmaktadır [23]. Şekil 3'te singlet oksijenin oluşum mekanizması görülmektedir.



**Şekil 3** Moleküler oksijen ( $\text{O}_2$ ) ile triplet klorofilin ( $\text{T}^*$ ) etkileşimi sonucu singlet oksijenin ( $^1\text{O}_2$ ) oluşumu [21]

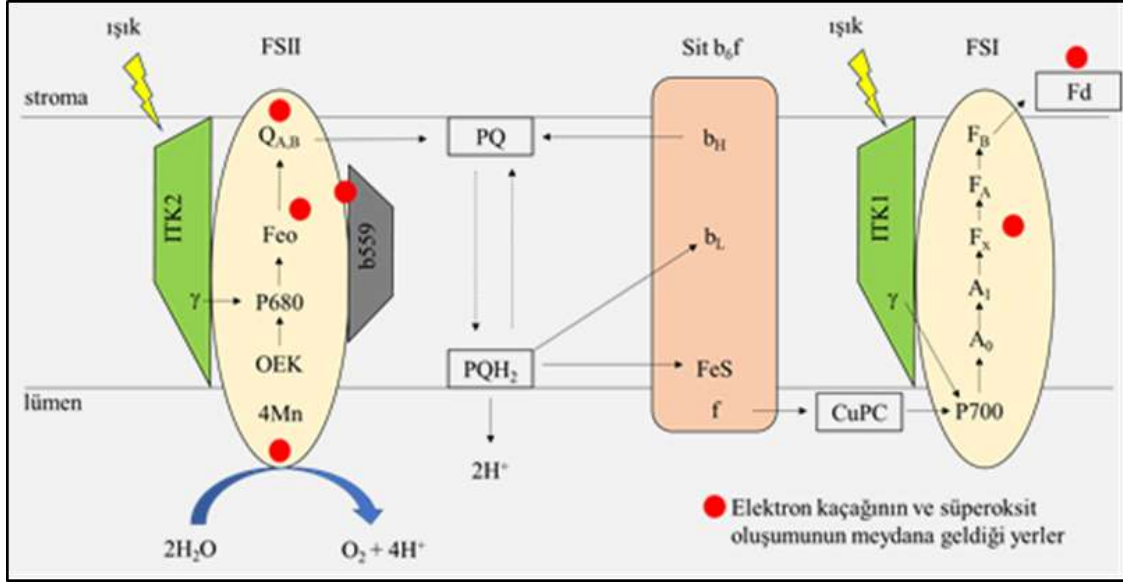
## Bitkilerdeki Aktif Oksijen Türleri

### Süperoksit radikali ( $\text{O}_2^-$ )

Temel durumdaki oksijen ( $\text{O}_2$ ) bir elektron alarak spin kısıtlama özelliğini kaybedebilir. Bu elektron bitki hücrelerindeki elektron taşınım reaksiyonları veya nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon sırasında gerçek hedefine ulaştırılmayan bir elektrondur. Oksijenin bu şekilde bir elektron alması ile süperoksit radikali veya süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^-$ ) oluşur. Süperoksit radikalının yarı ömrü 1-1000  $\mu\text{s}$  arasındadır ve oluştuğu yerden difüzyonla ancak birkaç  $\mu\text{m}$ 'lik mesafeyi kat edebilir [24].

Süperoksit radikali birçok reaksiyona katılabilir ancak öncelikle bir  $H^+$  olarak hidroperoksit radikalinin ( $HO_2^-$ ) oluşumuna neden olur. Bu bileşik süperoksit radikaline göre hem daha reaktif hem de daha stabil bir yapıya sahiptir ve biyolojik membranları geçebilir. İki molekül hidroperoksitin reaksiyona girmesi ile  $O_2$  ve  $H_2O_2$  meydana gelir. Bu reaksiyona “süperoksit dismutasyonu” adı verilir. Yani dismutasyon reaksiyonu sonucunda aynı maddeden yapısal olarak iki farklı ürün meydana gelir. Süperoksit radikali biyolojik makromoleküllerde kimyasal bir değişime yol açmaz ancak oksidatif stresin ana kaynağı olarak kabul edilir. Aynı zamanda diğer AOT’leri indirgeyerek daha kuvvetli oksitleyici moleküllerin oluşumuna yol açar [25]. Süperoksit radikali  $Fe^{+3}$  ve  $Cu^{+2}$  iyonlarını  $Fe^{+2}$  ve  $Cu^+$  formuna indirgeyebilir. Oluşan indirgenmiş demir ve bakır iyonları da  $H_2O_2$  ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturabilir. Hidroksil radikali de neredeyse bütün makromoleküllerde yapısal değişimlere neden olduğu için oksidatif stres için merkezi bir role sahiptir. Ayrıca süperoksit ve hidroperoksit radikalleri nitrik oksitle reaksiyona girerek aşırı derecede reaktif olan peroksinitrit ve alkil peroksinitrit radikallerini oluşturabilir.

Bitki hücrelerinde oluşan süperoksit radikallerinin temel kaynağının kloroplast ve mitokondrilerdeki elektron taşınım sistemlerindeki elektron kaçakları olduğuna inanılmaktadır [26-30]. Elektron taşınım sistemlerindeki elektronların yaklaşık %1-5’inin sistemden çıkabileceği ve bunların bir kısmının  $O_2$  ile reaksiyona girerek süperoksit radikalinin oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir [31]. Süperoksit radikali biyosentezi stres altında olmayan bitkilerin dokularında da gerçekleşen bir olaydır. Ancak stres altındaki bitkilerde bu radikalın sentez hızı artar ve antioksidant sistemin detoksifikasyon kapasitesinin üzerine çıkar. Kloroplastların tilakoid membranlarındaki fotosistem I (FSI) ve fotosistem II’ de (FSII) meydana gelen elektron kaçaklarının lokasyonları şekil 4’ te gösterilmiştir [32,33]. Bunun dışında mitokondriyal kompleks I ve kompleks II de elektron kaçaklarının meydana gelebileceği bölgelerdendir [29,34].



**Şekil 4** FSI ve FSII’de süperoksit oluşumunun gerçekleştiği bölgeler (ITK: ışık toplayıcı kompleks; OEK: oksijen evölüsyon kompleksi; Mn: mangan; Feo: feofitin; Q<sub>A,B</sub>: kinon<sub>A</sub> ve kinon<sub>B</sub>; PQ: plastokinon; Fd: ferrodoksin) [15]

Yapılan araştırmalar feofitin, kinon<sub>A</sub> ve sitokrom b559’ un FSII’nin akseptör bölgesinde O<sub>2</sub>’yi indirgeyerek süperoksit radikali oluşturma kapasitesine sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır [35,36, 33,37]. Bunun dışında FSII’nin donör bölgesinde de süperoksit radikalinin üretildiği rapor edilmiştir [38,39]. Ancak FSI kloroplastlardaki süperoksit radikalinin üretimi bakımından en aktif bölgedir [32,40]. Süperoksit radikali FSI’in akseptör bölgesinde bulunan psaA ve psaB üzerindeki 4F-4S (Fx), psaC üzerindeki A/B birimleri ve ferrodoksin (Fd) tarafından oluşturulur [41].

Peroksizomlar normal koşullarda fotorespirasyon, yağ asitlerinin oksidasyonu, azotlu bileşiklerin metabolizması ve AOT detoksifikasyonu gibi fonksiyonlardan sorumludur. Ancak patojen saldırısı, kadmiyum toksisitesi, tuzluluk, herbisit ve ksenobiyotik maddelerin uygulanması sonucunda peroksizomlarda süperoksit oluşumu gözlenir [6,42]. Peroksizomlarda süperoksit radikalinin oluşumu ile ilgili iki farklı mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan birincisi hücrel matriksteki ksantin oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyondur. İkincisi ise peroksizom membranındaki NADH/NADPH-bağımlı küçük elektron taşıyım kompleksidir. Bu kompleks NADH ferrisiyanit redüktaz, sitokrom b, monodehidroaskorbat redüktaz ve NADPH:sitokrom P450 redüktaz enzimlerini içerir ve belli oranda sitosoldeki süperoksit radikali üretiminden sorumludur [43,6,44].

Yüksek ışık yoğunluğu, UV ışınlar, herbisitler ve ksenobiyotikler bitkilerde kloroplastlar, mitokondriler ve peroksizomlardaki elektron taşınım olaylarını olumsuz yönde etkileyerek süperoksit radikalinin oluşum hızını artırır. Bu stres tiplerinde elektron taşınım sisteminden gerçekleşen elektron kaçakları oksidatif stresin primer sebebinin oluşturur. Ancak tuzluluk, patojen saldırıları, mekanik yaralanma, kuraklık, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, ağır metaller, ozon ve sel stresi durumunda elektron taşınım sistemlerinde meydana gelen anormallikler stres cevabının sonraki basamaklarında ortaya çıkan sekonder etkiler olarak kabul edilmektedir. Bu durum muhtemelen stres oluşumundan hemen sonraki dönemde ortaya çıkan aşırı oksidatif stres yüzünden antioksidant etkinliğin azalmasından kaynaklanmaktadır.

### **Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Hidrojen peroksit bitki hücrelerinde önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip olan en stabil AOT'dir [25,40]. Hidrojen peroksit paylaşılmamış elektronları bulunmayan zayıf asit karakterinde bir bileşiktir. Süperoksit, hidroksil ve singlet oksijen radikalleri ile karşılaştırıldığında daha kararlı bir yapıya sahiptir. Yine de canlı dokulardaki yarı ömrü, hidrojen peroksidi parçalayan enzimlerin aktivitelerinden dolayı bir saniyeden daha azdır [25]. Sitoplazma oldukça indirgenmiş, antioksidantlar bakımından zengin bazik bir yapıya sahiptir. Hücre dışı boşluklar ise asidik karakterdedir ve hem hidrojen peroksidi hem de süperoksit radikali gibi hidrojen peroksidin öncüsü olan bileşikler parçalayan enzimler bakımından fakirdir [45,46]. Bu nedenle apoplastik bölgede hidrojen peroksit birikimi ve oksidatif stresin derecesi fazladır.

Bitkilerde hücre hacminin yaklaşık %95'ini vakuol oluşturduğundan sitoplazma oldukça ince bir tabaka halindedir. Bu nedenle hücre içinde üretilen hidrojen peroksit, plazma zarındaki akuaporinlerden geçerek hızla hücre dışına difüze olabilir [47]. Bitki hücrelerinde hidrojen peroksidin diğer kaynakları ise apoplastik bölgedeki NADPH oksidazlar ve hem içeren sınıf-III peroksidazlardır [11].

Bitki hücrelerinde süperoksit radikalinin olduğu bölgeler aynı zamanda hidrojen peroksit oluşumunun da orijini olarak kabul edilmektedir. Peroksidaz grubu enzimler biyotik stres faktörlerine maruz kalan bitkilerde hidrojen peroksit oluşumundan sorumlu tutulmaktadır [48,49]. Yapılan birçok araştırma bakır içeren amino oksidazlar ve poliamin oksidazlarla, glutatyon ve askorbat oksidazlar gibi sınıf-III peroksidazların tuzluluk, ağır metal, yüksek ışık yoğunluğu ve diğer abiyotik stres faktörlerinin etkisiyle

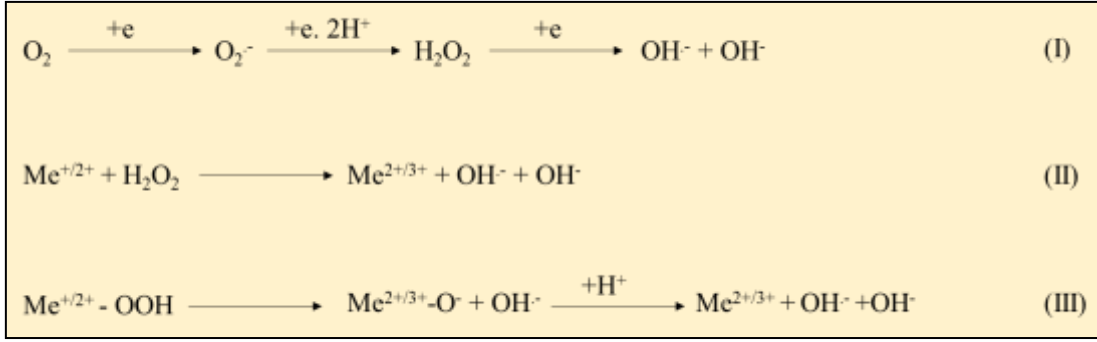
aktivitelerinin arttığını ve bitki dokularında AOT üretimi için önemli olduğunu göstermiştir [50-52].

Bitkilerde oksidatif stresin hidrojen peroksit molekülü ile indüklendiğine inanılmaktadır. Hidrojen peroksidin oksitleyici özelliği zayıftır. DNA, amino asitler ve lipidlerde kimyasal bir değişime neden olmaz. Ancak hidrojen peroksit doğrudan doğruya sülfidril grupları ile etkileşime girer ve asıl hedefi hidroksil radikaline dönüşmesini sağlayacak olan geçiş metallerini bağlayan bölgelerdir [53,54]. Hidrojen peroksidin fruktoz bifosfat gibi bazı enzimleri inaktif hale getirdiği rapor edilmiştir. Ancak bu inaktivasyonun sebebinin aslında çözeltilerdeki geçiş metalleri olduğu ortaya çıkarılmıştır ve birçok proteinin geçiş metali içermeyen çözeltilerde 100 mM'lık hidrojen peroksit konsantrasyonunda stabil kalabildiği bildirilmiştir [25].

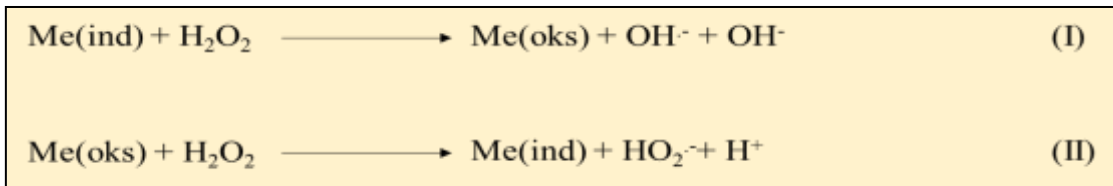
### **Hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>)**

Hidroksil radikali oksidatif stres boyunca lipid peroksidasyonu ile nükleik asitler ve proteinlerde meydana gelen oksidatif hasardan en fazla sorumlu olan AOT'dir. Bunun dışında, oksidatif stres sinyali ve programlanmış hücre ölümleri ile doğrudan ilişkili olduğu da rapor edilmiştir [55,56]. Hidroksil radikali bitkilerin strese maruz kalmasından hemen sonra oluşmaya başlar ve hem kalsiyum hem de potasyum kanallarını aktif hale getirerek kalsiyumun hücre içine girmesine, potasyumun da hücre dışına çıkmasına neden olur [56]. Hidroksil radikalının *in vivo* ortamdaki yarı ömrü yaklaşık 1 ns, difüzyonla katedebileceği mesafe ise 1 nm'den daha azdır [57]. Ancak birçok organik molekülle reaksiyona girme yeteneği oldukça yüksektir. Canlılarda hidroksil radikalini temizleyecek ya da detoksifiye edecek herhangi bir enzim sistemi yoktur. Mannitol, sorbitol, dimetil sulfoksit ve tiyoüre gibi bazı bileşiklerin etkileri hidroksil radikalının detoksifikasyonu ile değil; bu bileşiklerin hidroksil radikali öncülleri ile reaksiyonu ve geçiş metallerini şelatlamaları ile ilgilidir.

Hidroksil radikali biyosentezi için Fenton reaksiyonları önemlidir (Şekil 5). On dokuzuncu yüzyılda Fenton tarafından gerçekleştirilen çalışmanına amacı Fe<sup>+2</sup> iyonlarının tartarik asit üzerindeki etkilerinin araştırılması idi [58]. Ancak elde edilen bulguların öneminden dolayı bir asırdan uzun süredir kullanılmaktadır. Günümüzde Fenton kimyası ve Fenton benzeri reaktifler gibi ifadeler, hidrojen peroksit ve geçiş metallerinin varlığında meydana gelen hidroksil radikali, su ve süperoksit radikali oluşturan reaksiyonlar için kullanılmaktadır [59].



**Şekil 5** Bitkilerde hidroksil radikalinin oluşmasına neden olan reaksiyonlar (Me: metal) [15]  
Fenton reaksiyonları sırasında birçok ara ürün oluşmasına rağmen, net reaksiyon şekli 6'daki gibidir [60, 61].



**Şekil 6** Fenton reaksiyonu (Me: metal; ind: indirgenmiş; oks: oksitlenmiş) [60]

Bitkilere UV-B stresi uygulaması sonucunda hidroksil radikalinin bitki dokularındaki aşırı üretimi büyümenin inhibisyonuna neden olmaktadır [62,63]. *Arabidopsis thaliana* köklerinde de tuz stresi etkisiyle hidroksil radikali üretiminin arttığı rapor edilmiştir. Sonuçta hidroksil radikali birikimi potasyum kanallarını aktive ederek hücrelerin potasyum kaybetmesine, potasyuma bağımlı proteazların ve endonükleazların aktivasyonu da programlanmış hücre ölümlerine yol açmıştır [56]. Hidroksil radikali birikiminin fotosentetik aygıtta da önemli hasarlara yol açtığı belirlenmiştir [64]. Stres koşulları altında hidroksil radikali her iki fotosistem tarafından da üretilebilir. FSI'deki elektron kaçakları süperoksit birikimine neden olur. Oluşan süperoksit radikalleri dismutasyon reaksiyonu ile hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Daha sonra stromada birikim gösteren hidrojen peroksit serbest geçiş metalleri ile hidroksil radikale dönüşür [65]. FSII'de muhtemelen geçiş metallerini bağlayan üç bölge hidrojen peroksitten hidroksil radikali oluşumuna neden olur [66]. Böylece oluşan oksidatif stres sonucunda kloroplastların fonksiyonu bozulur.

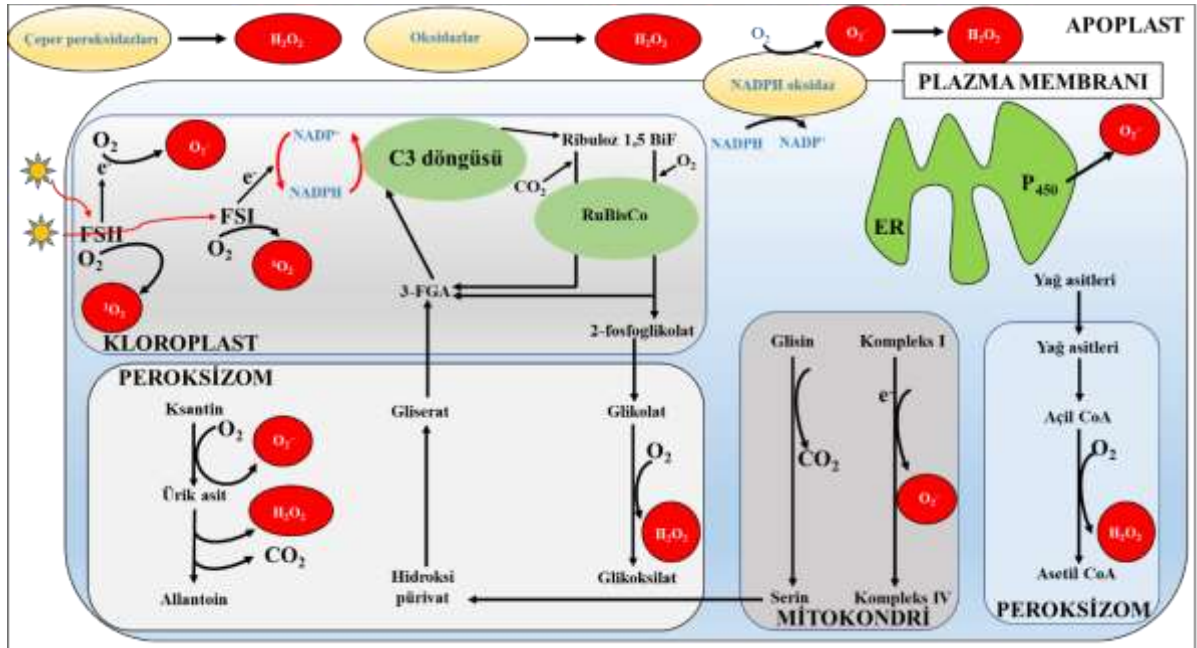
### **Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ )**

Oksijenin kloroplastlarda FSII'nin reaksiyon merkezi olan P680'in ışığı absorbe etmesi sonucunda aktive edilmesi, oldukça reaktif olan singlet oksijen radikalinin oluşumuna yol



açar [67,32]. Singlet oksijen reaksiyon merkezinde bulunan  $\beta$ -karotenin yanı sıra su, tokoferol, indirgenmiş plastokinon ve flavonoidler yardımıyla hızla detoksifiye edilebilir [68,67,32,69,70]. Bitkilerde özellikle fotooksidatif stres gibi abiyotik stres koşulları altında singlet oksijenin üretim miktarı artış gösterebilir [11,32,70]. Sonuçta oksidatif hasar meydana gelir ve programlanmış hücre ölümleri tetiklenir [71,72].

Singlet oksijenin dokulardaki yarı ömrünün ve difüzyon mesafesinin sırasıyla yaklaşık 3,5  $\mu$ s ve 190 nm olduğu belirlenmiştir [32]. Bazı araştırmacılar da singlet oksijen için kloroplastlardaki difüzyon hızının sadece birkaç nm olduğunu belirtmiş buna gerekçe olarak da hücre öz suyunun yüksek viskozitesini ileri sürmüşlerdir [73]. Ancak son yıllarda özel sensörlerle yapılan araştırmalar singlet oksijenin bitki hücrelerinde sanıldığından daha stabil bir yapıya sahip olduğunu, difüzyonla kloroplastların dışına çıkarak hücre çeperine kadar ulaşabildiğini göstermiştir [74,75]. Buna göre singlet oksijenin bitki hücrelerinde birçok makromolekülle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olma kapasitesine sahip olduğu söylenebilir. Şekil 7’de bitki hücrelerindeki AOT’lerin oluşum bölgeleri ve reaksiyonları özetlenmiştir.



Şekil 7 Bitki hücrelerinde AOT'lerin oluşabileceği bölgeler (3-FGA: 3-fosfoglisarat; ER: endoplazmik retikulum; RuBisCo: ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz oksijenaz) [21]

## **Bitkilerde Oksidatif Stresin Temel Hasar Mekanizmaları**

### **Lipid peroksidasyonu**

Oksidatif stres proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar ve lipidler gibi makromoleküllerde geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz modifikasyonlara yol açar [28, 76]. Bunlar arasında özellikle lipid oksidasyonu veya lipid peroksidasyonu oldukça tehlikelidir. Çünkü bu olay neden olduğu bir seri reaksiyon sonucunda daha farklı serbest radikallerin oluşumuna neden olur ve oksidatif stres göstergesi olarak kabul edilir [76].

Lipid peroksidasyonu başlama, yayılma ve sonlanma olmak üzere üç basamakta gerçekleşen bir olaydır [77,76]. Lipid peroksidasyonunun başlama evresi lipid molekülünden bir hidrojen atomunun hidroksil, alkoksil, peroksil radikalleri ile peroksinitrit yardımıyla uzaklaştırılması ile tetiklenir. Bu olayda hidrojen peroksit ve süperoksit radikali etkili değildir [25]. Hidrojen atomu moleküldeki metilen (-CH<sub>2</sub>-) grubundan çıkarılır ve sonuçta karbon merkezli bir lipid radikali (-CH·- veya L·) meydana gelir. Fosfolipidler radikallere ve peroksidasyona duyarlıdır çünkü yağ asitlerinin yapısındaki çift bağlar C-H bağlarını zayıflatır ve hidrojenin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. L· oksijeni aktive eder ve oksijen merkezli bir lipid peroksil radikali (LOO·) oluşturur. Bu radikal de komşu yağ asidinden bir hidrojen atomu uzaklaştırarak bir lipid hidroperoksit (LOOH) ve ikinci lipid radikalini (L·) meydana getirir [77]. Böylece yayılma evresi başlar. LOOH indirgenmiş demir ve bakır gibi geçiş metalleri ile indirgeyici bir kırılmaya uğrayabilir lipid alkoksil radikalini (LO·) meydana getirir. Bu radikal de oldukça reaktiftir ve başka bir yağ asidinden bir hidrojen atomu koparabilir. Lipid peroksidasyonunun diğer önemli bir mekanizması da çift bağların fotosistem II reaksiyon merkezindeki singlet oksijenle direkt reaksiyonu sonucunda LOOH oluşumudur [78,72,76].

Şiddetli lipid peroksidasyonu membranların zarar görmesine, seçici geçirgen özelliğın zayıflamasına, organellerin parçalanmasına, DNA, RNA ve proteinlerin fonksiyonlarını kaybetmesine neden olur [25,76]. Lipid peroksidasyonunun son ürünleri (malondialdehit 4-hidroksi-2-nonenal, 4-hidroksi-2-hegzanal ve akrolein) oksidatif stres markörü olarak kabul edilmektedir.

### **Protein modifikasyonları**

AOT'ler proteinogenik amino asitleri oksitleyebilir [79,80]. Proteinlerin yapısındaki bu tip modifikasyonlar spesifik metabolik, yapısal, düzenleyici ve taşıyım gibi proteinlerle

gerçekleştirilen fonksiyonların bozulmasına veya tamamen kaybolmasına yol açar. Protein oksidasyonu aynı zamanda toksik protein ürünlerinin oluşumuna ve sonuçta hücre ölümlerine yol açabilir [80]. 4-hidroksinonenal ve malondialdehit gibi lipid peroksidasyonu ürünleri lizin ve histidin gibi amino asitlerle reaksiyona girerek bu molekülleri oksitleyebilir. Proteinlerdeki oksidasyon sonucunda oluşan hasarların çoğunun geri dönüşümsüz olduğuna inanılmaktadır. Ancak metionin ve sistein gibi kükürt içeren amino asitler bu konuda istisnadır [81-83]. Birçok aminoasidin oksidasyonu patofizyolojik bir olay olarak kabul edilirken, kükürt içeren amino asitlerin oksidasyonunun, protein katlanması örneğinde olduğu gibi, düzenleyici bir rolü vardır. Sisteinin AOT'lerle reaksiyonunun geri dönüşümlü olması bu aminoasidin tam olarak oksitlenmemesi ile ilgilidir. Proteinlerin yapısındaki farklı amino asitlerin oksidasyona uğraması fonksiyonel olarak da farklı sonuçlar doğurmaktadır [81,84,83]. Örneğin metionin AOT'lere karşı oldukça duyarlıdır. Bu amino asit kolayca ve geri dönüşümlü bir şekilde oksitlenir ancak bu durum metioninin yapısında bulunduğu proteinin fonksiyonunu etkilemez. Metionin ayrıca bazı durumlarda proteinin yapısında bulunan diğer amino asitlerin oksidasyona uğramasını da engelleyebilir. Sisteinin oksidasyonu ise oldukça önemli düzenleyici sonuçlara neden olur.

Karbonil grubunun oluşumu (karbonilasyon) en yaygın oksidatif protein modifikasyonları arasındadır [85]. Karbonilasyonun meydana gelebilmesi için metionin ve sisteinin oksidasyonundan daha fazla enerji gerekir. Ayrıca karbonilasyon daha fazla amino asit üzerinde etkili olur ve proteinlerin yapı ve fonksiyonunda daha ciddi etkiler yaratır [86,85]. Karbonilasyon sonucunda genellikle reaktif ketonlar ve aldehitler oluşur. Lizin, arjinin, prolin ve treoninin yan zincirlerinde meydana gelen oksidasyonlar primer protein karbonilasyon reaksiyonları olarak kabul edilir. Sekonder protein karbonilasyon reaksiyonları ise lipid peroksidasyonu boyunca meydana gelen aldehitlerin ilavesi ile meydana gelir. Karbonilasyon, polipeptid zincirine büyük ve reaktif grupların eklenmesine neden olur. Protein yapısında moleküller arası kovalent çapraz bağlanma, kırılma veya protein degradasyon hızında değişimler gibi ciddi sonuçlara yol açar. Bu tip değişimler de proteinlerin fizyolojik ve enzimatik aktivitelerini inhibe eder. Tuzluluk, kuraklık ve ağır metal toksisitesi gibi birçok stres faktörünün bitkilerde protein karbonilasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir [86-88].

### **Karbonhidratlar üzerindeki etkiler**

Karbonhidratlar bitkilerde en yaygın bulunan organik bileşiklerdendir. Ancak oksidatif stres ve stres sinyali bakımından en az çalışılan bileşiklerdir. Karbonhidratlar çeper yapısına girerek bitkilere mekanik destek ve şekil verir, indirgenmiş karbonun depolanmasını sağlar, enzim aktivitesini ve ozmotik basıncı düzenler ve enzimatik olmayan antioksidant savunma sağlar. Karbonhidratların oksidasyonu bitkiler için zararlıdır.

Hidroksil radikallerinin ksiloglukanlarla ve pektinlerle enzimatik olmayan bir şekilde reaksiyona girdiği, bunları parçaladığı ve çeper yumuşamasına neden olduğu bildirilmiştir [53]. Bu olay aslında bitkilerde hücre büyümesi ve meyve olgunlaşması bakımından faydalıdır [53,54]. Ancak stres koşulları söz konusu olduğunda ve katalitik bakır ve demir aktiviteleri arttığında patofizyolojik sonuçlar ortaya çıkabilir [89,90].

Mono ve disakkaritlerin AOT temizleyicisi olarak rol oynadığı bildirilmiştir [91]. Buna göre AOT temizleme konusunda en etkili olan karbonhidrat maltoz, etkisi en zayıf olan ise sorbitoldür [92]. Birçok bitki türünde glukoz, fruktoz, sukroz, trehaloz ve mannitol gibi karbonhidratların birikimleri ile oksidatif strese direnç arasında bir korelasyon belirlenmiştir [93,91]. Bu karbonhidratların bazı antioksidant enzimlere ait genlerin ekspresyonunu olumlu yönde etkilediği rapor edilmiştir [93].

### **Nükleik asitler üzerindeki etkiler**

Oksidatif DNA hasarı tohum stoklarının yaşlanmasından ve tarımsal öneme sahip olan bitkilerin ölümünden sorumlu olabilir [94]. Bu hasarlar yanlış baz eşleşmeleri, çift zincirde meydana gelen kırılmalar ve bazlardaki kimyasal değişimler olmak üzere üç grupta incelenmektedir [95,96]. Hidroksil radikalleri nükleik asitlerde, nükleotid bazlarına çift bağ ilave ederek ve hem 2-deoksiribozun her bir C-H bağından ve timinin metil grubundan hidrojen atomunu çıkararak hasar oluşturur [97].

Bitkilerde DNA hasarlarının tamir edilmesini sağlayan bir onarım sistemi vardır. Bu sistem molekülün hasar gören kısmının doğrudan onarımını sağladığı gibi baz ve nükleotid değişimini de sağlar [98]. Bu koruma konusunda sitosol ve organellerdeki antioksidant savunma da önemli rol oynar. Yapılan araştırmalar nükleustaki AOT detoksifiye eden enzimlerin DNA' nın oksidatif stresten korunması konusunda yetersiz kaldığını göstermiştir [99]. Aynı zamanda stres koşulları altında katalaz ve sitosolik

askorbat peroksidaz enzimlerinin nükleer DNA'nın oksidatif hasardan korunmasını sağladığı bildirilmiştir [99].

## **Çevresel Faktörlerin Bitki Oksidatif Stresine Etkisi**

### **Tuz stresi**

Toprak tuzluluğu dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerinde tarımsal bitkilerin ürün miktarı ve kalitesini sınırlayan stres faktörlerinden biridir. Tuz stresi bitkilerde iyon toksisitesi, besin eksikliği, genotoksisite ve ozmotik stresin yanı sıra oksidatif strese yol açarak hasarlar oluşturmaktadır [100]. Bitkilerde tuz stresinin hakim olduğu süre boyunca stomaların iletkenliği azalmakta ve CO<sub>2</sub> alınımı kısıtlanmaktadır. Böylece Calvin döngüsünde kullanılacak hücreler arası CO<sub>2</sub> konsantrasyonu azalmakta ve oksitlenmiş NADP<sup>+</sup> miktarının azalması sonucunda NADP<sup>+</sup>'ye verilmesi gereken elektronlar oksijene verilerek O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalinin oluşumu gerçekleşmektedir [101]. O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalinin enzimatik ya da enzimatik olmayan mekanizmalarla dismutasyonu sonucu meydana gelen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tuz stresi altındaki bitkilerde Fenton reaksiyonu sonucunda aşırı derecede reaktif olan hidroksil radikaline dönüşebilir. Bunun dışında fotosistem II'nin reaksiyon merkezinde, tuz stresi nedeniyle gözlenen yetersiz enerji dağıtımı sonucunda triplet klorofil moleküllerinden singlet oksijen oluşumu da gözlenmektedir [102]. Farklı bitki türlerinde yapılan araştırmalar tuz stresinin neden olduğu oksidatif stresin altında yatan temel sebebin dokulardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve süperoksit birikimi olduğunu göstermiştir [103-109].

### **Kuraklık stresi**

Küresel ısınmanın bir sonucu olarak etkisi her geçen gün daha yoğun bir şekilde hissedilmeye başlayan kuraklık stresi, bitki büyümesini ve tarımsal üretimi olumsuz yönde etkileyen çevresel stres faktörleri arasındadır [110]. Bitkilerde kuraklık stresinin etkileri arasında dokulardaki su miktarının azalması, yaprak dokularının su potansiyelinin azalması ve turgor kaybı, stomaların kapanması, hücre büyümesinin yavaşlaması, enzim aktivitelerinin değişmesi ve fotosentetik aktivitenin azalması sayılabilir [111]. Ayrıca aktif oksijen türlerinin miktarındaki artış sonucunda ortaya çıkan oksidatif stres de bitkilerde kuraklık stresinin sekonder etkisi olarak kabul edilmektedir. Yapılan araştırmalar kuraklık stresi altındaki *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Stevia rebaudiana*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa* and *Sorghum bicolor* gibi bitki türlerinin dokularında kuraklık stresi sonucu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> miktarının belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir [112-118].

### **Düşük sıcaklık stresi**

Düşük sıcaklıklar özellikle ılıman iklime sahip bölgelerde bitkilerin coğrafi dağılımını, büyüme ve gelişmesini, verimini ve canlılığını etkileyen abiyotik stres faktörlerinden biridir [119]. Düşük sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişim gözlenmektedir [120]. Düşük sıcaklıkların bitki metabolizmasına yol açtığı değişimlerin temelinde üretim hızı artan süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi bileşiklerin neden olduğu oksidatif strestir [119]. Mercimek, domates, *Solanum lycopersicum*, arpa ve pirinç gibi bitkilerde düşük sıcaklık stresinin dokulardaki AOT miktarını artırdığı tespit edilmiştir [121-125].

### **Sonuç**

Metabolik olaylar sırasında bitki hücrelerinde farklı aktif oksijen türleri sürekli oluşmaktadır. Antioksidant sistemin enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenleri aktif oksijen türlerinin neden olabileceği oksidatif hasara karşı korumaktadır. Ancak biyotik ve abiyotik stres faktörleri bitki hücrelerindeki aktif oksijen türlerinin oluşum hızını artırmakta ve antioksidant sistemin kapasitesi hücresel bileşenleri koruma konusunda yetersiz kalabilmektedir. Bu durumda tarımsal bitkiler söz konusu olduğunda ciddi verim kayıpları ortaya çıkmaktadır. Günümüzde ekonomik öneme sahip olan bitkilerin çeşitli stres faktörlerine karşı direncini artırmak ve ürün kayıplarını en düşük seviyeye indirmek için moleküler tekniklerle bitkilerin antioksidant kapasitesi artırılmaya çalışılmaktadır. Bunun dışında bitkilere antioksidant sistemi uyaracak hidrojen peroksit gibi bileşikler veya antioksidant sistemin metabolit gereksinimini daha iyi karşılamak amacıyla askorbik asit, glutatyon ve  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini) gibi antioksidant etkiye sahip bileşikler uygulanarak bitkiler oksidatif strese daha dirençli hale getirilmeye çalışılmaktadır. Buna göre, bitki dokularında aktif oksijen türlerinin oluşumu, kimyası ve oksidatif hasar oluşturma mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ürün kayıplarının da azaltılması bakımından faydalı olacaktır.

#### **Açıklama ve teşekkür**

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 0201601005 numaralı proje ile desteklenmiş ve Ali Doğru'nun doktora tezinden üretilmiştir.

#### **Çıkar çatışması**

Yazar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## Kaynaklar

1. Halliwell, B., Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 2006. 141(2): p. 312-322.
2. Alscher, R.G., J.L. Donahue, and C.L. Cramer, Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. *Physiologia Plantarum*, 1997. 100(2): p. 224-233.
3. Dat, J., et al., Dual action of the active oxygen species during plant stress response. *Cell and Molecular Life Science*, 2000. 57(5): p. 779-795.
4. Bray, E.A., J. Bailey-Serres, and E. Weretylnik, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 1. Baskı, American Society of Plant Physiologists, 2000.
5. Öncel, I., Y. Keleş, and A.S. Üstün, Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environmental Pollution*, 2000. 107(3): p. 35-320.
6. del Rio, L.A., et al., Activated oxygen-mediated metabolic functions of leaf peroxisomes. *Plant Physiology*, 2006. 104(4): p. 673-680.
7. Navrot, N., et al., Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Plant Physiology*, 2007. 129(1): p. 185-195.
8. Foyer, C.H. and G. Noctor, Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 2005. 17: p. 1866-1875.
9. Bhattacharjee, S., Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 2005. 89(7): p. 1113-1121.
10. Mittler, R., Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002. 7(9): p. 405-410.
11. Apel, K. and H. Hirt, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 2004. 55: p. 373-399.
12. Khan, N.A. and S. Singh, S, *Abiotic Stress and Plant Responses*, 1. Baskı, IK International, 2008.
13. Canavar, S., Bazı arpa (*Hordeum vulgare* L.) genotiplerinde tuz toleransının fizyolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü, Sakarya Üniversitesi, Sakarya, Türkiye, 2018.
14. Guido, V., *Fundamentals of physics and chemistry of atmosphere*, 1. Baskı, Springer, 2001.
15. Demidchik, V., *Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology*. *Environmental and Experimental Botany*, 2015. 109: p. 212-228.
16. Renda, A., et al., On the origin of fluorine in milky way. *Monthly Notices of Royal Astronomy Society*, 2004. 354: p. 575-580.
17. Dowling, D. K., and L.W. Simmons, Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceeding of the Royal Society Part B Biological Science*, 2009. 276: p. 1737-1745.
18. Salin, M.L., Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum*, 1987. 72: p. 681-689.
19. Edrewa, A., Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approaches. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 2005. 106: p. 119-133.
20. Vranova, E., et al., *Plant Signal Transduction*, 1. Baskı, Oxford University Press, 2003.
21. Doğru, A., Kolzanın (*Brassica napus* L. ssp. oleifera) bazı kışlık çeşitlerinde düşük sıcaklık toleransı ile ilgili fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin araştırılması. Doktora Tezi, Biyoloji Bölümü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye, 2006.
22. Hippeli, S., I. Heiser, and E.F. Elstner, Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: new insight and analogies between animals and plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999. 37: p. 167-178.
23. Niyogi, K.K., Photoprotection revisited: geneic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 1999. 50: p. 333-359.

24. Kavdia, M., A computational model for free radicals transport in the microcirculation. *Antioxidant Redox Signal*, 2006. 8: p. 1103-1111.
25. Halliwell, B., and J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, 1. Baski, Oxford University Press, 1999.
26. Smirnov, N., The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 1993, 125: p. 27-58.
27. Lesser, M.P., Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*, 2006. 68: p. 253-278.
28. Moller, I.M., P.E. Jensen, and A. Hansson, Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2007. 58: p. 459-481.
29. Rinalducci, S., L. Murgiano, and L. Zolla, Redox proteomics: basic principles and further perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2008. 59: p. 3781-3801.
30. Takahashi, S., and M.R. Badger, Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science*, 2011. 16: p. 53-60.
31. Moller, I.M., Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2001. 52: p. 561-591.
32. Asada, K., Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 2006. 141: p. 391-396.
33. Pospisil, P., et al., Hydroxyl radical generation by photosystem II. *Biochemistry*, 2004. 43: p. 6783-6792.
34. Hirst, J., M.S. King, and K.R. Pryde, The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochemical Society Transaction*, 2008. 36: p. 976-980.
35. Ananyev, G.M., et al., The production of superoxide radicals and the superoxide dismutase activity of photosystem II. The possible involvement of cytochrome b559. *Photosynthesis Research*, 1994. 41: p. 327-338.
36. Cleland, R.E., and S.C. Grace, Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II. *FEBS Letter*, 1999. 457: p. 348-352.
37. Pospisil, P., et al., Evidence that cytochrome b559 is involved in superoxide production in photosystem II. Effect of synthetic short-chain plastoquinones in a cytochrome b559 tobacco mutant. *Biochemical Journal*, 2006. 397: p. 321-327.
38. Chen, G.X., J. Kazimir, and G.M. Cheniae, Photoinhibition of hydroxylamine-extracted photosystem II membranes: studies of the mechanism. *Biochemistry*, 1992. 31: p. 11072-11083.
39. Chen, G.X., et al., Superoxide contributes to the rapid inactivation of specific secondary donors of the photosystem II reaction center during photodamage of manganese-depleted photosystem II membranes. *Biochemistry*, 1995. 34: p. 2317-2332.
40. Foyer, C.H., and G. Noctor, Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. *Antioxidant Redox Signal*, 2009. 11: p. 861-710.
41. Asada, K., The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen species and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999. 50: p. 601-639.
42. Reumann, S., and A.P.M. Weber, Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006. 1763: p. 1496-1510.
43. del Rio, L.A., et al., Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*, 2002. 53: p. 1255-1272.
44. Lopez-Huertas, E., et al., Stress induces peroxisomes biogenesis genes. *EMBO Journal*, 2000. 19: p. 6770-6777.



45. Hernandez, J.A., et al., Antioxidant systems and  $O_2^-/H_2O_2$  production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, 2001. 127: p. 817-831.
46. Mhamdi, A., G. Noctor, and A. Baker, Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2012. 15: p. 181-194.
47. Dynowsky, M., et al., Plant plasma membrane water channels conduct the signaling molecule  $H_2O_2$ . *Biochemical Journal*, 2008. 414: p. 53-61.
48. Bolwell, G.P., and P. Wojtazsek, Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence-a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1997. 51: p. 347-366.
49. Bindschedler, L.V., et al., Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant Journal*, 2006. 47: p. 851-863.
50. Rodriguez, A.A., K.A. Grunberg, and E. Taleisnik, Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiology*, 2002. 129: p. 1627-1632.
51. Rodriguez, A.A., et al., Salinity-induced decrease in NADPH oxidase activity in the maize leaf blade elongation zone. *Journal of Plant Physiology*, 2007. 164: p. 223-230.
52. Chang, C.C.C., et al., *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidase play a role in crosstalk between photooxidative stress and immune response. *Plant Physiology*, 2009. 150: p. 670-683.
53. Fry, S.C., J.G. Miller, and J.C. Dumville, A proposed role of copper ions in cell wall loosening. *Plant and Soil*, 2002. 247: p. 57-67.
54. Fry, S.C., Primary cell wall metabolism: tracking the careers of the wall polymers in living plant cells. *New Phytologist*, 2004. 161: p. 641-675.
55. Demidchik, V., et al., Free oxygen radicals regulate plasma membrane  $Ca^{+2}$ - and  $K^+$  permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Science*, 2003. 116: p. 81-88.
56. Demidchik, V., Reactive oxygen species, oxidative stress and plant ion channels, 1. Baski, Springer-Verlag, 2010.
57. Sies, H., Strategies of antioxidant defence. *European Journal of Biochemistry*, 1993. 215: p. 213-219.
58. Fenton, H.J.H., Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of Chemical Society Transactions*, 1894. 65: p. 899-911.
59. Goldstein, S., D. Meyerstein, and G. Czapski, The Fenton reagents. *Free Radical Biology and Medicine*, 1993. 15: p. 435-445.
60. Koppenol, W.H., The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Reports*, 2001. 6: p. 229-234.
61. Haber, F., and J. Weiss, On the catalysis of hydroperoxide. *Naturwissenschaften*, 1932. 20: p. 948-950.
62. Jain, K., S. Kataria, and K.N. Guruprasad, Oxyradicals under UV-B stress and their quenching by antioxidant. *Journal of Experimental Biology*, 2004. 42: p. 884-892.
63. Kataria, S., K. Jain, and K.N. Guruprasad, Involvement of oxyradicals in promotion/inhibition of expansion growth in cucumber cotyledons. *Journal of Experimental Biology*, 2005. 43: p. 910-915.
64. Sersen, F., and K. Kralova, EPR spectroscopy-a valuable tool to study photosynthesizing organisms exposed to abiotic stresses, 1. Baski, Intech, 2013.
65. Snyrychova, I., P. Pospisil, and J. Naus, Reaction pathways involved in the production of hydroxyl radicals in the thylakoid membrane: EPR spin-trapping study. *Photochemical and Photobiological Science*, 2006. 5: p. 472-476.
66. Pospisil, P., Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2009. 1787: p. 1151-1160.
67. Schweitzer, C., and R. Schmidt, Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chemical Reviews*, 2003. 103: p. 1685-1757.

68. Trebst, A., and B. Depka, Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Letter, 1997. 400: p. 359-362.
69. Kruk, J., and A. Trebst, Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics 2008. 1777: p. 154-162.
70. Fischer, B.B., E. Hideg, and A. Krieger-Liszkay, Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. Antioxidant Redox Signaling, 2013. 18: p. 2145-2162.
71. Fornazari, M., et al., Redox properties of the adenosine triphosphate sensitive K<sup>+</sup> channel in brain mitochondria. Journal of Neuroscience Research, 2008. 86: p. 1548-1556.
72. Przybyla, D., et al., Enzymatic, but not non-enzymatic <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-mediated peroxidation of polyunsaturated fatty acids forms part of the Executer1-dependent stress response program in the flu mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 2008. 54: p. 236-248.
73. Krasnovsky, A.A.J., Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies. Membrane Cell Biology, 1998. 12: p. 665-690.
74. Flors, C., et al., Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green (R.). Journal of Experimental Botany, 2006. 57: p. 1725-1734.
75. Driever, S.M., et al., Imaging of reactive oxygen species in vivo. Methods in Molecular Biology, 2009. 479: p. 109-116.
76. Farmer, E.E., and M.J. Mueller, ROS mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. Annual Review of Plant Biology, 2013. 64: p. 429-450.
77. Catala, A., An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2006. 38: p. 1482-1495.
78. Krieger-Liszkay, A., C. Fufezan, and A. Trebst, Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanisms. Photosynthesis Research, 2008. 98: p. 551-564.
79. Moller, L.M., P.E. Jensen, and A. Hansson, Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology, 2007. 58: p. 459-481.
80. Avery, S.V., Molecular targets of oxidative stress. Biochemical Journal, 2011. 434: p. 201-210.
81. Shacter, E., Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. Drug Metabolism Reviews, 2000. 32: p. 307-326.
82. Bechtold, U., D.J. Murphy, and P.M. Mullineaux, Arabidopsis peptide methionine sulfoxide reductase prevents cellular oxidative damage in long nights. Plant Cell, 2004. 16: p. 908-919.
83. Onda, Y., Oxidative protein-folding systems in plant cells. International Journal of Cell Biology, 2013. 585: p. 431-446.
84. Cecarini, V., et al., Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolism. Biochimica et Biophysica Acta, 2007. 1773: p. 93-104.
85. Lounifi, I., et al., Interplay between protein carbonylation and nitrosylation in plants. Proteomics, 2013. 13: p. 568-578.
86. Tanou, G., et al., Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. Plant Journal, 2009. 60: p. 795-804.
87. Bartoli, C.G., et al., Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Experimental Botany, 2004. 55: p. 1663-1669.
88. Romero-Puertas, M.C., et al., Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. Plant Cell and Environment, 2002. 25: p. 677-686.
89. Becana, M., and R.V. Klucas, Transition metals in legume root nodules: iron-dependent free radical production increases during nodule senescence. Proceeding of the National Academy of Science USA, 1992. 89: p. 8958-8962.
90. Moran, J.F., et al., Drought induces oxidative stress in pea plants. Planta, 1994. 194: p. 1994-1999.
91. Couee, I., et al., Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and response to oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, 2006. 57: p. 449-159.

92. Morelli, R., et al., Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003. 51: p. 7418-7425.
93. Shen, B., R.G. Jensen, and H.J. Bohnert, Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology*, 1997. 113: p. 1177-1183.
94. Britt, A.B., DNA damage and repair in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996. 47: p. 75-100.
95. Cooke, M.S., et al., Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB Journal*, 2003. 17: p. 1195-1214.
96. Yoshiyama, K.O., K. Sakaguchi, and S. Kimura, DNA damage response in plants: conserved and variable response compared to animals. *Biology*, 2013. 2: p. 1338-1356.
97. Wang, Z., et al., Characterization of the *Arabidopsis* heterotrimeric G protein. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. 283: p. 13913-13922.
98. Tuteja, N., et al., Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Critical Review of Biochemistry and Molecular Biology*, 2001. 36: p. 337-397.
99. Vanderauwera, S., et al., Extranuclear protection of chromosomal DNA from oxidative stress. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 2011. 108: p. 1711-1716.
100. Shah, Z.H., H.M. Rehman, and T. Akhtar, Redox and ionic homeostasis regulations against oxidative, salinity and drought stress in wheat (a systems biology approaches). *Frontiers in Genetics*, 2017. 8: 141-148.
101. Hossain, M.S., and K.J. Dietz, Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 2016. 7: p. 548-554.
102. Krieger-Liszkay, A. Singlet oksijen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 56, 33346, 2005.
103. Acosta-Motos, J.R., et al., Long-term resistance mechanisms and irrigation critical threshold showed by *Eugenia myrtifolia* plants in response to saline reclaimed water and relief capacity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017. 111: p. 244-256.
104. Hernandez, J.A., et al., Salt induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 1993. 89: p. 103-110.
105. Hernandez, J.A., et al., Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Science*, 1995. 105: p. 151-167.
106. Hernandez, J.A., et al., Antioxidant systems and O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the apoplast of *Pisum sativum* L. leaves: Its relation with NaCl-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, 2001. 127: p. 817-831.
107. Mittova V., et al., Up-regulation of the leaf mitochondrial peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species. *Plant Cell and Environment*, 2003, 26: p. 845-856.
108. Gomez, J.M., et al., Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research*, 1999. 31: p. 11-18.
109. Mittova, V., et al., Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum*, 2002. 115: p. 393-400.
110. Furlan, A.L., E. Bianucci, and S. Castro, Signaling role of ROS in modulating drought stress tolerance, in *Drought Stress Tolerance in Plants*, vol 1: Physiology and Biochemistry, Tran, L.S., Ed., Springer, Cham, Switzerland, 2016.
111. Mattos, L.M., and C.L. Moretti, Oxidative stress in plants under drought conditions and the role of different enzymes. *Enzyme Engineering*, 2015. 5: p. 1-6.
112. Ben Rejeb, K., et al., Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 2015. 208: p. 1138-1148.

113. Hasanuzzaman, M., et al., Nitric oxide pretreatment enhances antioxidant defence and glyoxalase systems to confer PEG-induced oxidative stress in rapeseed. *Journal of Plant Interaction*, 2017. 12: p. 323-331.
114. Baloğlu, M.C., et al., Antioxidative and physiological responses of two sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars under PEG-mediated drought stress. *Turkish Journal of Botany*, 2012. 36: p. 707-714.
115. Hajhashemi, S., and A. Sofo, The effect of polyethylene glycol-induced drought stress on photosynthesis, carbohydrates and cell membrane in *Stevia rebaudiana* grown in greenhouse. *Acta Physiologia Plantarum*, 2018. 40: p. 142-151.
116. Gong, H., et al., Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science*, 2005. 169: p. 313-321.
117. Sharma, P., and R.S. Dubey, Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 2005. 46: p. 209-221.
118. Zhang, J., and M.B. Kirkham, Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. *Journal of Plant Physiology*, 1996. 149: p. 489-493.
119. Hu, Z.R., et al., Comparative photosynthetic and metabolic analysis reveal mechanism of improved cold stress tolerance in bermuda grass by exogenous melatonin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016. 100: p. 94-104.
120. Bajwa, V.S., et al., Role of melatonin in alleviating cold stress in *Arabidopsis thaliana* *Journal of Pineal Research*, 2014. 56: p. 238-245.
121. Moalem, S.K., R.M. Amiri, and S.S.K. Shahandashti, Effect of cold stress on oxidative damage and mitochondrial respiratory properties in chickpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018. 122: p. 31-39.
122. Ding, F., M. Wang, and S. Zhang, Overexpression of Calvin cycle enzyme SBPase improves tolerance to chilling-induced oxidative stress in tomato plants. *Scientia Horticulturae*, 2017. 214: p. 27-33.
123. Liu, T., et al., Exogenous 5-aminolevulinic acid pretreatment ameliorates oxidative stress triggered by low temperature stress of *Solanum lycopersicum*. *Acta Physiologia Plantarum*, 2018. 40: p. 210-221.
124. Begovic, L., et al., Induction of oxidative stress in barley by drought and chilling. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018. 124: p. 566-569.
125. Han, Q.H., et al., Effects of melatonin on antioxidative systems and photosystem II in cold-stressed rice seedlings. *Frontiers in Plant Sciences*, 2017. 8: p. 785-792.

## Biyoteknolojik Tekniklerle Mikrobiyal Vitamin Üretimi

Ülküye Dudu Gül<sup>1\*</sup> 

### ÖZET

İnsan sağlığı için son derece önemli olan vitaminlerin metabolizmada çok çeşitli işlevleri bulunmaktadır. Vitaminler özellikle metabolik yollarda rol alan biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi için gerekli enzimlerin yapısına katılırlar. Bu önemli rolleri nedeniyle vitaminler farklı işlevlere sahip organların fonksiyonlarını gerçekleştirmede katkı sağlayan bileşiklerdir. İnsan sağlığı için bu denli önemli bileşiklerin üretimi önem arz etmektedir. Ekonomik değeri yüksek biyoteknolojik ürünler arasında yer alan vitaminlerin kullanımı gıda katkı maddesi, terapötik ve medikal ajan olarak kullanılmalarının yanı sıra kozmetik ürün üretimi gibi geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu derleme çalışmasında ekonomik değeri yüksek vitaminlerin önemi ve bu vitaminlerin biyoteknolojik olarak mikroorganizmalar kullanılarak üretim teknikleri incelenmiştir.

### MAKALE GEÇMİŞİ

#### Geliş

03 Ocak 2020

#### Kabul

27 Şubat 2020

### ANAHTAR KELİMELER

Biyoteknoloji,  
Mikroorganizma,  
Vitamin Üretimi

## Production of Microbial Vitamins by Biotechnological Techniques

### ABSTRACT

Vitamins, which are very important for human health, have various functions in metabolism. Vitamins are particularly involved in the structure of enzymes necessary for the biochemical reactions taking place in the metabolic pathways. Because of these important roles, vitamins are compounds that contribute to the functioning of organs with different functions. The production of such important compounds is important for human health. Among the biotechnological products with high economic value, vitamins have a wide range of applications such as food additives, therapeutic and medical agents as well as cosmetic products. In this review, the importance of vitamins with high economic value and the production techniques of these vitamins by using microorganisms via the biotechnological techniques were investigated.

### ARTICLE HISTORY

#### Received

03 January 2020

#### Accepted

27 February 2020

### KEY WORDS

Biotechnology,  
Microorganism,  
Vitamin Production

## Giriş

Dünyada Canlıların metabolik faaliyetlerini sürdürebilmeleri için karbonhidratlar, proteinler ve yağlar gibi temel besin maddelerinin yanı sıra vitaminler ve mineraller de gereklidir[1]. Vitaminler canlıların gelişmesine yardımcı olmak, çeşitli makromoleküllerin metabolik reaksiyonlarında görev almak ve sinir sisteminde çeşitli fonksiyonlara sahip olmak gibi görevleri üstlenmişlerdir. Vitaminlerin vücuttaki

<sup>1</sup> Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bilecik, Türkiye

görevleri ayrıntılı bir şekilde tablo 1'de özetlenmiştir. Bu önemli görevlerinden dolayı insanlar dahil tüm canlıların sağlıklı beslenebilmeleri için vitaminlere gereksinimleri vardır.

**Tablo 1** Vitaminlerin vücuttaki fonksiyonları [2]

<b>Vitamin</b>	<b>Görevi</b>
Vitamin A	Retinada fotoreseptör mekanizması, epitelium bütünlüğü, lizozom kararlılığı, glikoprotein sentezi
Vitamin D	Kalsiyum ve fosfor absorpsiyon, kemik mineralizasyonu ve maturasyonu
Vitamin K	Protrombin fonksiyonu, normal kan koagülasyonu
Vitamin C (Askorbik Asit)	Osteoid dokular için esansiyel, kollajen oluşumu, vasküler fonksiyonlar, doku solunumu ve yara iyileşmesi
Vitamin B1 (Thiamin)	Karbonhidrat metabolizması, santral ve periferik sinir fonksiyonu, miyokard fonksiyonu
Vitamin B2 (Riboflavin)	Enerji ve protein metabolizmasının birçok yerinde, mukoz membranların bütünlüğü
Vitamin B3 (Niasin)	Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında, Karbonhidrat metabolizmasında
Vitamin B5 (Pantotenik Asit)	Koenzim A yapısında, açıl transferaz kofaktörü
Vitamin B6	Nitrojen metabolizmasının birçok yerinde, transaminasyon, porfirin ve hem sentezi, triptofanın niasine çevrilmesi
Biyotin	Oksaloasetik asit karboksilasyonu ve dekarboksilasyonu, aminoasit ve yağ asidi metabolizması
Vitamin B12	Eritrosit maturasyonu, nöral fonksiyonlar, DNA sentezi, metionin ve asetat sentezi

Vitaminler memeliler tarafından sentezlenemeyen hayati açıdan önemli mikrobisimler olarak tanımlanırlar. Çoğu vitamin canlıların metabolizması için gereklidir ve vücutta sentezlenemedikleri için dışarıdan temin edilmeleri gereklidir. Doğada vitaminlerin sentezlenmesi ise bitkisel ve mikrobiyal metabolik faaliyetlerle gerçekleşmektedir. Endüstriyel olarak üretilen vitaminler çok çeşitli kullanım alanlarına sahip olduğu için ticari açıdan önemli bileşiklerdir[3]. Global vitamin ve takviye endüstrisi tarafından yapılan araştırma sonuçlarına göre vitamin ve diğer takviyelerin küresel piyasası 68 milyar dolar civarındadır[4]. Bu yüksek kazançtan dolayı vitaminlerin endüstriyel

üretimi günümüz piyasasında önem kazanmıştır. Bu çalışmada ekonomik değere sahip olan vitaminlerin mikrobiyolojik üretimi üzerine yayınlanmış makaleler taranmış olup, bu konu ile ilgili bilgiler derlenmiştir.

## Biyoteknolojik Vitamin Üretimi

Endüstriyel olarak üretilen birçok vitamin gıda, farmasötik ve kozmetik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Günümüzde bir kısım vitamin kimyasal yollarla üretilirken, diğer kısım da özütlenme yoluyla üretilmektedir. Bu üretim işlemleri yüksek enerji gereksinmelerinin yanı sıra fazla miktarda atık oluşumuna da neden olmaktadır. Vitamin üretim işlemlerine ilgi özellikle besin katkı maddelerinin güvenliği nedeniyle artmıştır. Bu nedenle son zamanlarda biyoteknolojik üretim işlemleri üzerine yoğunlaşma olmuştur. Vitaminlerin biyoteknolojik üretim işlemleri hızlı bir şekilde gerçekleştiği için kimyasal üretim işlemlerine göre tercih edilmektedir. Tablo 2’de literatürde bulunan biyoteknolojik yollarla üretilen vitaminlere örnekler verilmiştir.

**Tablo 2** Literatürde bulunan biyoteknolojik yollarla üretilen vitaminlere örnekler

Vitamin	Kullanılan Mikroorganizma/Enzim	Yöntem	Kaynak
E vitamini	<i>Euglena gracilis (alg)</i>	Glikoz kullanılarak fermantasyonla üretim	[5]
K vitamini	<i>Bacillus subtilis</i>	Soya özütü kullanılarak fermantasyonla üretim	[6]
C vitamini (Askorbik asit)	2,5-diketo-D-glukonik asit redüktaz <i>Cynobacterium sp.</i>	2-keto-L-gulonik asitin fermantasyon işlevi ile L-askorbik asitin kimyasal dönüşümü esnasında	[7] [8]
Biyotin	<i>Serratia marcescens</i> (fermantasyon) <i>Bacillus sphaericus</i> (Çoklu enzim sistemi)	Genetik olarak modifiye bakteri ile glikozdan fermantasyonla üretim Mutant bakterinin biyotin biyosentezi yapan enzim sistemi kullanılarak diaminopimelik asitten dönüşümle üretim	[9]
Riboflavin	<i>Eremothecium ashbyii</i> , <i>Ashbya gossypii</i> , <i>Bacillus sp.</i>	Glikozdan fermantasyonla üretim	[10]
Vitamin B <sub>12</sub>	<i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Pseudomonas</i>	Glikozdan fermantasyonla üretim	[11]

## Vitaminlerin Mikrobiyolojik Üretim Süreci

Vitamin ve vitamin benzeri bileşiklerin dünya marketindeki değeri 2007 yılında yaklaşık 2.3 milyar dolar olarak rapor edilmiştir. Genel olarak üretilen vitaminlerin çoğunluğu yaklaşık %50 oranında hayvan beslenmesinde kullanılmakla birlikte bu oranı %22 ve %17 ile sırasıyla besin desteğinde ve gıda endüstrilerinde kullanımı takip etmektedir. Kozmetik ürünlerin üretiminde ise %11 oranında üretilen vitaminler kullanılmaktadır. Artan dünya nüfusu ile birlikte özellikle besinlerde destekleyici vitaminlere ilgi de artmıştır. Bunlara ilaveten vitamin takviyeli besinlerin sağlık üzerine olumlu etkileri ile ilgili raporlar da vitamin üretimine ilgiyi arttırmıştır.

Yılda birkaç milyar dolarlık piyasaya sahip vitaminlerin çoğunluğu canlıların beslenmesi için ticari olarak üretilmektedir[12]. Mikroorganizmalar tarafından ticari olarak üretilen vitaminler; Vitamin B12 (siyanokobalamin), vitamin C (L-askorbik asit), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B5 (pantotenik asit) ve biyotin'dir[13]. Mikroorganizmalar tarafından üretilen vitaminler ve bu vitaminleri üreten mikroorganizmalar tablo 3'de verilmiştir.

**Tablo 3** Mikroorganizmalar tarafından üretilen vitaminler ve üreten mikroorganizmalar

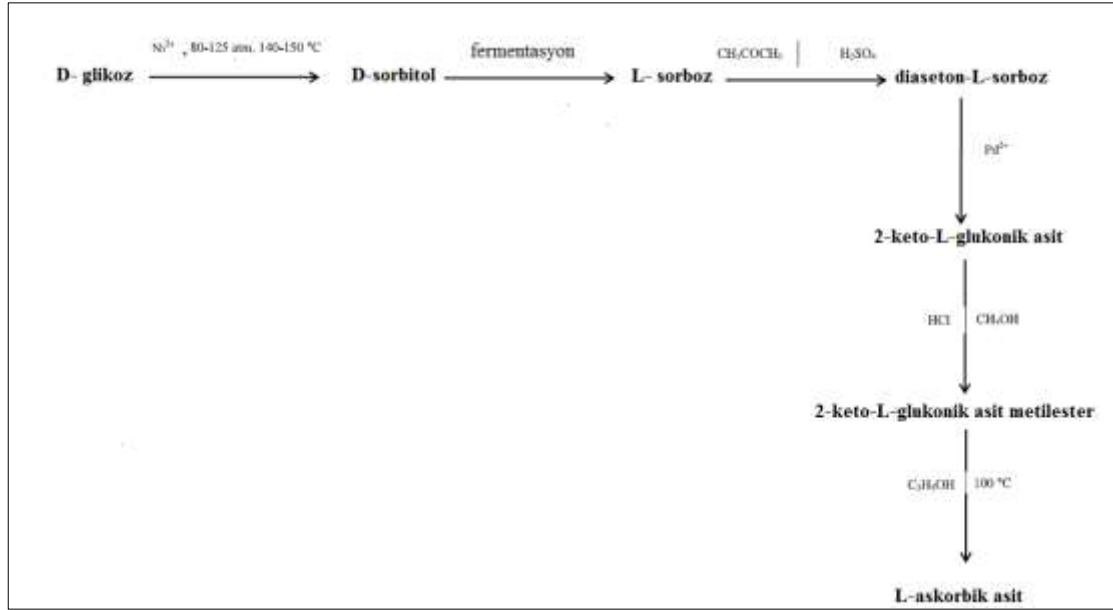
Vitamin	Mikroorganizma	Referans
Riboflavin (B2 vitamini)	<i>Emmenthodium ashbyii</i>	[14]
	<i>Ashbya gossypii</i>	[15]
B12 vitamini	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	[16]
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	[17]
C vitamini	<i>Cryptococcus terreus</i>	[18]
		[19]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[20]
Vitamin B6	<i>Propionibacterium shermanii</i>	[21]
	<i>E.coli</i>	[22]

## Mikrobiyolojik Yollarla Üretilen Vitaminler



### **C vitamini (L-askorbik asit) üretimi**

İnsanlar kadar hayvan beslenmesinde de önemli yere sahip vitaminlerden biri olan C vitamini antioksidan olarak rol oynar ve yılda 100000 tonluk küresel üretim potansiyeline sahiptir[3]. L-askorbik asit esansiyel bir besin içeriği olduğu için insanlarda farklı fiziksel fonksiyonlar için gereklidir[23]. C vitamini eksikliği bu vitaminin kollajenin translasyon öncesi modifikasyonu esnasında gerçekleşen rolündeki eksiklikten kaynaklı hastalıklara neden olmaktadır. L-askorbik asitin en önemli fonksiyonu ise dokuları oksidatif ürünlerin zarar verici etkisinden korumasıdır[24]. Bu nedenle L-askorbik asit gıda endüstrisinde vitamin olarak kullanımının yanı sıra antioksidan olarak da kullanılmaktadır. Bu antioksidan fonksiyonundan dolayı L-askorbik asit hem gıda takviyecisi hem de farmasötik ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca kollajen üretimini uyardığı için kozmetik ürünlerde katkı maddesi olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır[25]. C vitamini biyosentezinde rol alan biyokimyasal reaksiyonları içeren işlev Reichstein Süreci (Şekil 1) olarak tanımlanmıştır. Endüstriyel olarak C vitamini üretiminde kullanılan bu süreç adını bu süreci bulan kişiden almıştır. Kimyasal C vitamini süreci; bu sürecin kimyasal yollarla gerçekleşmesi esnasında birçok basamağında yüksek sıcaklık ve/veya basınç gerekliliği olduğu için oldukça fazla enerji gerektiren bir üretim sürecidir. Bunlara ilaveten, bu süreçte birçok kimyasalın transformasyonu için aseton, sülfürik asit ve sodyum hidroksit gibi bileşiklere, inorganik ve organik çözücülere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenlerden dolayı ciddi bir atık kontrol maliyeti ile sonuçlanan bu üretim süreci çevresel kontrol açısından takip gerektirmektedir. Bu ekonomik faktörler L-askorbik asitin mikrobiyal biyotransformasyonla üretimine ilgiyi arttırmaktadır[26; 27]. Son zamanlardaki fermantasyon süreçlerindeki inovatif ilerlemeler ile biyokimya ve rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler biyoteknolojik yollarla L-askorbik asit üretimine olanak sağlamaktadır[28]. Şekil 1'de görüldüğü üzere Reichstein süreci 6 kimyasal adımdan oluşan bir fermantasyon olayıdır. Bir biyodönüşüm reaksiyonunu faydalı hale getiren Reichstein süreci *Gluconobacter oxydans* tarafından D-sorbitolün L-sorboza okside edilmesi reaksiyonu ile başlamaktadır. Bu reaksiyon sonunda yüksek sorbitol konsantrasyonuna dirençli olarak seçilen mutant *G. oxydans* kullanımıyla 200 g/l D-sorbitol 200g/l L-sorboza dönüşmektedir. Reaksiyon dizini tamamlandığında D-glikozdan L-askorbik asit sentezlenmektedir.



Şekil 1 Reichstein süreci ile L-askorbik asit (C vitamini) üretimi

### B12 vitamininin üretimi

B12 vitamini insan metabolizmasında metiyonin sentaz ve R-metilmalonil-CoA mutaz enzimlerinin aktivitesinde görev almaktadır ve günlük yaklaşık 1 mg alınması zorunludur. Bu nedenle yıllık ticari olarak 10 tondan fazla Vitamin B12 üretimi farklı bakteri türleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Vitamin B12 terimi yaygın olarak kobalamin grubu bileşikleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Doğal formları adenoilkobalamin, metilkobalamin ve hidroksikobalaminidir. Vitamin B12 olarak tanımlanan siyanokobalamin ise doğada bulunmayan ve endüstriyel olarak üretilen kararlı bir kobalamin formudur[29]. Vitamin B12 çoğunlukla fermantasyon işlemi ile elde edilmekte olup, dünya genelinde talebi karşılayabilmek için birçok farmasötik şirketi tarafından üretilmektedir. Merck 1952'de *Pseudomonas denitrificans* kullanarak vitamin B12 üretmeye başlamıştır ve daha sonraları mikrobiyal tarama ve genetik modifikasyonlarla orjinal toprak izolatına göre 30 kat daha verimli üretim yapabilen kültürleri geliştirmiştir[30]. Son yüzyılda verimli bir şekilde vitamin B12 üreten birçok bakteri türü bulunmuştur. Tablo 4'de vitamin B12 üreten çeşitli mikroorganizma türleri listelenmiştir. Vitamin B12 biyosentezinin basamakları *P. denitrificans*, *Salmonella typhimurium* ve *Propionibacterium freudenreichii* türlerinde karakterize edilmiştir. Tipik bir bakteri genomunun yaklaşık %1'lik kısmını oluşturacak 30'dan fazla geninin denovo kobalamin sentezinde rol aldığı bildirilmiştir[31]. Doğada Vitamin B12 için 2

farklı biyosentez rotası bulunmaktadır. Bu rotalardan biricisi; *P. denitrificans* gibi organizmalarda bulunan aerobik veya çoğunlukla oksijen bağımlı yollar, ikincisi ise *Propionibacterium shermanii*, *S. typhimurium* ve *Bacillus megaterium* gibi organizmalarda bulunan anaerobik yani oksijen bağımsız yollarıdır.

**Tablo 4.** Vitamin B12 üreten çeşitli mikroorganizma türleri ve üretim miktarları

<b>Mikroorganizma Türü</b>	<b>Vitamin B12 Üretimi (mg/L)</b>
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	206
<i>Rhodopseudomonas protamicus</i>	135
<i>Propionibacterium shermanii</i>	60
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	60
<i>Nocardia rugosa</i>	18
<i>Rhizobium cobalaminogenum</i>	16,5
<i>Micromonospora sp.</i>	11,5
<i>Streptomyces olivaceus</i>	6
<i>Nocardia gardneri</i>	4,5
<i>Butyribacterium methylotrophicum</i>	3,6
<i>Pseudomonas sp.</i>	3,2
<i>Arthrobacter hyalinus</i>	1,1

### **B2 (Riboflavin) vitamininin üretimi**

Riboflavin (B<sub>2</sub> vitamini) insan ve hayvan beslenmesinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Riboflavin eksikliğinde insanlarda saç dökülmesi, görme bozukluğu ve büyüme yetersizliğinin yanı sıra bu vitaminin iltihaplanma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu vitaminin migren[32] ve sıtma[33] gibi hastalıkların tedavisinde başarılı olduğu tespit edilmiştir. Bu vitamin ticari olarak kimyasal sentez, fermantasyon veya hem kimyasal hem de fermantasyonun kombinasyonu ile üretilmektedir. Son yıllarda fermantasyonla üretim tek bir adımda sağlanabildiği ve bu nedenle de önemli ölçüde maliyeti düşürdüğü için yaygın olarak tercih edilmektedir. Diğer taraftan kimyasal üretim süreçleri hem çok aşamalı hem de çok fazla maliyetlidir. BASF, Roche, ADM/Aventis, Hubei Guangji gibi üreticilerin çoğu kimyasal sentez yerine fermentatif üretimi tercih etmektedir[34]. *Clostridium sp.* gibi bakteri türleri ve *Candida sp.* gibi maya türleri iyi üreticiler arasında yer almasına karşın, birbiri ile yakın ilişkili Askomyset mantar ailesine dahil olan *Eremothecium ashbyii* and *Ashbya gossypii* türleri

en iyi riboflavin üreticileridir[35]. Demir iyonları *Clostridium sp.* ve *Candida sp.* gibi düşük ve orta derecedeki üreticilerde riboflavin üretimini inhibe etmektedir. Diğer taraftan *Eremothecium ashbyii* ve *Ashbya gossypii* türleri ise demirin bu etkisini baskılama yeteneğinde oldukları için en iyi riboflavin üreticileri olarak kabul edilirler[19].

*Ashbya gossypii* türü kullanılarak fermantasyonla riboflavin üretimi için melas[36], palm yağı[37], mısır likörü[38], peyniraltı suyu[39] gibi farklı karbon kaynakları denenmiştir. *Ashbya gossypii* tarafından peynir altı suyu, kepek, glisin, pepton, sükroz, maya özütü ve soya fasulyesi gibi farklı maddeler bulunan ortamlarda üretilen riboflavin miktarları sırasıyla; 389.5, 120, 87.5, 78.3, 68.4, 23.2 ve 17.5 mg/L'dir.

*Bacillus subtilis* türü kullanılarak fermantasyonla riboflavin üretiminde klasik genetik ve rekombinant DNA teknolojisi kullanılmıştır. Klonlama ve DNA nükleotidi sekanslaması göstermiştir ki, riboflavin biyosentezi için gerekli enzimlerin 4.3 kb'lık tek bir operon olarak görev yapan gen organizasyonu tarafından kodlanmaktadır. Riboflavin üreticisi olan *B. subtilis* suşu Perkins ve ark. (1999)[40] tarafından geliştirilmiştir.

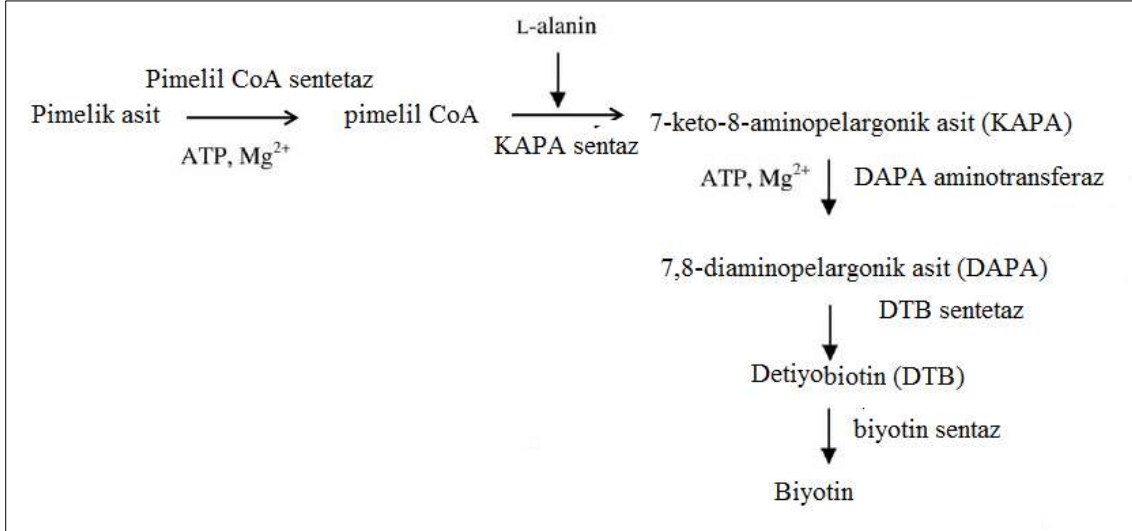
*Corynebacterium ammoniagenes* türü kullanılarak fermantasyonla riboflavin üretiminde ise rekombinant DNA teknikleri kullanılarak metabolizma mühendisliği temelli çalışmalarla geliştirilen *C. ammoniagenes* türleri kullanılmıştır. Biyosentetik genlerin ekspresyonunu arttırmak için *C. ammoniagenes*'deki promotor aktiviteye sahip DNA parçası izole edilmiştir. Son ürün inhibisyonunun enkilenmeyen en iyi modifiye riboflavin üreticisi 5 litrelik kavanoz fermentörde 72 saat sonrasında 15.3 g/L riboflavin üretmiştir[41].

*Lactococcus lactis* türü kullanılarak fermantasyonla riboflavin üretiminde ise [42] hem mutajenez hem de metabolik mühendislik tekniklerini kullanarak riboflavin ve folatı en verimli şekilde üretebilen *Lactococcus lactis* suşu geliştirmiştir.

### **Biyotin vitamininin üretimi**

Biyotin (H vitamini) prokaryotik ve ökaryotiklerin metabolizmasındaki merkezi yollarda rol alan en etkileyici kofaktörlerden biridir. İnsanlar ve hayvanlar günlük 100 mikrogram biyotine ihtiyaç duyarken, bitkiler ve mantarlar kendi kofaktörlerini sentezleyebilme özelliğine sahiptir. Biyotin yıllık 10- 30 ton market payına sahiptir ve birçok besin ve kozmetik ürününün içine eklenmektedir. Satışa sunulan biyotin büyük bir çoğunluğu kimyasal olarak sentezlenmektedir. Ancak, kimyasal sentez yüksek

miktarda çevre kirliliğine yol açtığı için son dönem biyoteknolojik çalışmalar biyotin üreten mikroorganizmaların geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Düşük üretim maliyeti nedeniyle biyotinin fermentatif üretimine ilgi fazladır. Biyotinin biyosentetik yolağı *Escherichia coli*[43], *Bacillus sphaericus*[44], *Bacillus subtilis*[45] ve *Sphingomonas sp.*[46] gibi farklı mikroorganizmalarda rapor edilmiştir. *B. sphaericus* detiyobiyotini (+)-biyotine dönüştürebilmesine rağmen, biyotin üretiminde sadece son



basamak olan detiyobiyotinin (DTB) enzimatik olarak biyotine dönüşümü tam olarak çözülebilmiş değildir. Pimeli-CoA'dan biyotin sentezinde rol alan metabolik yolak en iyi *E. coli* ile yapılan çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır. Biyotin üretimindeki yolakta oluşan üç ara ürün; 7-keto-8-aminopelargonik asit (KAPA), 7,8-diaminopelargonik asit (DAPA) and DTB'dir. Biyotinin biyosentetik yolağı Şekil 2'de gösterilmiştir. Biyotin sentezindeki en büyük sorun biyotinin sentezde rol alan tüm enzimler üzerindeki baskılayıcı etkisinden kaynaklanmaktadır. Biyotin sentezi için modifiye mikroorganizmaların kullanımı üzerine çalışmalar bugün hala devam etmektedir.

Şekil 2 Biyotin sentez yolağı

## Sonuç ve Öneriler

Son birkaç yılda yapılan çalışmalarla vitamin öncüsü, biyopigment, antioksidan gibi çeşitli sağlık alanında kullanılan ürünlerin biyosentez yolları; bakteriler (*Escherichia coli*, *Serratia sp.*, *Bacillus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Sinorhizobium sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Hiphomicrobium sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Rhodobacter sp.*, *Rhodococcus sp.*), mayalar (*Saccharomyces sp.*, *Candida sp.*, *Xanthophyllomyces sp.*, *Yarrowia sp.*), mantarlar (*Blakeslea sp.*, *Ashbya sp.*,

*Mortierella sp.*, *Mucor sp.*, *Monascus sp.*) ve yeşil mikroalgler (*Dunaliella sp.*, *Euglena sp.*, *Haematococcus sp.*) gibi birçok mikroorganizmada ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir[47- 51]. Öte yandan, bu yeni keşfedilen biyosentez yollarının ve metabolik düzenlemelerin kompleks olmasından dolayı bazı vitaminlerin, biyopigmentlerin ve çeşitli sağlık ürünlerinin istenilen yüksek düzeylerde mikrobiyal üretimi konusunda güçlükler çekilmektedir. Bu tür güçlükler nedeniyle günümüzde önemli bir sağlık biyoteknolojisi ürünü olan gama-aminobütirik asit (GABA) üretiminde çok daha yüksek verimli üretim olan tek adımda gerçekleşen doğrudan glikoz fermantasyonu süreci yerine halen iki aşamalı işlemde üretim süreci kullanılmaktadır[52]. Özellikle de endüstriyel düzeyde vitamin ve sağlık ürünleri üretimi konusunda ciddi zorluklar bulunmaktadır. Örneğin ileri düzeyde genetik olarak modifiye edilmiş *Bacillus subtilis* suşu ile B<sub>1</sub> ve B<sub>9</sub> vitaminlerinin üretiminde maliyeti yüksek öncül ara bileşiklere ihtiyaç duyulmasının yanı sıra bu vitaminlerin üretim miktarı da ticari boyuttaki üretime göre oldukça düşüktür. Öte yandan son zamanlarda karışık kültür kullanılarak fermantasyonla büyük ölçekte C vitamini üretimi başarılı bir şekilde yapılabilmektedir. Ayrıca, günümüzde temel olarak anaerobik bakteri ve arkelerden oluşan barsak mikrobiyotasının da konakçıları için vitamin tedarikçileri olduğu bilinmektedir, ancak bu konuda yeterince araştırma literatürde bulunmamaktadır[53]. Bu mikroorganizmalar endüstriyel boyutta vitamin ve çeşitli sağlık ürünlerinin üretimi açısından yeni genlerin kaynağı olarak kullanılabilirler. Bu bağlamda endüstriyel boyuttaki üretim için istenilen verimde vitaminlerin, biyopigmentlerin ve antioksidanların üretimi için genetik ve biyoteknolojik yöntemlerle modifiye edilen bakteri, maya, mantar veya mikroalg kültürlerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Yüksek verimle üretim üzerine yapılan tarama metodolojileri incelendiğinde endüstriyel mikrobiyal suşların moleküler genetikleri, mikrobiyolojik sistemlerde metabolik mühendislik ve modelleme ile ilgili bilimsel çalışmalardaki atılımlarla birlikte enzim ve hücre mühendisliğindeki gelişmelerin de endüstriyel boyutta vitamin ve vitamin benzeri bileşiklerin üretimine olanak sağladığı görülmüştür. Bunun en çarpıcı örneği *Ashbya gossypii* suşu kullanılarak fermantasyonla B<sub>2</sub> vitamini üretimidir. Bu örnekte metabolik mühendislik, karşılaştırmalı genom ve transkriptom analizleri, genomik metabolik yaklaşımların kombinasyonu ile birlikte klasik mutajenez teknikleri ile geliştirilen suşlar endüstriyel verimliliği yüksek oranda vitamin üretimi

yapmak için kullanılmıştır[54; 56]. Geliştirilen bu suşla yapılan yüksek verimli ve başarılı üretim neticesinde endüstriyel düzeyde kimyasal işlevlerle B<sub>2</sub> vitamini üretimini yerine günümüzde mikrobiyal fermantasyona dayalı üretim işlevinin kullanımı tercih edilmektedir. Kimyasal üretim süreci yerine biyoteknolojik üretim sürecinin uygulanması ile üretim ve çevre koruma maliyetinin %43 oranında azaldığı tespit edilmiştir[52]. Buna ilaveten, biyoteknolojik üretimle CO<sub>2</sub> emisyon oranının da %30 oranında azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak çok aşamalı kimyasal işleme kıyasla tek ana adımla gerçekleşen fermantasyonla üretim maliyetinde hem tasarruf edilmiş hem de üretimde çevre dostu bir yöntem kullanılmıştır[57]. Ayrıca, yönlendirilmiş evrim ve rasyonel protein deseni hesaplama araçlarının kullanımı ile yeni enzimlerin yaratılması ve bu enzimlerin vitamin öncüleri gibi kimyasal bileşiklerin biyosentezle üretimi alanında kullanım potansiyelin yaygınlaşması da önem kazanmıştır. Günümüzde mikrobiyal enzimler ve hücrelerle asimetric biyokataliz kullanılarak yüksek verim ve enantiyo-seçiciliğe sahip vitamin öncüleri de dahil olmak üzere çok çeşitli kiral ürünlerin üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Bugün artık organik sentezle üretim yapan biyokataliz yöntemi ile üretilen biyokimyasallar kimyasal olarak üretilen ürünlere alternatif olarak tercih edilmektedir. Çeşitli endüstrilerde yeni kültür teknikleri, hızlı örnekleme ve biyosensör metodolojileri ile biyoreaktör tasarımlarındaki gelişmelerin hepsi birden endüstriyel mikrobiyoloji ve biyoteknoloji temelli üretim işlemlerine olan ilginin artmasına katkıda bulunmaktadır. Hücre biyokimyası, metabolik düzenleme ve hücre biyolojisi alanlarındaki bilgilerin eksikliği nedeniyle tasarım tabanlı endüstriyel mikrobiyal suş mühendisliği teknolojilerinin gelişmesinde engeller söz konusudur. Biyoloji ve sentetik mikrobiyoloji teknolojilerindeki gelişmelerin bu bilgi boşluğunu doldurma da katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Özellikle bu alanlardaki gelişmelerin birada kullanımı ile endüstriyel olarak mikrobiyal temelli vitaminler ve diğer sağlık ürünlerinin yüksek verimle üretimine olanak sağlayacak uygun mikrobiyal suşların üretilebilecektir.

Gelecekte sentetik biyolojideki gelişmeler yüksek verimde vitamin ve diğer sağlık ürünlerini üretebilen üretici suşların inşasına olanak sağlaması beklenmektedir. Özellikle de vitamin üretiminde mikrobiyal süreçlerin kimyasal üretim süreçlerine göre avantajları oldukça fazladır. Kimyasal süreçlerle üretilen ürünler daha çok rasemik karışımlar iken, fermantasyon ya da biyodönüşüm reaksiyonları ile üretilen ürünler

istenilen form olan enantiyomerik bileşikler şeklindedir. Buna ilaveten biyokimya ve DNA teknolojilerindeki gelişmeler biyoteknolojik vitamin üretimi ile ilgili çok çeşitli seçenekler sunmaktadır. Genel olarak biyoteknolojik süreçler ve ürünlerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri vitaminler gibi maddelerin bu süreçlerle üretimine yönelik ilgiyi arttırmaktadır. Bunlara ilaveten biyoteknolojik üretimlerde maliyetin düşürülmesi ile yüksek pazar payına sahip ürünlerin hem ekonomik hem de çevre dostu yöntemlerle üretiminin sağlanabilmesi öngörülmektedir.

### Kaynaklar

1. Kavak, M., E. Şeker, ve M. Dörücü, Balıklarda Beslenme Hastalıkları. Int. J. Pure Appl. Sci.,2016. 2(1): p.1- 12.
2. Aydın, A., Vitamin ve Mineraller. İ.Ü. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Sağlam Çocuk izlemi Sempozyum Dizisi No: 35 Ekim 2003: p. 93-97.
3. Shimizu, S., Vitamins and Related Compounds: Microbial Production. Sakayu Shimizu Kyoto, Japan Published Online: 7 May 2008
4. Reporterlink 2019: <http://www.reportlinker.com/ci02037/Vitamin-and-Supplement.html>
5. Ünver Alçay, A., K. Bostan, E. Dinçel, ve C. Varlık, Alglerin İnsan Gıdası Olarak Kullanımı. Aydın Gastronomy, 2017. 1 (1): p.47-59.
6. Sato, T., et al., Production of menaquinone (vitamin K<sub>2</sub>)-7 by *Bacillus subtilis*. J. Biosci. Bioeng., 2010. p. 9116–20.
7. Hancock, R.D., ve R. Viola., Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. Trends Biotechnol, 2002. 20: p. 299–305.
8. Gökpınar, Ş., et al., Algal Antioksidanlar. E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 2006. 23(1/1): p. 85-89.
9. Gloeckler, R., I. et al., Cloning and characterization of the *Bacillus sphaericus* genes controlling the bioconversion of pimelate into dethiobiotin. Gene, 1990. 87: p.63–70.
10. Horiuchi, J., and K., Hiraga, Industrial application of fuzzy control to large-scale recombinant vitamin B<sub>2</sub> production. J. Biosci. Bioeng., 1999. 87: p.365–371.
11. Marwaha, S.S., R.P., Sethi, and J.F. Kennedy, Role of amino acids, betaine and choline in Vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis by strains of *Propionibacterium*. Enzyme Microb. Technol., 1983. 5: 454–456.
12. Demir, A., Seyis, F., ve Kurt, O., Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar: I. Bitkiler. OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 2006. 21(2): p.249-260.
13. El-Mansi, E.M.T. Fermentation Microbiology and Biotechnology, Second Edition. Taylor & Francis, 2006.
14. V. Pujari et al., New and emerging prophylactic agents of migraine. CNS Drugs, 2002. 16: p.611–634.
15. Kato, T., and E.Y. Park., Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. Biotechnology Letters, 2011. 34(4): p.611-618.
16. Xia, W. et al., Industrial vitamin B<sub>12</sub> production by *Pseudomonas denitrificans* using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates.Bioprocess Biosyst. Eng., 2015. 38(6): p.1065-73.
17. Deptula, P., et al., Food-Like Growth Conditions Support Production of Active Vitamin B<sub>12</sub> by *Propionibacterium freudenreichii* 2067 without DMBI, the Lower Ligand Base, or Cobalt Supplementation. Front. Microbiol., 2017. 8: p.368.



18. Survase, S.A., et al., Production of Vitamins. Food Technol. Biotechnol., 2006. 44(3): p.381–396.
19. Izah, S.C., E.B., Enaregha, and J.O., Epidi, Vitamin content of *Saccharomyces cerevisiae* biomass cultured in cassava wastewater. MOJ Toxicol. 2019. 5(1): p.42–45.
20. Branduardi, P., et al., Biosynthesis of vitamin C by yeast leads to increased stress resistance. PloS One, 2007. 2(10): p.e1092.
21. Gardner, N., and C.P. Champagne. Production of *Propionibacterium shermanii* biomass and vitamin B12 on spent media. Journal of Applied Microbiology, 2005. 99(5): p.1236-1245.
22. Drewke, C., and E., Leistner. Biosynthesis of vitamin B6 and structurally related derivatives. Vitamins and Hormones, 2001. 61: p.121-155.
23. Padh, H., Cellular functions of ascorbic acid. Biochem. Cell Biol., 1990. 68: p.1166–1173.
24. Padh, H., Vitamin C: Newer insight into its biochemical functions. Nutr. Rev., 1991. 49: p.65–70.
25. Chauhan, A.S., R.S. Ramteke, and W.E. Eipeson, Properties of ascorbic acid and its applications in food processing: A critical appraisal. J. Food Sci. Technol., 1998. 35: p.381–392.
26. Smitha, M.S., S., Singh, and R., Singh, Microbial bio transformation: a process for chemical alterations. J Bacteriol Mycol Open Access, 2017. 4(2): p. 47-51.
27. Vandamme, E.J., Production of vitamins, coenzymes, and related biochemicals by biotechnological process. J. Chem. Technol. Biotechnol., 1992. 53: p.313–327.
28. Hancock, R.D. and R., Viola, The use of microorganisms for L-ascorbic acid production: Current status and future perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001. 56: p.567–576.
29. Combs, G.F. and Jr. James P. McClung, The Vitamins (Fifth Edition), Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Elsevier, 2017.
30. Erdöl, Ş., Önemli Bir Halk Sağlığı Problemi: Vitamin B12 Eksikliği. JCP, 2017.15(2): 30-36.
31. Roth, J.R., et al., Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol., 1993. 175: 3303–3316.
32. Krymchantowski, A.V., M.E. Bigal, and P.F. Moreira, New and emerging prophylactic agents of migraine. CNS Drugs, 2002. 16: p.611–634.
33. Akompong, T., N. Ghorri, and K. Halder, *In vitro* activity of riboflavin against the human malaria parasite *Plasmodium falciperum*. Antimicrob. Agents Chemother., 2000. 44: p.88–96.
34. Horiuchi, J., and K. Hiraga, Industrial application of fuzzy control to large-scale recombinant vitamin B2 production. J.Biosci. Bioeng., 1999. 87: p.365–371.
35. Stahmann, K.P., et al., Formation and degradation of lipid bodies found in the riboflavin producing fungus *Ashbya gossypii*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994. 42: p.121–127.
36. Pujari, V., and T.S., Chandra, Statistical optimization of medium components for enhanced riboflavin production by a UV- -mutant of *Eremothecium ashbyii*. Process Biochem., 2000. 36: p.31–37.
37. Park, E.Y., A., Kato, and H., Ming, Utilization of waste activated bleaching earth containing palm oil in riboflavin production by *Ashbya gossypii*. J. Am. Oil. Chem. Soc., 2004. 81: p.57–62.
38. Ledesma-Amaro, R., et al., Metabolic engineering of riboflavin production in *Ashbya gossypii* through pathway optimization. 2015. Microb Cell Fact, 14: p.163.
39. Ertürk, E., O., Erkmen, and M.D., Oner, Effect of various supplements on riboflavin production by *Ashbya gossypii* in whey. Turk. J. Eng. Environ. Sci., 1998. 22: p.371–376.
40. Perkins, J.B., et al., Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 1999. 22: p.8–18.
41. Koizumi, S., et al., Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2000. 53: p.674–679.
42. Sybesma, W., et al., Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental, 2003. Microbiology, 69: p.3069-3076.

43. Baker, D.F., and A.M., Cambell, Use of the bio-lac fusion strains to study regulation of biyotin biosynthesis in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 1980. 143: p.789–800.
44. Oshiro, T., et al., Enzymatic conversion of dethiobiyotin to biyotin in cell free extracts of a. *Bacillus sphaericus* bioB transformant. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994. 58: p.1738–1741.
45. Bower, S. et al., Cloning, sequencing and characterization of the *Bacillus subtilis* biyotin biosynthetic operon. *J. Bacteriol.*, 1996. 178: p.4122–4130.
46. Saito, I. et al., Comparison of biyotin production by recombinant *Sphingomonas* sp. under various agitation conditions. *Biochem. Eng. J.*, 2000. 5: p.129–136.
47. Laudert, D., and H.P. Hohmann, Application of enzymes and microbes for the industrial production of vitamins and vitamin–like compounds. In *Comprehensive Biotechnology*, 2nd edn, Moo-Young, M. (ed).Amsterdam: Elsevier B.V., 2011. 3: p. 583–602.
48. Borowitzka, M.A., High value products from microalgae -their development and commercialization. *J. Appl. Phycol.*, 2013. 25: p. 743–756.
49. Ledesma-Amaro, R., et al., Microbial production of Vitamins. In *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*, McNeil, B., Archer, D., Giavasis, I., and Harvey, L. (eds.). Oxford: Woodhead Publishing, 2013. 246: p. 571–594.
50. Bellou, S., et al., Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.*, 2014. 32: p. 1476–1493.
51. Vandamme, E.J., and J.L. Revuelta, *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments and Antioxidants*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2016. pp. 560.
52. Revuelta, J.L. et al., Microbial biotechnology for the synthesis of (pro) vitamins, biopigments and antioxidants: challenges and opportunities. *Microbial Biotechnology*, 2016. 9: p. 564–567.
53. Le Blanc, J.G., et al., Bacteria as vitamin suppliers to their hosts: a gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2013. 24: p. 160–168.
54. Karos, M., et al., A genome-wide transcription analysis of a fungal riboflavin overproducer. *J. Biotechnol.*, 2004. 113: p. 69–76.
55. Ledesma-Amaro, R., et al., Genome scale metabolic modeling of the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2014. 111: p. 1191–1199.
56. Ledesma-Amaro, R., et al., Metabolic engineering of riboflavin production in *Ashbya gossypii* through pathway optimization. *Microb. Cell. Fact.* 2015. 14: p. 163.
57. Wenda, S., et al., Industrial biotechnology—the future of green chemistry. *Green Chem.*, 2011. 13: p. 3007–3047.

*Bir sonraki sayıda grşmek midiyle..*  
*Hope to see you in the next issue..*

